

УДК 577.112

ПРЯМОЙ МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ФИШИНГ ЦИНКЗАВИСИМЫХ БЕЛКОВЫХ ПАРТНЕРОВ БЕТА-АМИЛОИДА 1–16 С “ТАЙВАНЬСКОЙ” (D7H) МУТАЦИЕЙ И С ФОСФОРИЛИРОВАННЫМ ОСТАТКОМ Ser8

© 2020 г. П. В. Ершов^а, Ю. В. Мезенцев^а, Е. О. Яблоков^а, Л. А. Калужский^а, А. С. Иванов^а, Н. В. Гнучев^б, В. А. Митькевич^б, А. А. Макаров^б, С. А. Козин^б, *

^а Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Москва, 119121 Россия

^б Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

*e-mail: kozinsa@gmail.com

Поступила в редакцию 11.06.2020 г.

После доработки 10.07.2020 г.

Принята к публикации 10.07.2020 г.

Ранее методом прямого молекулярного фишинга мы показали, что металлсвязывающий домен интактного бета-амилоида (Aβ(1–16)) в цинкзависимой манере участвует во взаимодействиях с рядом белков из цитозольной фракции клеток нейроblastомы человека SK-N-SH. Известно, что наследственные мутации в Aβ(1–16), ускоряющие развитие болезни Альцгеймера, а также посттрансляционные модификации аминокислотных остатков могут существенно влиять на структуру домена в присутствии ионов цинка. В настоящей работе с использованием методологии прямого молекулярного фишинга (совмещенный метод аффинного выделения и масс-спектрометрической идентификации) выявлены белки цитозоля клеток SK-N-SH, способные образовывать цинкзависимые нековалентные комплексы с Aβ(1–16) с “Тайваньской” (D7H) мутацией и с Aβ(1–16) с фосфорилированным остатком Ser8. Показано, что белки-партнеры металлсвязывающих доменов этих изоформ Aβ отличались от белков-партнеров домена Aβ(1–16). В то же время домен Aβ(1–16) с “Английской” (H6R) мутацией и домен Aβ(1–16), содержащий одновременно изомеризованный остаток Asp7 и фосфорилированный Ser8, в аналогичных экспериментальных условиях не взаимодействовали с цитозольными белками. Полученные результаты полезны для разработки методов рационального модулирования белок-белковых взаимодействий с участием природных изоформ бета-амилоида, они также указывают на возможную роль бета-амилоида с фосфорилированным Ser8 в качестве молекулы, вовлеченной в нормальные физиологические процессы.

Ключевые слова: болезнь Альцгеймера, бета-амилоид, изоформы, металлсвязывающий домен, цинк, белок-белковые взаимодействия, клетки SK-N-SH

DOI: 10.31857/S0026898420060038

ВВЕДЕНИЕ

В развитии болезни Альцгеймера (БА) ключевым молекулярным агентом наряду с белком тау является бета-амилоид (Aβ) – гетерогенный по C-концу полипептид (с длиной основной цепи до 43 аминокислотных остатков) и его различные генетические и химические модифицированные изоформы [1]. В образовании внеклеточных фибриллярных агрегатов Aβ (амилоидных бляшек), характерных для БА [2], критическую роль играют нековалентные комплексы Aβ с ионами цинка [3]. Эти комплексы выступают в качестве зародышей цинкзависимой олигомеризации и агрегации эндогенных молекул Aβ [4]. Модуляторами

образования таких зародышей могут быть различные биомолекулы [5], при этом идентификация белков, которые образуют цинкзависимые комплексы с Aβ, представляет особый интерес для разработки антиамилоидной терапии БА [6–8].

N-концевой фрагмент 1–16 – металлсвязывающий домен интактного Aβ и его различных изоформ [9–14], представляет собой часть Aβ, необходимую и достаточную для экзогенного инициирования образования амилоидных бляшек в животной модели БА [15]. В этом домене (Aβ(1–16)) найдены три аминокислотные замены, отличающие Aβ невосприимчивых к БА мышей и крыс от подавляющего большинства остальных

Сокращения: БА – болезнь Альцгеймера; Aβ – бета-амилоид; LC-MS/MS – метод идентификации белков с помощью совмещенных технологий жидкостной хроматографии и тандемной масс-спектрометрии; RU – резонансная единица (1 RU соответствует связыванию 1 пг материала на 1 мм² поверхности чипа).

млекопитающих (включая человека), подверженных данной нейродегенеративной патологии [16, 17]. Также именно в металлсвязывающем домене Аβ встречаются модификации и мутации аминокислотных остатков, которые резко ускоряют развитие БА [18, 19].

Ранее мы показали, что иммобилизованные синтетические пептидные аналоги металлсвязывающего домена природных изоформ Аβ можно рассматривать как адекватную *in vitro* модель полноразмерных молекул Аβ для исследования с помощью биосенсора на эффекте поверхностного плазмонного резонанса [20] цинкзависимых взаимодействий Аβ с молекулами различных классов, включая белки, пептиды, нуклеиновые кислоты и низкомолекулярные соединения [21–27]. С использованием этого подхода уже установлены белки-партнеры (из цитозольной фракции клеток SK-N-SH) интактного Аβ(1–16) [28]. Получены существенные экспериментальные свидетельства критического влияния “Английской” (H6R) и “Тайваньской” (D7H) мутаций, а также фосфорилирования Ser8 и изомеризации Asp7 на структурно-функциональные свойства металлсвязывающего домена Аβ [4, 15, 19, 23, 29–35]. В настоящей работе методом прямого молекулярного фишинга [36, 37] показано как эти мутации и модификации влияют на репертуар потенциальных цинкзависимых белков-партнеров Аβ(1–16) из цитозольной фракции клеток SK-N-SH.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Синтетические пептидные аналоги металлсвязывающего домена интактного Аβ и четырех его изоформ (табл. 1) получены от “Bioreptide Co., LLC” (США). На С-конце пептидов находится тетраглицилцистеин (-GGGGC).

Цитозольную фракцию клеток получали по следующей методике. Клетки нейроblastомы человека SK-N-SH культивировали на среде RPMI-1640 (“Invitrogen”, США), содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (“Invitrogen”), 2 мМ

глутамин (“ПанЭко”, Россия), 100 Ед./мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина (“ПанЭко”), при температуре 37°C в атмосфере 5% CO₂. Перед лизированием клетки осаждали центрифугированием в течение 10 мин при 100 g и промывали в PBS-буфере. Для лизирования 1 млн. клеток брали 30 мкл RIPA-буфера (25 мМ Трис-НСl pH 7.6, 150 мМ NaCl, 1% NP-40, 1% дезоксихолата натрия, 0.1% додецилсульфата натрия, 0.2 мМ PMSF, ингибиторы протеаз – 1 таблетка на 10 мл буфера). Полученную суспензию клеток инкубировали в течение 1 ч при +4°C и постоянном перемешивании. Лизат клеток центрифугировали в течение 10 мин при 16000 g. Отбирали супернатант (лизат цитозольной фракции клеток SK-N-SH) и определяли в нем концентрацию белка по методу Лоури.

Анализ методом поверхностного плазмонного резонанса выполняли на оптическом биосенсоре Biacore 3000 (“GE Healthcare”, США) при 25°C. Пептид Аβ(1–16) и его модифицированные варианты ковалентно иммобилизовали на поверхности рабочих каналов четырехканальных чипов CM5 через сульфгидрильные группы С-концевого цистеина (-GGGGC) по ранее использованному протоколу [28]. Для каждого чипа первый канал, свободный от иммобилизованных пептидных лигандов, использовали в качестве контрольного. Результирующий сигнал биосенсора представлял собой разницу сигналов рабочего и контрольного каналов (коррекция вклада неспецифического связывания с поверхностью чипа). В качестве рабочего буфера использовали 50 мМ HEPES (pH 6.8), содержащий 100 мкМ ZnCl₂ (Буфер А). Лизат цитозольной фракции клеток SK-N-SH, разведенный буфером А в 40 раз, вводили в биосенсор течение 5 мин при скорости потока 10 мкл/мин (*n* = 5).

Подготовку аффинного сорбента выполняли по следующему протоколу. Каждый из пептидов, соответствующих металлсвязывающему домену исследуемых изоформ Аβ (табл. 1), иммобилизовали через сульфгидрильные группы С-концевого цистеина (-GGGGC) на инертный сорбент

Таблица 1. Синтетические пептидные аналоги металлсвязывающего домена изоформ Аβ, использованные в работе

Обозначение	Аминокислотная последовательность	Описание
Аβ(1–16)	DAEFRHDSGYEVHHQK-GGGGC	Интактный Аβ(1–16)
pS8-Аβ(1–16)	DAEFRHDP ^S SGYEVHHQK-GGGGC	Аβ(1–16) с фосфорилированным остатком Ser8
D7H-Аβ(1–16)	DAEFRHNSGYEVHHQK-GGGGC	Аβ(1–16) с заменой Asp7 на His (“Тайваньская” мутация)
isoD7-pS8-Аβ(1–16)	DAEFRH[isoD] ^p SGYEVHHQK-GGGGC	Аβ(1–16) с изомеризованным Asp 7 и фосфорилированным Ser8
H6R-Аβ(1–16)	DAEFRRDSGYEVHHQK-GGGGC	Аβ(1–16) с заменой His6 на Arg (“Английская” мутация)

тиол-сефарозу 4В (“GE Healthcare”) согласно протоколу компании-производителя. Не прореагировавшие с пептидом 2-тиопиридилные группы сорбента инактивировали 5 мМ раствором 2-меркаптоэтанола в течение 5 мин. Уровень иммобилизации пептидов (около 3.5 мг на 1 г сухого сорбента) оценивали спектрофотометрически на мультимодульном планшетном ридере ClarioStar (“BMG LABTECH”, Россия) при длине волны 343 нм согласно протоколу компании-производителя сорбента. Контрольный сорбент (без иммобилизации пептидов) готовили аналогично, но без добавления пептидов. Далее суспензию аффинного (или контрольного) сорбента помещали в микроколону с внутренним объемом 150 мкл и длиной 12 см, которую устанавливали в хроматограф АКТА Purifier 10 (“GE Healthcare”).

Лизат цитозольной фракции клеток SK-N-SH, разведенный буфером А до конечной концентрации общего белка 0.5 мг/мл, пропускали через микроколону с сорбентом в течение 80 мин при скорости потока 50 мкл/мин. Элюирование белков лизата, аффинно связавшихся с иммобилизованными на сорбенте пептидами А β , выполняли буфером Б, содержащим 10 мМ HEPES (pH 7.4), 150 мМ NaCl, 50 мМ 2-меркаптоэтанола, 3 мМ EDTA, 0.05% Tween 20, в течение 100 мин при скорости потока 50 мкл/мин. В дополнительных экспериментах по аффинному выделению белков лизата, связавших пептиды А β , иммобилизованные на сорбенте, использовали буфер А без добавления ионов цинка (ZnCl₂), т.е. 50 мМ HEPES (pH 6.8). Содержание общего белка в элюатах оценивали спектрофотометрически по методу Брэдфорда при длине волны 595 нм на мультимодульном планшетном ридере ClarioStar. Трипсинолиз белковых проб осуществляли по методу FASP (от англ. Filter-Aided Sample Preparation) [38]. LC-MS/MS-анализ образцов триптического гидролизата выполняли с помощью хроматографа Agilent 1200 и масс-детектора Agilent серии 6300 с ионной ловушкой Ion Trap LC/MS фирмы “Agilent Technologies” (США) по протоколу [28], а также на масс-спектрометре micrOTOF-Q II (“Bruker Daltonik GmbH”, Германия) по методике [39, 40]. Масс-спектры обрабатывали с помощью программы Mascot и базы данных SwissProt. В число достоверно обнаруженных включали белки, идентифицированные не менее 2 раз из 3 со статистической значимостью $p < 0.01$ и Mascot Score > 50 .

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее мы установили, что 13 белков из цитозольной фракции клеток SK-N-SH образуют специфические нековалентные цинкзависимые комплексы с синтетическим аналогом пептида А β (1–16), иммобилизованным (через С-концевой линкер -Gly-

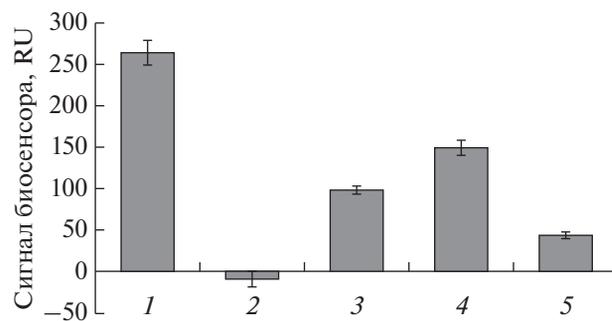


Рис. 1. Сигналы связывания белкового материала лизата цитозольной фракции клеток нейробластомы SK-N-SH с иммобилизованными в каналах биосенсора пептидами А β (1–16) (1), H6R-A β (1–16) (2), pS8-A β (1–16) (3), D7H-A β (1–16) (4), isoD7-pS8-A β (1–16) (5) в присутствии ионов цинка. Планки погрешностей обозначают значения стандартного отклонения (SD) от средней величины (m); $m \pm SD$, ($n = 5$).

Gly-Gly-Gly-Cys) на аффинной колонке [28] (табл. 2). В настоящей работе А β (1–16) использовали в качестве положительного контроля при количественном анализе связывания белков цитозольной фракции клеток SK-N-SH со следующими металлсвязывающими доменами: H6R-A β (1–16), pS8-A β (1–16), D7H-A β (1–16) и isoD7-pS8-A β (1–16) (табл. 1). Все пять пептидов были иммобилизованы на оптических чипах биосенсора до уровней 1000 ± 50 RU (1 ± 0.05 нг/мм²).

Образцы лизата цитозольной фракции клеток SK-N-SH вводили в измерительную ячейку биосенсора в качестве аналита. В отсутствие ионов цинка в рабочем буфере специфическое связывание белков лизата со всеми иммобилизованными пептидами не наблюдалось. Этот результат совпадает с данными, полученными ранее для А β (1–16) [28]. В присутствии 100 мкМ ионов цинка общее количество специфически связавшихся цитозольных белков возрастало в ряду: H6R-A β (1–16) (практически полное отсутствие связывания) → isoD7-pS8-A β (1–16) → pS8-A β (1–16) → D7H-A β (1–16) → А β (1–16) → А β (1–16) (рис. 1). Эти данные позволили предположить, что H6R-A β (1–16), pS8-A β (1–16), D7H-A β (1–16) и isoD7-pS8-A β (1–16) могут использоваться в качестве аффинных “наживок” для препаративного выделения белков лизата, специфически связывающихся в присутствии ионов цинка, с их последующей масс-спектрометрической идентификацией.

Показано фактическое отсутствие белков (концентрация общего белка ≤ 1 мкг/мл) в элюатах с аффинных сорбентов в отсутствие ионов цинка в рабочем буфере при хроматографии лизата. Напротив, в присутствии ионов цинка концентрация общего белка в элюатах была ≥ 25 мкг/мл для pS8-A β (1–16) и D7H-A β (1–16), в то же время для H6R-A β (1–16) и isoD7-pS8-A β (1–16) элюат не со-

Таблица 2. Белки, аффинно выделенные из лизата цитозольной фракции клеток человека SK-N-SH на сорбентах с ковалентно иммобилизованными пептидами: A β (1–16), pS8-A β (1–16) и D7H-A β (1–16)

Белок	Uniprot ID	Субклеточная локализация	Пептид		
			A β (1–16)*	pS8-A β (1–16)	D7H-A β (1–16)
Фактор элонгации 1-альфа 1	P68104	Ядро, ядрышко, цитозоль, цитоскелет, плазматическая мембрана, кортикальный актиновый цитоскелет		+	+
Белок теплового шока 1A/1B 70 кДа	P0DMV8	Ядро, цитозоль, центросома, цитоскелет		+	+
Белок 1, подобный белку теплового шока 70 кДа	P34931	Цитозоль		+	+
Белок 6 теплового шока 70 кДа	P17066	Цитозоль, цитоскелет		+	+
Белок, родственник белку теплового шока 71 кДа	P11142	Ядро, цитозоль, экзосома		+	+
Белок теплового шока HSP 90-бета	P08238	Ядро, цитозоль, внеклеточный матрикс		+	+
Белок 2, родственник белку теплового шока 70 кДа	P54652	Цитозоль		+	+
Вероятный белок 7 теплового шока 70 кДа	P48741	Нет данных		+	+
Вероятный белок 4 теплового шока HSP 90-бета	Q58FF6	Нет данных		+	+
Белки 14-3-3 изоформа эпсилон	P62258	Ядро, цитозоль	+		
Альфа-енолаза	P06733	Цитозоль, плазматическая мембрана	+		
Аннексин A2	P07355	Экзосома, эндосома, лизосома, клеточная поверхность, цитозоль	+		
Субъединица альфа митохондриальной АТФ-синтазы	P25705	Плазматическая мембрана, митохондрии	+		
Белок 2, подобный бета-актину	Q562R1	Нет данных	+		
Фактор элонгации 1-гамма	P26641	Цитозоль	+		
Белок теплового шока HSP 90-альфа	P07900	Цитозоль	+		
Вероятный белок, подобный аннексину A2	A6NMY6	Нет данных	+		
Вероятный белок 3, подобный бета-актину	Q9BYX7	Нет данных	+		
Вероятный белок 2 теплового шока HSP 90-бета	Q58FF8	Нет данных	+		
Вероятный белок A2 теплового шока HSP 90-альфа	Q14568	Нет данных	+		
Вероятный белок A4 теплового шока HSP 90-альфа	Q58FG1	Нет данных	+		
Субъединица гамма белка 1 Т-комплекса	P49368	Микротрубочки, плазматическая мембрана, шаперониновый Т-комплекс	+		
Регулируемый глюкозой белок 78 кДа	P11021	Цитозоль, митохондрии, эндоплазматический ретикулум		+	

Таблица 2. Окончание

Белок	Uniprot ID	Субклеточная локализация	Пептид		
			A β (1–16)*	pS8-A β (1–16)	D7H-A β (1–16)
Альфа-актин скелетной мышцы	P68133	Актиновые филаменты, цитоскелет, саркомеры, стрессовые волокна		+	
Фактор элонгации 1 альфа-2	Q05639	Цитозоль		+	
Галектин-1	P09382	Цитозоль		+	
Вероятный белок 3 теплового шока HSP 90-бета	Q58FF7	Нет данных			+
Тубулин бета	P07437	Микротрубочки, цитозоль, цитоскелет			+
Тубулин бета-1	Q9N4B7	Цитозоль			+
Тубулин бета-3	Q13509	Микротрубочки			+
Тубулин бета-4А	P04350	Микротрубочки, цитоскелет, аксонема			+
Тубулин бета-4Б	P68371	Микротрубочки, цитоскелет			+
Тубулин бета-6	Q9BUF5	Микротрубочки			+
Тубулин бета-8	Q3ZCM7	Веретено деления			+

* По материалам [28].

Примечание. Связывание белка с соответствующим пептидом обозначено символом “+”.

держал достаточных для анализа количеств белкового материала. Таким образом, ионы цинка являются необходимыми медиаторами взаимодействий цитозольных белков с pS8-A β (1–16) и D7H-A β (1–16).

В табл. 2 приведены данные LC-MS/MS-анализа белков цитозольной фракции клеток SK-N-SH, которые специфически связываются в присутствии ионов цинка с pS8-A β (1–16) и D7H-A β (1–16). Сравнение полученных результатов с данными для A β (1–16) из работы [28] показывает, что в идентичных экспериментальных условиях pS8-A β (1–16) и D7H-A β (1–16) не связываются ни с одним из белков-партнеров A β (1–16). При этом pS8-A β (1–16) и D7H-A β (1–16) имеют девять общих партнеров, и все они представляют собой различные варианты белков теплового шока. Кроме того, D7H-A β (1–16) специфически связывается с еще одним из белков теплового шока и с семью различными вариантами тубулинов, а pS8-A β (1–16) – с четырьмя индивидуальными белками. Среди 13 партнеров A β (1–16) были также четыре белка теплового шока и два варианта бета-актина. Все 13 белков без исключения фигурируют во многих публикациях как потенциальные участники патологических процессов при БА [28]. Полученные данные свидетельствуют о потенциальной способности металлсвязывающих доменов интактного A β и двух его изоформ – с “Тайваньской” (D7H) мутацией и с фосфорилированным Ser8 – взаимодействовать в цинкзависимой манере с белками, перечисленными в табл. 2. Однако

такие взаимодействия требуют дальнейшей валидации независимыми методами.

Интересно, что в присутствии ионов цинка H6R-A β (1–16) и isoD7-pS8-A β (1–16) не связывались с цитозольными белками в отличие от pS8-A β (1–16) и D7H-A β (1–16). Причины этого могут быть связаны со структурирующей ролью ионов цинка в укладке основной пептидной цепи металлсвязывающего домена A β . Известно, что при связывании иона цинка домен 1–16 приобретает компактную пространственную конформацию, в центре которой находится ион цинка, хелатируемый боковыми группами His6, Glu11, His13 и His14 [10, 41]. Мутация D7H может делать эту структуру еще более стабильной и компактной [32], а мутация H6R, напротив, переводит домен в “развернутую” конформацию [4]. Фосфорилирование Ser8 не влияет на структуру цинк-связанного домена [23]. Особый интерес представляет роль двойной химической модификации домена – изомеризации Asp7 и фосфорилирования Ser8: в таком домене, isoD7-pS8-A β (1–16), может существенно измениться координационная сфера иона цинка и, соответственно, конформация домена [34]. С учетом недавно опубликованных данных [33, 34] можно предположить, что A β с фосфорилированным Ser8 (pS8-A β) участвует в нормальных физиологических процессах, а связанная со спонтанным белковым старением изомеризация Asp7 [19] аннулирует физиологические функции pS8-A β , но не превращает эту молекулу в зародыш аномальной агрегации эндогенного A β .

В заключение следует отметить, что с помощью поверхностного плазмонного резонанса удалось выявить количественную вариацию в цинк-зависимом связывании белков лизата цитозольной фракции клеток SK-N-SH с интактным A β (1–16) и его четырьмя модифицированными вариантами: H6R-A β (1–16), pS8-A β (1–16), D7H-A β (1–16) и isoD7-pS8-A β (1–16). Совмещенным методом аффинного выделения и масс-спектрометрической идентификации определен репертуар потенциальных белков, которые в цинкзависимой манере образуют нековалентные комплексы с металлсвязывающими доменами двух изоформ бета-амилоида: A β с фосфорилированным Ser8 и A β с “Тайваньской” (D7H) мутацией. Полученные нами результаты впервые показали критическое влияние аминокислотных мутаций и химических модификаций на способность металлсвязывающего домена A β участвовать в цинкзависимых белок-белковых взаимодействиях.

Работы с клетками нейробластомы и аффинное выделение белковых партнеров из клеточных лизатов выполнены при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 19-74-30007). Масс-спектрометрическая идентификация белковых партнеров выполнена с использованием ресурсов ЦКП “Протеом человека” Института биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича (финансовая поддержка в рамках соглашения № 075-15-2019-1502 от 5 сентября 2019 года, Минобрнаука).

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов исследований.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Masters C.L., Selkoe D.J. (2012) Biochemistry of amyloid β -protein and amyloid deposits in Alzheimer disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. **2**(6), a006262–a006262.
- Golde T.E., DeKosky S.T., Galasko D. (2018) Alzheimer's disease: The right drug, the right time. *Science*. **362**(6420), 1250–1251.
- Friedlich A.L., Lee J.Y., van Groen T., Cherny R.A., Volitakis I., Cole T.B., Palmiter R.D., Koh J.Y., Bush A.I. (2004) Neuronal zinc exchange with the blood vessel wall promotes cerebral amyloid angiopathy in an animal model of Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* **24**(13), 3453–3459.
- Istrate A.N., Kozin S.A., Zhokhov S.S., Mantsyzov A.B., Kechko O.I., Pastore A., Makarov A.A., Polshakov V.I. (2016) Interplay of histidine residues of the Alzheimer's disease A β peptide governs its Zn-induced oligomerization. *Sci. Repts.* **6**, 21734.
- Stewart K.L., Radford S.E. (2017) Amyloid plaques beyond A β : a survey of the diverse modulators of amyloid aggregation. *Biophys. Rev.* **9**(4), 405–419.
- Kozin S.A., Барыкин Е.П., Миткевич В.А., Макаров А.А. (2018) Антиамилоидная терапия болезни Альцгеймера: современное состояние и перспективы. *Биохимия*. **83**, 1331–1342.
- Kozin S.A., Макаров А.А. (2019) Конвергенция концепций патогенеза болезни Альцгеймера. *Молекуляр. биология*. **53**(6), 1020–1028.
- Armiento V., Spanopoulou A., Kapurniotu A. (2020) Peptide-based molecular strategies to interfere with protein misfolding, aggregation, and cell degeneration. *Angew. Chem. (Int. Ed. Engl.)*. **59**(9), 3372–3384.
- Kozin S.A., Zirah S., Rebuffat S., Hoa G.H., Debey P. (2001) Zinc binding to Alzheimer's A β (1–16) peptide results in stable soluble complex. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **285**(4), 959–964.
- Zirah S., Kozin S.A., Mazur A.K., Blond A., Cheminant M., Ségalas-Milazzo I., Debey P., Rebuffat S. (2006) Structural changes of region 1–16 of the Alzheimer disease amyloid β -peptide upon zinc binding and *in vitro* aging. *J. Biol. Chem.* **281**(4), 2151–2161.
- Faller P., Hureau C. (2009) Bioinorganic chemistry of copper and zinc ions coordinated to amyloid-beta peptide. *Dalton Trans.* **7**, 1080–1094.
- Istrate A.N., Tsvetkov P.O., Mantsyzov A.B., Kulikova A.A., Kozin S.A., Makarov A.A., Polshakov V.I. (2012) NMR solution structure of rat A β (1–16): toward understanding the mechanism of rats' resistance to Alzheimer's disease. *Biophys. J.* **102**(1), 136–143.
- Попов И. А., Индейкина М. И., Кононихин А. С., Стародубцев, Н. Л., Козин С. А., Макаров А. А. & Николаев Е. Н. (2013) Определение минимального цинк-связывающего центра природных изоформ домена 1–16 бета-амилоида методом ESI-MS, *Молекуляр. биология*. **47**(6), 498–504.
- Indeykina M., Kononikhin A., Popov I., Kostyukovich Y., Kulikova A., Mitkevich V., Kozin S., Makarov A., Nikolaev E. (2016) Localization of zinc binding sites of Ab1–16 with English mutation during formation of monomers and dimers with zinc. *Internat. J. Mass Spectrometry*. **409**, 67–72.
- Kulikova A.A., Cheglakov I.B., Kukharsky M.S., Ovchinnikov R.K., Kozin S.A., Makarov A.A. (2016) Intracerebral injection of metal-binding domain of abeta comprising the isomerized asp7 increases the amyloid burden in transgenic mice. *Neurotox. Res.* **29**(4), 551–557.
- Bourdenx M., Dovero S., Thiolat M.L., Bezaud E., Dehay B. (2017) Lack of spontaneous age-related brain pathology in *Octodon degus*: a reappraisal of the model. *Sci. Repts.* **7**, 45831.
- Steffen J., Krohn M., Paarmann K., Schwitlick C., Brüning T., Marreiros R., Müller-Schiffmann A., Korth C., Braun K., Pahnke J. (2016) Revisiting rodent models: *Octodon degus* as Alzheimer's disease model? *Acta Neuropathologica Commun.* **4**(1), 91.
- Barykin E.P., Mitkevich V.A., Kozin S.A., Makarov A.A. (2017) Amyloid beta modification: a key to the sporadic Alzheimer's disease? *Front. Gene.* **8**, 58.
- Kozin S.A., Mitkevich V.A., Makarov A.A. (2016) Amyloid- β containing isoaspartate 7 as potential biomarker and drug target in Alzheimer's disease. *Mendeleev Commun.* **26**(4), 269–275.

20. Иванов А.С. (2012) Исследование межмолекулярных взаимодействий с помощью оптических биосенсоров, работающих на эффекте поверхностного плазмонного резонанса. *Соврем. техн. мед.* **4**, 142–153.
21. Kozin S.A., Mezentsev Y.V., Kulikova A.A., Indeykina M.I., Golovin A.V., Ivanov A.S., Tsvetkov P.O., Makarov A.A. (2011) Zinc-induced dimerization of the amyloid- β metal-binding domain 1–16 is mediated by residues 11–14. *Mol. BioSystems*. **7**(4), 1053–1055.
22. Khmeleva S.A., Mezentsev Y.V., Kozin S.A., Tsvetkov P.O., Ivanov A.S., Bodoev N.V., Makarov A.A., Radko S.P. (2013) Zinc-induced interaction of the metal-binding domain of amyloid-beta peptide with DNA. *J. Alzheimer's Dis.* **36**(4), 633–636.
23. Kulikova A.A., Tsvetkov P.O., Indeykina M.I., Popov I.A., Zhokhov S.S., Golovin A.V., Polshakov V.I., Kozin S.A., Nudler E., Makarov A.A. (2014) Phosphorylation of Ser8 promotes zinc-induced dimerization of the amyloid-beta metal-binding domain. *Mol. Biosyst.* **10**(10), 2590–2596.
24. Хмельёва С.А., Мезенцев Ю.В., Козин С.А., Митькевич В.А., Медведев А.Е., Иванов А.С., Бодоев Н.В., Макаров А.А., Радко С.П. (2015) Влияние мутаций и модификаций аминокислотных остатков на цинкиндуктированное взаимодействие металлсвязывающего домена β -амилоида с ДНК. *Молекуляр. биология.* **49**(3), 507–514.
25. Khmeleva S.A., Radko S.P., Kozin S.A., Kiseleva Y.Y., Mezentsev Y.V., Mitkevich V.A., Kurbatov L.K., Ivanov A.S., Makarov A.A. (2016) Zinc-mediated binding of nucleic acids to amyloid-beta aggregates: role of histidine residues. *J. Alzheimers Dis.* **54**(2), 809–819.
26. Mezentsev Y.V., Medvedev A.E., Kechko O.I., Makarov A.A., Ivanov A.S., Mantsyzov A.B., Kozin S.A. (2016) Zinc-induced heterodimer formation between metal-binding domains of intact and naturally modified amyloid-beta species: implication to amyloid seeding in Alzheimer's disease? *J. Biomol. Struct. Dyn.* **34**(11), 2317–2326.
27. Козин С.А., Польшаков В.И., Мезенцев Ю.В., Иванов А.С., Жохов С.С., Юринская М.М., Винокуров М.Г., Макаров А.А., Митькевич В.А. (2018) Эналаприлат ингибирует цинк-зависимую олигомеризацию металл-связывающего домена изоформ бета-амилоида и защищает клетки нейроblastомы человека от их токсического действия. *Молекуляр. биология.* **52**(4), 683–691.
28. Иванов А.С., Ершов П.В., Мольнар А.А., Мезенцев Ю.В., Калужский Л.А., Яблоков Е.О., Флоринская А.В., Гнеденко О.В., Медведев А.Е., Козин С.А., Митькевич В.А., Макаров А.А., Гилеп А.А., Лушчик А.Я., Гайдукевич И.В., Усанов С.А. (2016) Прямой молекулярный фишинг в исследовании молекулярных партнеров белок-белковых и белок-пептидных взаимодействий. *Биоорг. химия.* **42**(1), 18–27.
29. Kozin S.A., Cheglakov I.B., Ovsepyan A.A., Telegin G.B., Tsvetkov P.O., Lisitsa A.V., Makarov A.A. (2013) Peripherally applied synthetic peptide isoAsp7-A β (1–42) triggers cerebral β -amyloidosis. *Neurotoxicity Res.* **24**(3), 370–376.
30. Mitkevich V.A., Petrushanko I.Y., Yegorov Y.E., Simonenko O.V., Vishnyakova K.S., Kulikova A.A., Tsvetkov P.O., Makarov A.A., Kozin S.A. (2013) Isomerization of Asp7 leads to increased toxic effect of amyloid- β 42 on human neuronal cells. *Cell Death Dis.* **4**, e939.
31. Kozin S.A., Kulikova A.A., Istrate A.N., Tsvetkov P.O., Zhokhov S.S., Mezentsev Y.V., Kechko O.I., Ivanov A.S., Polshakov V.I., Makarov A.A. (2015) The English (H6R) familial Alzheimer's disease mutation facilitates zinc-induced dimerization of the amyloid- β metal-binding domain. *Metallomics*. **7**(3), 422–425.
32. Polshakov V.I., Mantsyzov A.B., Kozin S.A., Adzhubei A.A., Zhokhov S.S., van Beek W., Kulikova A.A., Indeykina M.I., Mitkevich V.A., Makarov A.A. (2017) A binuclear zinc interaction fold discovered in the homodimer of Alzheimer's amyloid-beta fragment with taiwanese mutation D7H. *Angew. Chem. (Int. Ed. Engl.)*. **56**(39), 11734–11739.
33. Barykin E.P., Petrushanko I.Y., Kozin S.A., Telegin G.B., Chernov A.S., Lopina O.D., Radko S.P., Mitkevich V.A., Makarov A.A. (2018) Phosphorylation of the amyloid-beta peptide inhibits zinc-dependent aggregation, prevents Na,K-ATPase inhibition, and reduces cerebral plaque deposition. *Front. Mol. Neurosci.* **11**, 302.
34. Kozin S.A., Barykin E.P., Telegin G.B., Chernov A.S., Adzhubei A.A., Radko S.P., Mitkevich V.A., Makarov A.A. (2018) Intravenously injected amyloid- β peptide with isomerized Asp7 and phosphorylated er8 residues inhibits cerebral β -amyloidosis in A β PP/PS1 transgenic mice model of Alzheimer's disease. *Front. Neurosci.* **12**, 518.
35. Zatsypina O.G., Kechko O.I., Mitkevich V.A., Kozin S.A., Yurinskaya M.M., Vinokurov M.G., Serebryakova M.V., Rezvykh A.P., Evgen'ev M.B., Makarov A.A. (2018) Amyloid- β with isomerized Asp7 cytotoxicity is coupled to protein phosphorylation. *Sci. Repts.* **8**(1), 3518.
36. Ershov P.V., Mezentsev Y.V., Kopylov A.T., Yablokov E.O., Svirid A.V., Lushchik A.Y., Kaluzhskiy L.A., Gilep A.A., Usanov S.A., Medvedev A.E., Ivanov A.S. (2019) Affinity isolation and mass spectrometry identification of prostacyclin synthase (PTGIS) subinteractome. *Biology.* **8**(2), 49.
37. Florinskaya A., Ershov P., Mezentsev Y., Kaluzhskiy L., Yablokov E., Medvedev A., Ivanov A. (2018) SPR biosensors in direct molecular fishing: implications for protein interactomics. *Sensors (Basel)*. **18**(5), 1616.
38. Wiśniewski J.R., Zougman A., Nagaraj N., Mann M. (2009) Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nat. Methods*. **6**(5), 359–362.
39. Hao P., Ren Y., Xie Y. (2009) Label-free relative quantification method for low-abundance glycoproteins in human serum by micrOTOF-Q. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **877**(16–17), 1657–1666.
40. Purushothaman A.K., Pemiah B. (2014) Ultra high performance liquid chromatography-ultraviolet-electrospray ionization-micrOTOF-Q II analysis of flavonoid fractions from *Jatropha tanjorensis*. *Pharmacogn. Mag.* **10**(Suppl. 3), S472–S479.
41. Tsvetkov P.O., Kulikova A.A., Golovin A.V., Tkachev Y.V., Archakov A.I., Kozin S.A., Makarov A.A. (2010) Minimal Zn²⁺ binding site of amyloid- β . *Biophys. J.* **99**(10), L84–L86.

DIRECT MOLECULAR FISHING OF ZINC-DEPENDENT PROTEIN PARTNERS OF AMYLOID-BETA 1–16 WITH THE TAIWAN (D7H) MUTATION AND WITH THE PHOSPHORYLATED Ser8 RESIDUE

P. V. Ershov¹, Yu. V. Mezentsev¹, E. O. Yablokov¹, L. A. Kaluzgskiy¹, A. S. Ivanov¹, N. V. Gnuchev², V. A. Mitkevich², A. A. Makarov², and S. A. Kozin^{2,*}

¹*Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry, Moscow, 119121 Russia*

²*Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia*

**e-mail: kozinsa@gmail.com*

We previously showed that the metal-binding domain 1–16 of the intact amyloid-beta ($A\beta$) is involved in interactions with a number of proteins from the cytosolic fraction of SK-N-SH human neuroblastoma cells in a zinc-dependent manner only. It is known that hereditary mutations in the $A\beta$ metal-binding domain ($A\beta(1-16)$), accelerating the development of Alzheimer's disease, as well as post-translational modifications of amino acid residues can significantly affect the domain's structure in the presence of zinc ions. In this work, using the molecular fishing methodology for $A\beta(1-16)$ isoforms with the Taiwanese mutation (D7H) and the phosphorylated Ser8 residue, proteins from the cytosol of SK-N-SH cells were established that are able to form with these domains zinc-dependent non-covalent complexes. The partner proteins identified for these isoforms differed from those for intact $A\beta(1-16)$. At the same time, the $A\beta(1-16)$ isoform with the English mutation (H6R) and the $A\beta(1-16)$ isoform containing both the isomerized Asp7 residue and phosphorylated Ser8 residue did not interact with cytosolic proteins. The results are useful for developing methods for rational modulation of protein–protein interactions involving natural isoforms of beta-amyloid, and also indicate the possible role of beta-amyloid with phosphorylated Ser8 as a molecule involved in normal physiological processes.

Keywords: Alzheimer's disease, amyloid-beta, isoforms, metal-binding domain, zinc, protein-protein interactions, SK-N-SH cells