

*На правах рукописи*

ХМЕЛЁВА СВЕТЛАНА АЛЕКСАНДРОВНА

**ЦИНК-ИНДУЦИРОВАННОЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ АМИЛОИДА- $\beta$   
С НУКЛЕИНОВЫМИ КИСЛОТАМИ**

03.01.04 – Биохимия

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва – 2016

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении  
«Научно- исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича»

**Научные**  
**руководители:** доктор химических наук, профессор  
**Бодоев Николай Васильевич**

кандидат биологических наук  
**Радько Сергей Павлович**

**Официальные**  
**оппоненты:** **Муронец Владимир Израилевич**  
доктор биологических наук, профессор, Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», отдел биохимии животной клетки, руководитель отдела

**Кушников Виталий Владимирович**  
доктор биологических наук, ФГУ «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», лаборатория молекулярной генетики, ведущий научный сотрудник

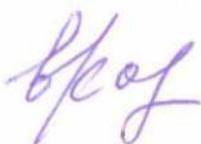
**Ведущая**  
**организация:** Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук»

Защита состоится 18 мая 2017 года в 11 часов на заседании диссертационного совета Д 001.010.01 на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича» (ИБМХ) по адресу: 119121 Москва, улица Погодинская, дом 10, стр.8.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИБМХ и на сайте [www.ibmc.msk.ru](http://www.ibmc.msk.ru)

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2017 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
кандидат химических наук



Карпова Е.А.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы исследования** Болезнь Альцгеймера (БА) – прогрессирующее нейродегенеративное заболевание, частота встречаемости которого резко увеличивается с возрастом, начиная с 65 лет. Количество пациентов с диагнозом БА в мире постоянно растёт и сегодня составляет около 40 млн. человек ([www.alz.org](http://www.alz.org)). В Российской Федерации количество больных БА с разными стадиями развития заболевания может достигать полумиллиона человек [Белоусов и соавт., 2009]. Несмотря на значительные усилия, направленные на поиск средств лечения БА, до настоящего времени не предложено лекарства, которое могло бы существенно замедлить, остановить или предотвратить развитие данного заболевания [Han et al., 2014; Кухарский и соавт., 2015]. Как правило, стратегия поиска средств терапии БА основывается на предположениях о том, какие молекулярные события являются ключевыми для развития болезни [Carter et al., 2010; Кухарский и соавт., 2015; Maloney et al., 2016]. Именно недостаточность знаний о механизмах патогенеза БА, о молекулярных патогенах болезни и мишенях их воздействия в значительной степени определяет сегодня неудачи поиска средств лечения данного заболевания [Han et al., 2014]. Это делает актуальным дальнейшее углубление знаний о молекулярных механизмах, лежащих в основе БА, с целью корректировки стратегий поиска терапевтических средств лечения данного заболевания.

**Степень разработанности темы исследования** Согласно ведущей гипотезе возникновения и развития БА, известной как «амилоидный каскад», ключевым событием в возникновении и развитии болезни является переход амилоида- $\beta$  (А $\beta$ ; пептид, представленный у человека различными изоформами длиной от 38 до 42 аминокислотных остатков) из мономерного состояния в агрегированное [Haass & Selkoe, 2007]. *In vivo* процесс агрегации заканчивается формированием в паренхиме головного мозга "сенильных бляшек" – отложений округлой формы, состоящих из фибриллярного А $\beta$  и являющихся отличительным признаком БА. В последние десятилетия всё возрастающее внимание привлекает роль внутриклеточного амилоида- $\beta$  (вкА $\beta$ ) в патогенезе БА [Gouras et al., 2010; Wirths & Bayer, 2012; Ji et al., 2016]. Сегодня существуют многочисленные работы, выполненные на трансгенных мышах и крысах, которые демонстрируют прямую связь между накоплением вкА $\beta$  в нейронах и их гибелью (суммированы, например, в [Cuello & Canneva, 2008; Wirths & Bayer, 2012]).

Предполагается, что вкА $\beta$  может вызывать гибель нейронов, взаимодействуя с геномной ДНК, что приводит к нарушению её нормальной экспрессии [Jimenez, 2010; Camero et al., 2013]. Присутствие вкА $\beta$  в клеточном ядре было показано в ряде исследований [Johnstone et al., 1996; Buckig et al., 2002; Ohyaigi et al., 2005; Bailey et al., 2011; Barucker et al., 2014]. Известно, что в условиях *in vitro* А $\beta$  способен взаимодействовать с ДНК [Ahn et al., 2000; Hegde et al., 2004; Ohyaigi et al., 2005; Yu et al., 2007; Barrantes et al., 2007; Geng et al., 2010;

Barrantes et al., 2012; Maloney et al., 2011; Gupta et al., 2013; Camero et al., 2013], причем именно агрегаты Аβ, но не его мономерная форма, вовлечены в это взаимодействие [Ahn et al., 2000; Barrantes et al., 2007]. Известно также, что агрегаты Аβ способны взаимодействовать с молекулами РНК [Ahn et al., 2000] и, таким образом, агрегаты Аβ, локализованные в цитоплазме перикариона [Nagele et al., 2002], могут потенциально интерферировать с нормальным транспортом информационной РНК из ядра в цитоплазму, как это показано для ряда амилоидоподобных белковых агрегатов [Woerner et al., 2016].

Общепринято, что цинк занимает особое место в патогенезе БА [Bush & Tanzi, 2008; Faller et al., 2013]. Цинк находят в значительном количестве в сенильных бляшках [Lovell et al., 1998; Miller et al., 2006], а *in vitro* он вызывает быструю агрегацию Аβ [Faller et al., 2013]. Ионы цинка ( $Zn^{2+}$ ) образуют комплексы (со стехиометрией 1:1) с металл-связывающим доменом Аβ (*N*-концевой фрагмент Аβ, включающий аминокислотные остатки 1-16), где они координированы гистидиновыми остатками Н6, Н13 и Н14 пептида [Куликова и соавт., 2015]. Внутри нейронов концентрация цинка составляет около 250  $\mu$ М [Colvin et al., 2008]. Хотя практически весь внутриклеточный цинк ( $vcZn^{2+}$ ) связан металлотионеинами (МТ), в условиях оксидативного и/или нитрозирующего стрессов наблюдается существенное высвобождение  $vcZn^{2+}$  из комплекса с МТ, приводящее к появлению свободного цинка в клеточной цитоплазме [Cuajungco & Lees, 1998; Sensi et al., 2008]. Кроме того, нитрозирующий стресс приводит к транслокации МТ в клеточное ядро и внутриядерному высвобождению  $vcZn^{2+}$  [Spahl et al., 2003]. Таким образом, в условиях оксидативного и/или нитрозирующего стрессов, которые ассоциированы с возникновением и развитием БА [Kim et al., 2015; Togo et al., 2004], цинк может быть доступен для связывания с  $vcA\beta$ . Может ли такое связывание модулировать взаимодействие  $vcA\beta$  с ДНК и РНК, не известно. Установление факта модулирующего эффекта  $Zn^{2+}$  на взаимодействие Аβ с молекулами ДНК и РНК, а также деталей физико-химического механизма, определяющего такой моделирующий эффект, дополняют имеющиеся знания молекулярного механизма патогенеза БА и позволят выявить новые потенциальные мишени терапевтического воздействия для создания средств лечения этого тяжёлого заболевания.

**Цель и задачи исследования** Цель работы – установить, как ионы цинка влияют на взаимодействие агрегатов Аβ с нуклеиновыми кислотами (НК) *in vitro* и выяснить механизм взаимодействия. Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Установить, является ли металл-связывающий домен Аβ цинк-зависимым сайтом взаимодействия пептида с НК, используя синтетические пептиды Аβ<sub>16</sub>, моделирующие металл-связывающий домен Аβ.
2. Оценить роль электростатических взаимодействий в формировании цинк-зависимых комплексов металл-связывающего домена Аβ с биологическими полианионами, используя НК и сульфированные и несulfированные полисахариды.

3. Выяснить, как ионы цинка влияют на связывание НК с фибриллярными агрегатами синтетического полноразмерного  $\beta$ -амилоидного пептида длиной 42 аминокислотных остатка ( $A\beta_{42}$ ).
4. Провести экспериментальный анализ связывания НК с цинк-индуцированными агрегатами  $A\beta_{42}$ .
5. Используя мутантные формы пептидов  $A\beta_{42}$  и  $A\beta_{16}$ , выяснить роль остатков гистидина, участвующих в координации ионов цинка, в цинк-индуцированном взаимодействии  $\beta$ -амилоидных пептидов с НК.

**Научная новизна работы** В работе впервые проведён экспериментальный анализ взаимодействия НК с агрегатами  $A\beta_{42}$  и его мутантных форм, находящихся в комплексе с ионами цинка. Установлено, что НК связываются с цинк-индуцированными агрегатами  $A\beta_{42}$ , и что ионы цинка значительно усиливают связывание НК с предформированными фибриллярными агрегатами пептида, приводя к появлению высокоаффинных сайтов связывания на поверхности фибрилл. Впервые показано, что металл-связывающий домен  $A\beta$  может являться цинк-зависимым сайтом взаимодействия пептида с молекулами ДНК и РНК. Обнаружено, что аминокислотная замена H6R, влияющая на координацию иона цинка в металл-связывающем домене  $A\beta$ , снижает как способность пептида  $A\beta_{42}$  агрегировать под воздействием ионов цинка, так и способность металл-индуцированных агрегатов пептида связывать НК. Впервые установлено, что металл-связывающий домен  $A\beta$  способен взаимодействовать в присутствии ионов цинка с различными полианионами, что указывает на электростатическую природу взаимодействия.

**Теоретическая и практическая значимость работы** В результате выполнения диссертационной работы было установлено, что ионы цинка оказывают существенное влияние на взаимодействие агрегатов  $A\beta$  с НК. Полученные результаты создают предпосылку для исследования взаимодействия агрегатов внутриклеточного  $A\beta$  с геномной ДНК и информационной РНК нейронов в условиях нормального и нарушенного гомеостаза внутриклеточного цинка и указывают на внутриклеточный цинк как новую потенциальную мишень для терапевтического воздействия при лечении БА.

**Методология и методы исследования** В работе были использованы современные физико-химические методы исследования биологических макромолекул: биосенсорный анализ, основанный на эффекте плазмонного поверхностного резонанса, лазерная корреляционная спектроскопия (динамическое рассеяние света), флуориметрия с использованием флуоресцентных красителей, турбидиметрический и электрохимический методы, седиментационный анализ и ультрафильтрация.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Металл-связывающий домен является цинк-зависимым сайтом взаимодействия амилоида- $\beta$  с НК. Взаимодействие синтетических пептидов, модулирующих металл-связывающий домен, с НК критически зависит от координации иона цинка остатками гистидинов Н6 и Н13 пептида.
2. Взаимодействие металл-связывающего домена амилоида- $\beta$  с НК имеет электростатическую природу и предполагает формирование анион-связывающего сайта при координации иона цинка аминокислотными остатками металл-связывающего домена.
3. Ионы цинка значительно усиливают связывание молекул НК с фибриллярными агрегатами амилоида- $\beta$ , приводя к появлению высокоаффинных мест связывания на поверхности амилоидных фибрилл.
4. Цинк-индуцированные агрегаты амилоида- $\beta$  связывают молекулы НК, причём взаимодействие зависит от участия остатка гистидина Н6 пептида в координации ионов цинка.

**Апробация работы** Результаты работы докладывались на следующих научных конференциях: I Всероссийская интернет-конференция с международным участием «Биологические основы психических расстройств» (Казань, 15 – 16 мая 2012 г.), 12th International Conference AD/PD “Mechanisms, Clinical Strategies, and Promising Treatments of Neurodegenerative Diseases” (Nice, France, March 2015), Конференция молодых учёных ИБМХ (Москва, 26 мая 2015 г.), 20-я Международная Пушинская школа-конференция молодых ученых «БИОЛОГИЯ - НАУКА XXI ВЕКА» (Пушино, 18-22 апреля 2016 г.).

**Публикации** Результаты настоящей работы представлены в 10 публикациях, включающих 3 статьи в российских рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК, 2 статьи в зарубежном рецензируемом профильном журнале и 5 тезисов докладов в сборниках трудов научных конференций.

**Личное участие автора в получении научных результатов** Основные результаты диссертационной работы получены автором лично или при её непосредственном участии.

**Структура и объем диссертации** Материал диссертации изложен на 150 страницах машинописного текста, включает введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, полученные результаты и их обсуждение, заключение, выводы и список цитируемой литературы, содержащий 230 источников. Диссертация содержит 37 рисунков и 7 таблиц.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Материалы и методы исследований

В работе использовались синтетические пептиды, представленные в табл. 1, а также НК, включая синтетические олигонуклеотиды и природные ДНК- и РНК-молекулы, представленные в табл. 2.

Цинк-индуцированное взаимодействие пептида Аβ<sub>16</sub> и его изоформ с молекулами ДНК и РНК исследовали методами поверхностного плазмонного резонанса (ППР), используя оптический биосенсор Biacore-3000 (GE Healthcare), и турбидиметрии. Для иммобилизации биотинилированной ДНК использовались оптические чипы SA (GE Healthcare) с ковалентно

**Табл. 1.** Синтетические пептиды, использованные в работе. Гидрофильный металл-связывающий домен Аβ<sub>42</sub> выделен подчеркиванием. Оставшаяся часть полноразмерного пептида представляет гидрофобный домен, формирующий ядро фибриллы Аβ. Жирным шрифтом выделены замены аминокислотных остатков (а.о.), жирным курсивом – а.о., которыми Аβ крысы (rАβ) отличается от Аβ человека. Пептид с «открытыми концами» Аβ<sub>16</sub>-отк не был ацетилирован с N-конца и амидирован с C-конца в отличие от остальных транскированных пептидов Аβ, представленных в таблице.

Пептид	Аминокислотная последовательность
Аβ <sub>42</sub>	<u>DAEFRHDSGYEVHHQKL</u> VFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA
H6R-Аβ <sub>42</sub>	DAEFR <b>R</b> DSGYEVHHQKL VFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA
D7H-Аβ <sub>42</sub>	DAEFRH <b>H</b> SGYEVHHQKL VFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA
Аβ <sub>16</sub> -отк	DAEFRHDSGYEVHHQK
Аβ <sub>16</sub>	CH <sub>3</sub> CO-DAEFRHDSGYEVHHQK-NH <sub>2</sub>
H6R-Аβ <sub>16</sub>	CH <sub>3</sub> CO-DAEFR <b>R</b> DSGYEVHHQK-NH <sub>2</sub>
H6A-H13A-Аβ <sub>16</sub>	CH <sub>3</sub> CO-DAEFRADSGYEV <b>A</b> HQK-NH <sub>2</sub>
D7H-Аβ <sub>16</sub>	CH <sub>3</sub> CO-DAEFRH <b>H</b> SGYEVHHQK-NH <sub>2</sub>
D7N-Аβ <sub>16</sub>	CH <sub>3</sub> CO-DAEFRH <b>N</b> SGYEVHHQK-NH <sub>2</sub>
E11K-Аβ <sub>16</sub>	CH <sub>3</sub> CO-DAEFRHDSGY <b>K</b> VHHQK-NH <sub>2</sub>
rАβ <sub>16</sub>	CH <sub>3</sub> CO-DAEF <b>G</b> HDSG <b>F</b> EV <b>R</b> HQK-NH <sub>2</sub>
Аβ <sub>16</sub> -G4-C	CH <sub>3</sub> CO-DAEFRHDSGYEVHHQK-GGGG-C-NH <sub>2</sub>

**Табл. 2.** Нуклиновые кислоты, использованные в работе. Обозначения: FAM – карбокси-флуоресцеин; B – биотин; (dN)<sub>32</sub> – область со случайной нуклеотидной последовательностью. Комплементарные участки олигонуклеотида h-ДНК выделены подчёркиванием.

НК	Последовательность
r-ДНК	FAM-5'-GGGAGCTCAGAATAAACGCTCAA-(dN) <sub>32</sub> -TTCGACATGAGGCCCGGATC-3'
B-r-ДНК	B-5'-GGGAGCTCAGAATAAACGCTCAA-(dN) <sub>32</sub> -TTCGACATGAGGCCCGGATC-3'
p-ДНК	FAM-5'-GGGAGCTCAGAATAAACGCTCAA
h-ДНК	5'- <u>AAAAAAGCTCGCCATCAAATAGCTTTTTT</u> -3'
p(dT) <sub>75</sub>	B-5'-poly(dT) <sub>75</sub> -3'
p(dA)·p(dT)	Дуплекс B-5'-poly(dT) <sub>75</sub> -3' и 5'-poly(dA) <sub>75</sub> -3'
rd-ДНК	5'-биотинилированная двухцепочечная ДНК (ПЦР-ампификат r-ДНК)
g-ДНК	ДНК спермы лосося
rРНК	rРНК <i>E. coli</i>
c-РНК	Суммарная РНК, выделенная из культуры клеток HepG2

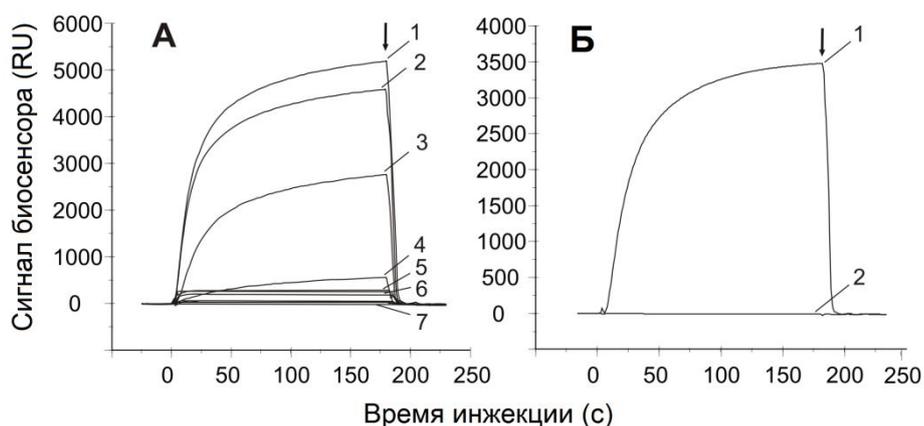
присоединёнными к поверхности чипа молекулами стрептавидина. Цинк-зависимое связывание НК с фибриллярными ( $fA\beta_{42}$ ) и цинк-индуцированными ( $ziA\beta_{42}$ ) агрегатами  $A\beta_{42}$  и его изоформ изучали с использованием седиментационного анализа и ультрафильтрации с применением флуориметрии для определения относительного количества НК в комплексе с агрегатами  $A\beta$  и колориметрического метода определения концентрации белка (BSA Protein Assay) для оценки количества пептида. Количественную детекцию НК, не меченных FAM, проводили с помощью флуоресцентного красителя SYBR Green I (Thermo Fisher Scientific). Для получения  $fA\beta_{42}$ , пептид инкубировали при нейтральных pH или в кислых условиях [Stine et al., 2011]. Мониторинг формирования  $fA\beta_{42}$  и  $ziA\beta_{42}$ , а также характеристику агрегатов проводили методом динамического рассеяния света (ДРС) на анализаторе размера частиц Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments), флуориметрическим методом с использованием красителя «тиофлавин Т» и электрохимическим методом на потенциостате-гальваностате AUTOLAB PGSTAT-12 (EcoChemie). Эксперименты проводили в HEPES-буфере с pH 7,0 (10 мМ HEPES и 50 мМ NaCl) и pH 6,8 (10 мМ HEPES с 50 мМ NaCl или с 45 мМ NaCl и 5 мМ KCl). В работе использовали сульфированные полисахариды (гликозаминогликаны (ГАГ), такие как гепарин и хондроитин сульфат (ХС), и декстран сульфаты со средней молекулярной массой 6 (ДС-6) и 40 (ДС-40) кДа), а также несulfированный полисахарид – декстран со средней молекулярной массой 5 кДа (Д-5).

## Результаты и их обсуждение

### 1. Цинк-индуцированное взаимодействие $A\beta_{16}$ с нуклеиновыми кислотами

Синтетические пептиды  $A\beta_{16}$ -отк и  $A\beta_{16}$ , чьи аминокислотные последовательности идентичны фрагменту 1-16  $A\beta$  (металл-связывающий домен), общепринято рассматривать как удобные модели для изучения взаимодействия  $A\beta$  с двухвалентными металлами [Куликова и соавт., 2015]. Комплексы  $Zn^{2+}$ - $A\beta_{16}$  хорошо охарактеризованы и были использованы как модель для исследования цинк-индуцированного взаимодействия металл-

**Рис. 1.** Зависимость сигнала ППР-биосенсора от времени пропускания раствора пептида через микроканал оптического чипа SA. Имобилизованный лиганд – rd-ДНК.  $A\beta_{16}$ -отк (40 мкМ) в HEPES-буфере (pH 6,8) с ионами двухвалентных металлов ( $Me^{2+}$ ). Нулевое время – начало инъекции раствора пептида; стрелкой

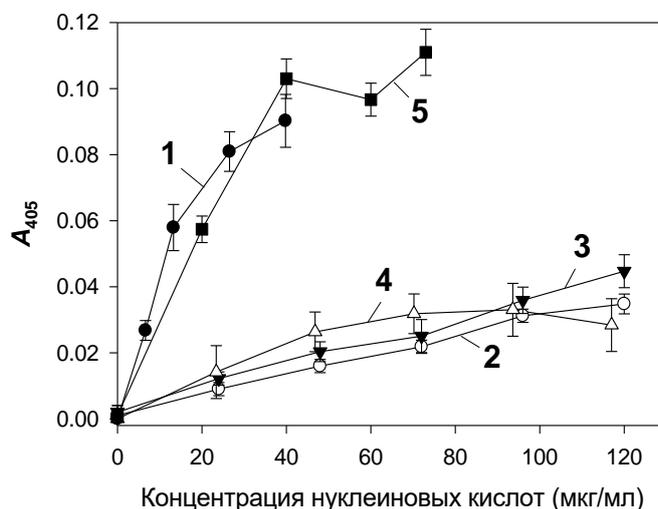


указано начало инъекции буфера без  $Me^{2+}$ . А) 1, 2, 3 и 4 –  $Zn^{2+}$  в концентрации 1, 0,75, 0,5 и 0,2 мМ; 5 – 1 мМ  $Ni^{2+}$  или  $Mn^{2+}$ ; 6 – 1 мМ  $Cu^{2+}$ ; 7 – 1 мМ  $Mg^{2+}$  или  $Ca^{2+}$ . Б)  $A\beta_{16}$ -отк (30 мкМ) в присутствии: 1 –  $Zn^{2+}$  и  $Mg^{2+}$ , 1 мМ каждого; 2 – 1 мМ  $Mg^{2+}$ .

связывающего домена Аβ с НК. На рис. 1 представлены типичные сенсограммы, отражающие процесс формирования комплексов Аβ<sub>16</sub>-отк с иммобилизованной rd-ДНК в присутствии ионов различных двухвалентных металлов. Присутствие Zn<sup>2+</sup> вызывало связывание Аβ<sub>16</sub>-отк с ДНК, что проявляется в значительном возрастании величины сигнала биосенсора, в то время как эффект Ni<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> или Ca<sup>2+</sup> отсутствовал или был несущественным. Ионы меди (Cu<sup>2+</sup>), которые также как и Zn<sup>2+</sup> могут образовывать комплексы с Аβ<sub>16</sub>-отк [Faller et al., 2013], не индуцировали связывания пептида с ДНК, сопоставимого по величине с эффектом ионов цинка. Связывание Аβ<sub>16</sub>-отк с ДНК зависит от концентрации Zn<sup>2+</sup> в растворе пептида (рис. 1А), при этом присутствие Mg<sup>2+</sup> дополнительно к Zn<sup>2+</sup> не препятствовало связыванию пептида с ДНК (рис. 1Б). Таким образом, только ионы цинка способны индуцировать эффективное связывание Аβ<sub>16</sub>-отк с ДНК.

На рис. 2 представлены зависимости мутности (оптической плотности на длине волны 405 нм, A<sub>405</sub>) смесей Аβ<sub>16</sub>/Zn<sup>2+</sup>/НК от концентрации НК. Видно, что мутность смеси возрастает с

**Рис. 2.** Оптическая плотность растворов Аβ<sub>16</sub> (150 мкМ в НЕРЕС-буфере, рН 6.8) на длине волны 405 нм (A<sub>405</sub>, мутность) в присутствии 1 мМ Zn<sup>2+</sup> и НК в различных концентрациях. 1 – h-ДНК; 2 – r-ДНК; 3 – g-ДНК; 4 – тРНК; 5 – с-РНК. Для h-ДНК, r-ДНК и тРНК использованные максимальные весовые концентрации соответствуют молярной концентрации 5 мкМ.



увеличением концентрации различных типов молекул ДНК. Кроме того, мутность смеси возрастала также и при добавлении других видов НК, а именно тРНК или с-РНК. При этом изменения мутности смеси тестированных ДНК и РНК с Zn<sup>2+</sup> (1 мМ) в отсутствие пептида не наблюдалось. Ca<sup>2+</sup> и Mg<sup>2+</sup> в концентрации 1 мМ не оказывали заметного влияния на мутность растворов Аβ<sub>16</sub>, содержащих НК в концентрациях, указанных на рис. 2 (A<sub>405</sub> < 0,004 во всех случаях). Мутность смеси указывает на появление в растворе агрегатов, образование которых однозначно свидетельствует, что ионы цинка вызывают связывание Аβ<sub>16</sub> как с ДНК, так и с РНК.

Металл-связывающий домен Аβ не имеет упорядоченной пространственной структуры в водных растворах при нейтральных рН [Zirah et al., 2006], а его суммарный заряд отрицателен (pI=5,8). При образовании комплекса с Zn<sup>2+</sup> пептид Аβ<sub>16</sub> приобретает компактную структуру, а его суммарный заряд практически равен нулю. Однако образование комплекса приводит к неравномерному распределению поверхностного заряда, характеризующемуся появлением ярко выраженных положительно и отрицательно

заряженных поверхностных областей [Zirah et al., 2006]. Положительно заряженная область комплексов  $Zn^{2+}$ - $A\beta_{16}$  и  $Zn^{2+}$ - $A\beta_{16}$ -отк может служить анион-связывающим сайтом, ответственным за наблюдаемое цинк-индуцированное взаимодействие  $A\beta_{16}$  и  $A\beta_{16}$ -отк с НК, несущими отрицательно заряженные фосфатные группы. С другой стороны, в качестве такого анион-связывающего центра может выступать сам ион цинка, координированный аминокислотными остатками пептида. В обоих случаях, цинк-индуцированное взаимодействие пептида с НК должно иметь электростатическую природу. Аминокислотные замены D7H, D7N и E11K, смещающие величины суммарного заряда изоформ  $A\beta_{16}$  в сторону положительных значений, не приводили к связыванию пептидов с НК в отсутствие  $Zn^{2+}$ , но значительно усиливали взаимодействия комплексов  $Zn^{2+}$ -пептид с молекулами ДНК и РНК, подтверждая, с одной стороны, определяющую роль ионов цинка во взаимодействии металл-связывающего домена  $A\beta$  с НК, а с другой стороны – указывая на электростатический характер цинк-индуцированного взаимодействия.

Для подтверждения электростатической природы цинк-индуцированного взаимодействия НК с металл-связывающим доменом  $A\beta$  было проведено исследование его взаимодействия с полианионами другого типа, такими как сульфированные полисахариды (СПС), несущие отрицательно заряженные сульфогруппы. На рис. 3 представлены зависимости мутности смеси  $A\beta_{16}/Zn^{2+}/СПС$  от концентрации СПС. Видно, что мутность смеси возрастает с увеличением концентрации различных видов полианионов. Появление мутности указывает на формирование в растворе агрегатов, что однозначно свидетельствует о цинк-индуцированном взаимодействии  $A\beta_{16}$  с СПС. При этом изменения мутности смеси СПС с  $Zn^{2+}$  (1 мМ) в отсутствие пептида не наблюдалось.  $Ca^{2+}$  и  $Mg^{2+}$  в концентрации 1 мМ не оказывали заметного влияния на мутность растворов  $A\beta_{16}$ , содержащих СПС в указанных на

**Рис. 3.** Зависимость мутности смеси  $A\beta_{16}/Zn^{2+}/СПС$  от концентрации СПС. Условия – как на рис. 2. А: 1 – ДС-6; 2 – ХС; 3 – ДС-40. Б: гепарин.

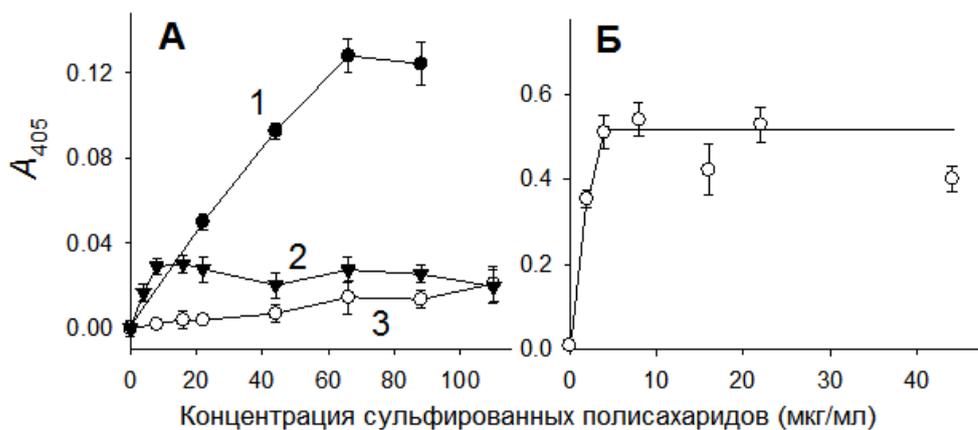


рис. 3 концентрациях ( $A_{405} < 0,003$  во

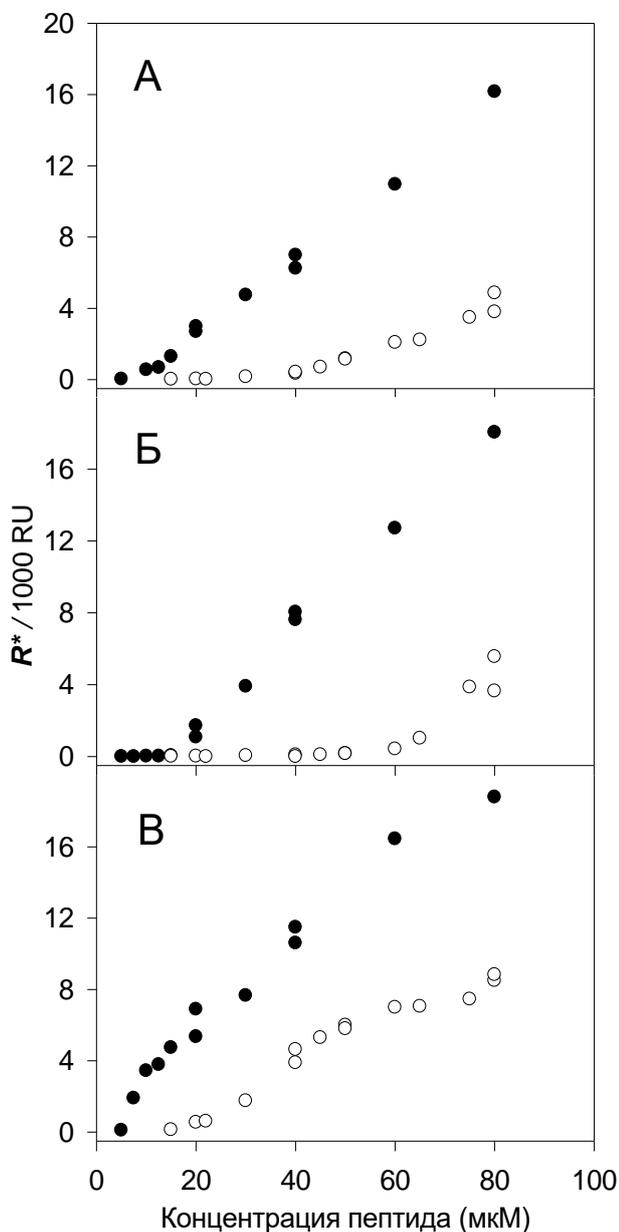
всех случаях). Несульфированный полисахарид, декстран Д-5 (со средней мол. массой близкой к ДС-6), в концентрации 110 мкг/мл не вызывал появления заметной мутности смеси  $A\beta_{16}$  (150 мкМ) с  $Zn^{2+}$  (1 мМ): значения  $A_{405}$  лежали ниже 0,004.

Как и в случае различных типов НК, различные типы СПС оказывают качественно схожий эффект, хотя количественно он может различаться значительно (рис. 2 и 3).

Очевидно, это связано с различиями в характеристиках формирующихся агрегатов, что, в свою очередь, может определяться разницей между молекулами полианионов в линейной плотности заряда, гибкости и линейных размерах.

Таким образом, полученные результаты указывают на то, что координация  $Zn^{2+}$  в металл-связывающем домене  $A\beta$  вызывает связывание домена с НК. Кроме того,  $Zn^{2+}$  может индуцировать взаимодействие и с другим типом полианионов, таким как сульфированные полисахариды. Однако если сульфогруппы отсутствуют, то взаимодействия не наблюдается. Это подтверждает предположение о том, что формирование комплексов  $A\beta_{16}$  с НК имеет универсальную основу и определяется электростатическими взаимодействиями, что требует образования анион-связывающего сайта при конформационных изменениях в  $A\beta_{16}$ , вызываемых координацией иона цинка аминокислотными остатками пептида.

Известно, что  $A\beta_{16}$ -отк может формировать наряду с мономерными также и олигомерные комплексы  $Zn^{2+}$ - $A\beta_{16}$ -отк [Ali et al., 2006]. Ацетилирование и амидирование соответственно *N*- и *C*-концов пептида делает его значительно более устойчивым к  $Zn^{2+}$ -индуцированной олигомеризации [Kozin et al., 2001]. Для выяснения роли  $Zn^{2+}$ -индуцированных олигомеров  $A\beta_{16}$ -отк и  $A\beta_{16}$  в цинк-зависимом связывании пептидов с НК был проведён сравнительный биосенсорный анализ концентрационных зависимостей их взаимодействия с ДНК, результаты которого представлена на рис. 4. Величина равновесного сигнала биосенсора  $R^*$  прямо пропорциональна максимальному весовому количеству пептида, которое при заданной концентрации пептида в растворе способно связаться с ДНК, иммобилизованной на рабочей поверх-



**Рис. 4.** Зависимость равновесного сигнала ППР-биосенсора  $R^*$  от концентрации пептида в инъектируемом растворе. Темные круги –  $A\beta_{16}$ -отк; светлые круги –  $A\beta_{16}$ . HEPES-буфер (pH 6,8), 1 mM  $Zn^{2+}$ . Иммобилизованный лиганд: **А** – rd-ДНК; **Б** – poly(dA)·poly(dT); **В** – p(dT)<sub>75</sub>. ДНК была иммобилизована в количестве 950, 1040 и 990 RU, соответственно.

ности ППР-биосенсора. Видно, что  $A\beta_{16}$ -отк, который способен формировать цинк-индуцированные олигомеры при более низких концентрациях пептида, чем  $A\beta_{16}$ , демонстрирует также и более высокий уровень связывания с иммобилизованной ДНК. Следует отметить, что пептид  $A\beta_{16}$ -G4-C (последовательность пептида  $A\beta_{16}$ , связанная глициновым линкером с остатком цистеина), иммобилизованный на рабочей поверхности ППР-биосенсора через C-концевой остаток цистеина, и, таким образом, не способный формировать цинк-индуцированные олигомеры, не взаимодействовал с молекулами rd-ДНК, находящимися в растворе.

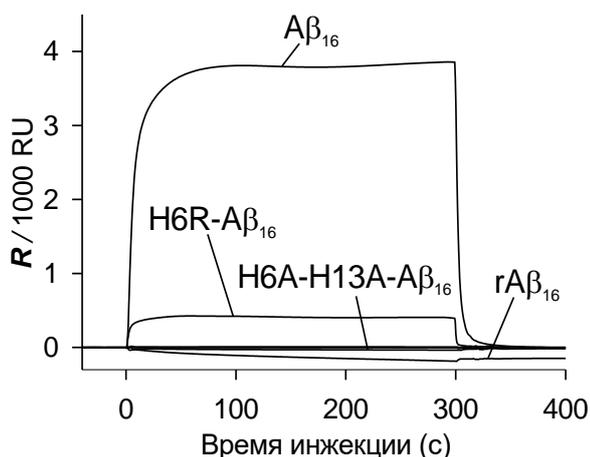
Знание величины сигнала биосенсора, соответствующего количеству иммобилизованной ДНК (около 1000 RU, рис. 4), наряду с величиной  $R^*$ , позволяет рассчитать молярное соотношение пептид/ДНК в комплексе по формуле [DiPrimo & Lebars, 2007]:

$$R_P \cdot MW_{DNA} / R_{DNA} \cdot MW_P,$$

где  $R_P$  и  $R_{DNA}$  – сигналы биосенсора при, соответственно, связывании пептида и иммобилизации ДНК, а  $MW_P$  и  $MW_{DNA}$  – молекулярные массы пептида и молекулы ДНК. Исходя из мол. массы 1955 Да для  $A\beta_{16}$ -отк и 48 кДа для rd-ДНК (дуплексы длиной 75 п.о., средняя мол. масса п.о. – 640 Да), количество молекул пептида, находящихся в комплексе с молекулой ДНК при достижении равновесного состояния в растворе пептида концентрацией 80 мкМ ( $R^* \approx 18000$  RU, рис. 4А) равно 442 или около 6 молекул пептида на пару оснований ДНК. Очевидно, что такое количество молекул пептида не может быть связано непосредственно с парой оснований ДНК из-за стерических ограничений. Было также обнаружено, что существует пороговая концентрация пептида, 5 мкМ (рис. 4), ниже которой не наблюдалось цинк-индуцированного взаимодействия пептида  $A\beta_{16}$ -отк с молекулами иммобилизованной ДНК. Совокупность полученных результатов однозначно указывает на то, что вызванное  $Zn^{2+}$  взаимодействие модельных пептидов  $A\beta_{16}$ -отк и  $A\beta_{16}$  с ДНК тесно связано с процессом их цинк-индуцированной олигомеризации.

Остатки гистидина Н6, Н13 и Н14 играют определяющую роль в формировании координационной сферы  $Zn^{2+}$  как при образовании мономерных комплексов  $Zn^{2+}$ - $A\beta_{16}$ , так и при цинк-индуцированной олигомеризации пептида [Куликова и соавт., 2015; Istrate et al., 2016]. Можно ожидать, что они должны быть важным элементом молекулярного механизма цинк-индуцированного взаимодействия  $A\beta_{16}$  с НК. Действительно, как следует из рис. 5, замена остатков гистидина Н6 и Н13 на другие а.о. (пептиды Н6R- $A\beta_{16}$  и r $A\beta_{16}$ , табл. 1) или одновременная замена остатков гистидина Н6 и Н13 на остатки аланина (Н6А-Н13А- $A\beta_{16}$ , табл. 1) приводили к либо существенному ослаблению или полному исчезновению цинк-индуцированного взаимодействия модельных пептидов с ДНК.

Таким образом, полученные результаты позволяют заключить, что металл-связывающий домен может являться цинк-зависимым сайтом взаимодействия  $A\beta$  с НК и что взаимодействие в значительной степени определяется способностью пептида формировать олигомеры с участием ионов цинка. В отличие от мономерного комплекса  $Zn^{2+}$ - $A\beta_{16}$ , цинк-

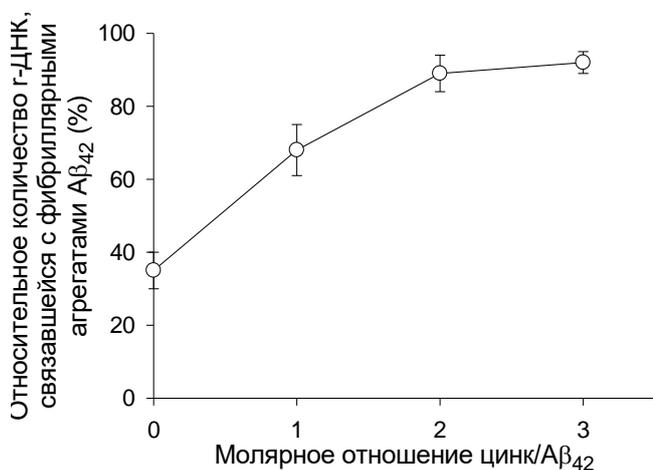


**Рис. 5.** Зависимость сигнала ППР-биосенсора от времени пропускания раствора пептида (80 мкМ в HEPES-буфере, pH 6,8, 1 мМ  $Zn^{2+}$ ) через микроканал оптического чипа SA. Имобилизованный лиганд – г-ДНК. Нулевое время – начало инъекции раствора пептида; через 300 с – начало инъекции буфера без  $Me^{2+}$ . Показаны сенсограммы, полученные для пептида  $A\beta_{16}$  и его мутантных форм, а также для пептида  $rA\beta_{16}$ . В отсутствие  $Zn^{2+}$  или в присутствии 1 мМ  $Mg^{2+}$  или  $Ca^{2+}$  связывания пептидов не наблюдалось.

индуцированный олигомер будет иметь множество потенциальных анион-связывающих сайтов, что обеспечивает возможность «многоочечного» (поливалентного) взаимодействия с полианионом. Поливалентные взаимодействия характеризуются значительно более высокой аффинностью по сравнению с аффинностью составляющих их «моновалентных» взаимодействий [Kitov et al., 2003]. В случае комплексов цинк-индуцированных олигомеров  $A\beta_{16}$ -отк или  $A\beta_{16}$  с НК, стабильность комплексов пептид/НК будет ограничена скорее всего стабильностью самих олигомеров.

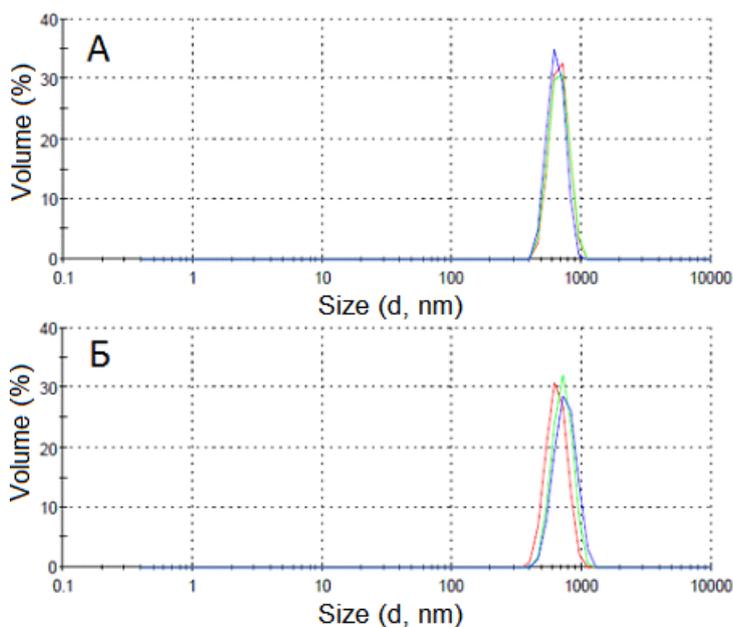
## 2. Эффект ионов цинка на взаимодействие нуклеиновых кислот с фибриллярными агрегатами $A\beta_{42}$

Результаты, представленные в разделе 1, позволяют предположить, что координация  $Zn^{2+}$  а.о. металл-связывающего домена полноразмерных пептидов  $A\beta$  может привести к эффективному связыванию НК с амилоидными агрегатами. Действительно, в случае  $fA\beta_{42}$  гидрофобное ядро фибриллы образовано фрагментами 17-42 пептида, формирующими кросс- $\beta$ -листовую структуру, в то время как металл-связывающий домен (фрагмент 1-16) не структурирован и экспонирован в раствор (Luhrs et al., 2005). Известно, что при этом металл-связывающий домен сохраняет способность формировать комплексы с ионами цинка (Mithu et al., 2011). В отличие от относительно лабильных цинк-индуцированных олигомеров  $A\beta_{16}$ ,



фибриллярные агрегаты полноразмерных пептидов  $A\beta$  характеризуются крайне высокой стабильностью, что делает возможным формирование поливалентных цинк-индуцированных комплексов между  $fA\beta_{42}$  и молекулами НК, аффинность

**Рис. 6.** Относительное количество г-ДНК, связавшейся с  $fA\beta_{42}$ , как функция молярного отношения цинк/пептид. Концентрация пептида – 50 мкМ; концентрация г-ДНК – 0,5 мкМ (112 мкг/мл). HEPES-буфер, pH 7,0.



**Рис.7.** Данные ДРС-анализа в графическом формате, представляемом анализатором размера частиц Zetasizer Nano ZS: распределение частиц по их объему (доля частиц с данным диаметром в суммарном объеме частиц, %). fA $\beta$ <sub>42</sub>. Концентрация пептида – 50 мкМ. HEPES-буфер, pH 7,0. Показаны результаты трех измерений. **А:** 150 мкМ Zn<sup>2+</sup>; средний размер 664±20 нм. **Б:** нет ионов цинка, средний размер 704±54 нм.

которых не будет лимитирована стабильностью самих агрегатов.

Как видно из рис. 6, ионы цинка усиливают способность fA $\beta$ <sub>42</sub>

связывать г-ДНК. В отсутствие Zn<sup>2+</sup> около 35% молекул г-ДНК ко-седиментируют вместе с агрегатами, при этом г-ДНК в отсутствие пептида не осаждалась при использованном режиме центрифугирования (16000 g, 30 мин, 20°C). Добавление цинка в молярном соотношении от 1 до 3 приводит к существенному усилению связывания: доля г-ДНК, ко-седиментирующей с агрегатами пептида, монотонно возрастает до ≈90% с увеличением концентрации Zn<sup>2+</sup>, приближаясь к насыщению при молярных соотношениях цинк/пептид = 2 и более (рис. 6). Zn<sup>2+</sup> в концентрации 150 мкМ не вызывал детектируемой седиментации г-ДНК в отсутствие агрегатов пептида и практически не влиял на размер агрегатов fA $\beta$ <sub>42</sub> (рис. 7) и, следовательно, на их седиментационные характеристики. Таким образом, увеличение количества ко-седиментирующих молекул ДНК в присутствии агрегатов пептида может быть объяснено только цинк-индуцированным усилением их связывания с fA $\beta$ <sub>42</sub>.

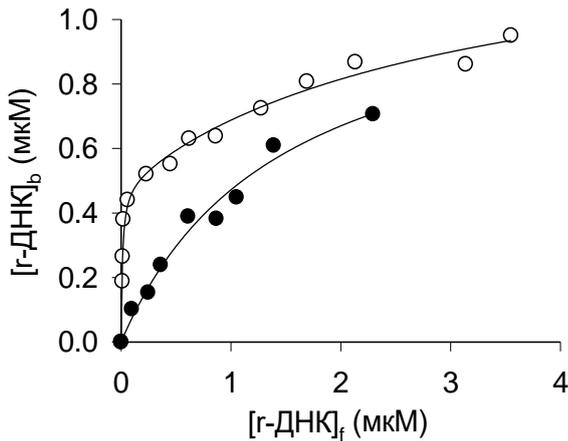
Цинк-индуцированное взаимодействие с fA $\beta$ <sub>42</sub> наблюдалось не только для ДНК, но и для РНК. В табл. 3 показаны результаты взаимодействия с fA $\beta$ <sub>42</sub> различных НК в отсутствие и присутствии Zn<sup>2+</sup> в концентрации 150 мкМ. Как можно видеть, все НК (представленные молекулами РНК и одноцепочечной и двухцепочечной ДНК) способны связываться с fA $\beta$ <sub>42</sub> в отсутствие Zn<sup>2+</sup>, хотя и с различной эффективностью. Различия в эффективности связывания были статистически достоверными (двухвыборочный *t*-критерий Стьюдента, *p*=0,05) за исключением средних значений относительного количества связавшихся молекул для г-ДНК и г-ДНК, между которыми таких различий выявлено не было. При этом Zn<sup>2+</sup> в концентрации 150 мкМ значительно усиливал взаимодействие НК с fA $\beta$ <sub>42</sub>: относительное количество ДНК и РНК, ко-седиментирующих с агрегатами, превышало 90% для всех тестируемых типов НК (табл. 3). В противоположность Zn<sup>2+</sup>, ионы кальция и магния в такой же концентрации не оказывали статистически достоверного влияния на ко-седиментацию НК. Результаты определения методом ультрафильтрации относительного количества г-ДНК, связывающейся

**Табл. 3.** Относительное количество (%) молекул НК, связывающихся с фибриллярными агрегатами Аβ<sub>42</sub> и его изоформ Н6R-Аβ<sub>42</sub> и D7H-Аβ<sub>42</sub>, определённое с помощью седиментационного анализа и ультрафильтрации. Концентрация пептида – 50 мкМ. Концентрация нуклеиновых кислот – 12 мкг/мл (соответствует молярной концентрации 1,6 и 0,5 мкМ для р-ДНК и г-ДНК, соответственно, если средняя молекулярная масса нуклеотида принимается равной 320 Да). NEPES-буфер, рН 7,0. Показаны средние арифметические значения и стандартные отклонения для трёх измерений.

Пептид	Дивалентные ионы	Нуклеиновые кислоты			
		р-ДНК	г-ДНК	g-ДНК	с-РНК
Седиментация					
Аβ <sub>42</sub>	Нет дивалентных ионов	21±3	35±5	39±5	51±4
	Ca <sup>2+</sup>	18±4	37±4	37±4	49±5
	Mg <sup>2+</sup>	20±4	29±3	42±5	56±6
	Zn <sup>2+</sup>	91±5	92±3	96±3	98±2
Н6R-Аβ <sub>42</sub>	Нет дивалентных ионов	-	32±4	-	-
	Zn <sup>2+</sup>	-	94±2	-	-
D7H-Аβ <sub>42</sub>	Нет дивалентных ионов	-	40±6	-	-
	Zn <sup>2+</sup>	-	96±3	-	-
Фильтрация					
Аβ <sub>42</sub>	Нет дивалентных ионов	-	29±4	-	-
	Zn <sup>2+</sup>	-	95±2	-	-

с fАβ<sub>42</sub> как в отсутствии, так и в присутствии 150 мкМ цинка, находятся в хорошем согласии с результатами седиментационного анализа (табл. 3). Мутации D7H и Н6R не влияли на цинк-индуцированное связывание г-ДНК с фибриллярными агрегатами полноразмерных пептидов (табл. 3) в отличие от цинк-индуцированного взаимодействия с Аβ<sub>16</sub>. Следует отметить, что хотя средние значения относительного количества г-ДНК, связавшейся с агрегатами Аβ<sub>42</sub>, D7H-Аβ<sub>42</sub> и Н6R-Аβ<sub>42</sub> в отсутствии Zn<sup>2+</sup> различаются, эти различия не носили статистически достоверного характера.

Очевидно, что цинк-зависимое связывание фибриллярных агрегатов с НК определяется формированием комплексов Zn<sup>2+</sup> с металл-связывающим доменом пептидов Аβ<sub>42</sub>, формирующих фибриллярные агрегаты. Действительно, ионы магния и кальция, способность которых эффективно образовывать комплексы с ДНК давно известна [Mathieson et al., 1975], но которые не образуют комплексов с Аβ [Куликова и соавт., 2015], не оказывали влияния на связывание НК с агрегатами пептида. Zn<sup>2+</sup> при связывании с Аβ<sub>42</sub> в составе агрегата может быть координирован как остатками гистидинов одного пептида, так и остатками гистидинов соседних пептидов [Miller et al., 2010]. Во втором случае, две пары остатков гистидина двух соседних пептидов могут формировать координационную сферу Zn<sup>2+</sup>. Действительно, при исследовании связывания ионов цинка с фибриллярными агрегатами Аβ<sub>42</sub> (методом твёрдофазной ЯМР) наблюдалось ограничение подвижности остатков гистидинов Н13 и Н14,



**Рис. 8.** Зависимость концентрации γ-ДНК, связанной с fAβ<sub>42</sub> ([γ-ДНК]<sub>b</sub>), от концентрации не связавшейся (свободной) γ-ДНК ([γ-ДНК]<sub>f</sub>). Светлые круги – связывание γ-ДНК с агрегатами в присутствии Zn<sup>2+</sup> (150 мкМ), темные круги – в отсутствие. Концентрация пептида – 25 мкМ. HEPES-буфер, pH 7,0.

но не Н6 [Mithu et al., 2011]. Это может объяснить тот факт, что как отсутствие Н6, так и добавление ещё одного остатка гистидина в металл-связывающий домен Aβ<sub>42</sub>, не влияли на цинк-зависимое связывание НК с фибриллярными агрегатами пептида (табл. 3).

Вероятно, координация Zn<sup>2+</sup> парами Н13/Н14 двух соседних пептидов в составе фибриллярного агрегата является предпочтительной и определяет формирование анион-связывающих сайтов на поверхности агрегата.

Одной из важнейших характеристик любого комплекса является его стабильность, количественно выражаемая величиной равновесной константы диссоциации  $K_D$ . Стабильность комплексов НК с fAβ<sub>42</sub> была исследована на примере взаимодействия агрегатов пептида с γ-ДНК. Стабильность цинк-зависимых комплексов оценивали в условиях насыщающих концентраций цинка (молярное соотношение цинк/пептид = 6). На рис. 8 представлены экспериментальные зависимости [γ-ДНК]<sub>b</sub> от [γ-ДНК]<sub>f</sub> (соответственно концентрации γ-ДНК, связавшейся с агрегатами, и не связавшейся, «свободной», γ-ДНК), полученные в отсутствие и присутствии Zn<sup>2+</sup>. В отсутствие Zn<sup>2+</sup> экспериментальная зависимость наилучшим образом аппроксимировалась моделью, предполагающей наличие на агрегате множества идентичных мест связывания с одинаковым значением  $K_D$  [Wang et al., 1996]:

$$[\gamma\text{-ДНК}]_b = (B_{\max} \cdot [\gamma\text{-ДНК}]_f / ([\gamma\text{-ДНК}]_f + K_D)),$$

где  $B_{\max}$  – максимальная связывающая способность (maximum binding capacity), т. е. концентрация [γ-ДНК]<sub>b</sub>, соответствующая полному заполнению лигандом мест связывания в данных экспериментальных условиях. В присутствии Zn<sup>2+</sup>, экспериментальная зависимость наилучшим образом аппроксимировалась моделью, предполагающей наличие на поверхности fAβ<sub>42</sub> двух типов мест связывания γ-ДНК с различными значениями  $K_D$  [Wang et al., 1996]:

$$[\gamma\text{-ДНК}]_b = (B_{\max 1} \cdot [\gamma\text{-ДНК}]_f / ([\gamma\text{-ДНК}]_f + K_{D1})) + (B_{\max 2} \cdot [\gamma\text{-ДНК}]_f / ([\gamma\text{-ДНК}]_f + K_{D2})),$$

где  $K_{D1}$ ,  $B_{\max 1}$ ,  $K_{D2}$  и  $B_{\max 2}$  – равновесные константы диссоциации и максимальные связывающие способности, соответствующие «первому» и «второму» типу мест связывания.

В табл. 4 представлены значения констант диссоциации и максимальных связывающих способностей для взаимодействия γ-ДНК с fAβ<sub>42</sub> в отсутствие и в присутствии Zn<sup>2+</sup>. Значения были получены аппроксимацией экспериментальных зависимостей на рис. 8 (графически

**Табл. 4.** Значения констант диссоциации и максимальных связывающих способностей, характеризующих связывание г-ДНК с  $fA\beta_{42}$  в присутствии и отсутствии  $Zn^{2+}$  (концентрация пептида – 25 мкМ, молярное отношение цинк/пептид=6). Все значения указаны в мкМ.

$Zn^{2+}$	$B_{max}$	$K_D$	$B_{max1}$	$K_{D1}$	$B_{max2}$	$K_{D2}$
(-)	1.2±0.2	1.5±0.3	-	-	-	-
(+)	-	-	0.5±0.1	0.012±0.004	0.8±0.3	3±1

результаты аппроксимации представлены сплошными линиями) методом нелинейной регрессии с помощью программы SigmaPlot (Systat Software), используя вышеуказанные уравнения. Как можно видеть, в отсутствие  $Zn^{2+}$  связывание г-ДНК с  $fA\beta_{42}$  характеризуется наличием мест связывания одного типа с  $K_D$ , лежащей в микромолярной области (табл. 4). Представляется наиболее вероятным, что сайтом взаимодействия в этом случае является участок  $^{13}NHQK^{16}$ , включающий аминокислотные остатки с 13 по 16 полипептидной цепи  $A\beta$ . Известно, что именно этот участок ответственен за взаимодействие другого биологического полианиона, гепарина, с агрегатами  $A\beta$  [Watson et al., 1997; McLaurin & Fraser, 2000]. Действительно, участки  $^{13}NHQK^{16}$  пептидов  $A\beta$  в фибриллярных агрегатах расположены рядом и при нейтральных pH могут создавать протяжённую положительно заряженную область на поверхности фибриллы, которая и может служить местом связывания полианионов, к которым относятся как гепарин, так и НК.

Образование комплексов между  $Zn^{2+}$  и пептидами  $A\beta_{42}$  в составе фибриллярных агрегатов приводит к появлению мест связывания г-ДНК, различающихся по аффинности – один тип мест связывания характеризуется микромолярной  $K_D$ , другой, более аффинный, значением  $K_D$  порядка 10 нМ (табл. 4). Очевидно, наличие двух типов мест связывания г-ДНК с  $fA\beta_{42}$  определяется особенностями взаимодействия  $Zn^{2+}$  с агрегатами пептида. Действительно, координация иона цинка остатками гистидинов H13 и H14 двух соседних пептидов [Mithu et al., 2011] в составе агрегата должна привести к образованию анион-связывающего сайта аналогично тому, как это происходит в цинк-индуцированном олигомере  $A\beta_{16}$ . Это соответственно повысит плотность положительного заряда в области поверхности фибриллярного агрегата  $A\beta_{42}$ , которая образована соседствующими участками  $^{13}NHQK^{16}$ . Повышение плотности заряда должно усилить взаимодействие полианиона с агрегатом. Стабильность комплекса может в таком случае существенно увеличиться, что проявляется в снижении величины  $K_D$  с  $\sim 1$  мкМ до  $\sim 10$  нМ (табл. 4). С другой стороны, известно, что наряду с взаимодействием с металл-связывающим доменом,  $Zn^{2+}$  также разрушает солевой мостик D23-K28 между остатками аспарагиновой кислоты и лизина, который стабилизирует  $\beta$ -петлю и играет важную роль в процессе фибриллизации  $A\beta$ , но при этом кросс- $\beta$ -листовая структура уже сформированных фибриллярных агрегатов  $A\beta_{42}$  не нарушается [Mithu et al., 2011]. Разрушение солевого мостика может приводить к экспонированию остатков лизина на поверхности амилоидной фибриллы, создавая, таким образом, протяжённую положительно заряженную область, которая и выступает в качестве ещё одного места связывания

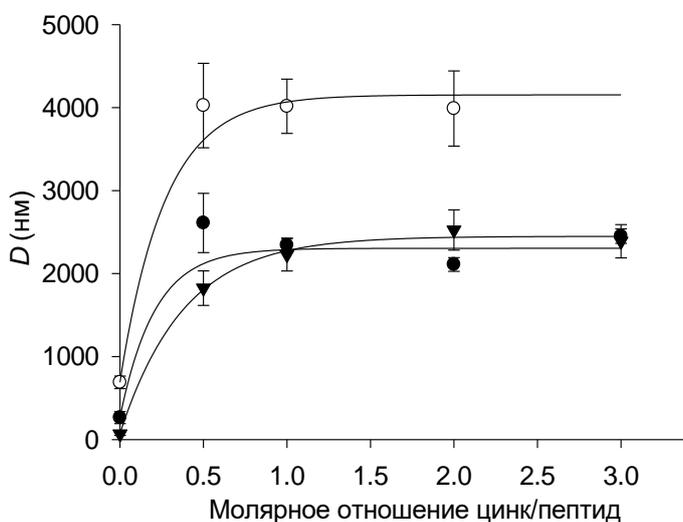
полианиона, такого как молекула ДНК, с  $fA\beta_{42}$ . Строго говоря, имеющиеся экспериментальные результаты не позволяют однозначно отнести измеренные  $K_D$  к конкретному типу потенциальных цинк-зависимых сайтов связывания г-ДНК. Очевидно тем не менее, что взаимодействие НК с одним из этих сайтов характеризуется высокой аффинностью ( $K_D \sim 10$  нМ).

Таким образом, присутствие ионов цинка усиливает связывание как молекул ДНК, так и РНК с  $fA\beta_{42}$ , приводя к появлению высокоаффинного сайта связывания НК на поверхности агрегатов. Как отсутствие остатка гистидина Н6, так и введение четвертого остатка гистидина в полипептидную цепь  $A\beta_{42}$  аминокислотной заменой D7H не влияли на цинк-зависимое связывание ДНК с фибриллярными агрегатами пептида.

### 3. Взаимодействие нуклеиновых кислот с цинк-индуцированными агрегатами $A\beta_{42}$

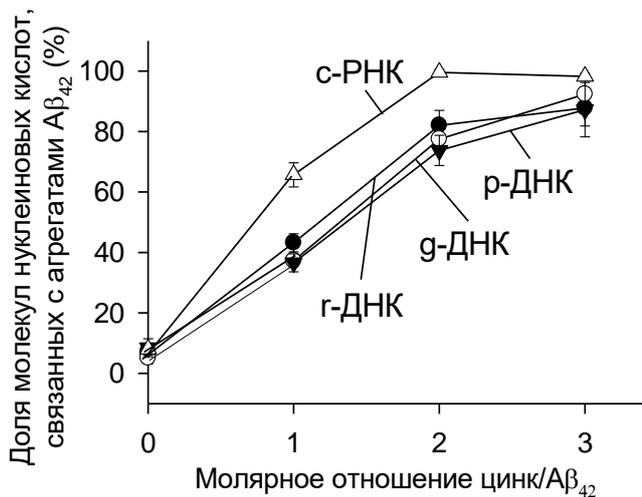
Наряду с фибриллярными агрегатами, потенциально возможно формирование внутриклеточных цинк-индуцированных агрегатов  $vkA\beta_{42}$  как следствие возрастания уровня свободного  $vkZn^{2+}$  в условиях оксидативного и/или нитрозирующего стрессов [Aizenman et al., 2000; Bossy-Wetzel et al., 2004; Kroncke et al., 2007; Linet et al., 2007; Spahl et al., 2003; St Croix et al., 2002]. В связи с этим в рамках диссертационной работы было выполнено исследование взаимодействия нуклеиновых кислот с  $ziA\beta_{42}$ . Как и в случае фибриллярных агрегатов, с целью оценки роли остатков гистидина во взаимодействии молекул ДНК и РНК с  $ziA\beta_{42}$ , в работе использовали такие изоформы пептида, как D7H- $A\beta_{42}$  и H6R- $A\beta_{42}$ .

$Zn^{2+}$  в субэквимольных количествах по отношению к  $A\beta$  вызывает практически мгновенное формирование аморфных – то есть не имеющих  $\beta$ -листовой структурной организации – агрегатов пептида [Faller et al., 2013; Tougu & Palumaa, 2012]. На рис. 9 представлены зависимости гидродинамического диаметра  $ziA\beta_{42}$  при различных молярных соотношениях цинк/пептид. Как можно видеть, добавление ионов цинка к растворам пептидов в



соотношении  $Zn^{2+}/\text{пептид}=0,5$  приводит к появлению агрегатов значительного размера, который практически не меняется при дальнейшем увеличении соотношения  $Zn^{2+}/\text{пептид}$ .

**Рис. 9.** Зависимость гидродинамического диаметра цинк-индуцированных агрегатов  $A\beta_{42}$ , D7H- $A\beta_{42}$  и H6R- $A\beta_{42}$  от молярного отношения цинк/пептид. Концентрация пептидов – 50 мкМ. HEPES-буфер, pH 7,0. Темные круги –  $A\beta_{42}$ , светлые круги – D7H- $A\beta_{42}$ , темные треугольники – H6R- $A\beta_{42}$ .



**Рис. 10.** Относительное количество НК, ко-седиментирующих с  $z\beta_{42}$ . Концентрация пептида – 50 мкМ. HEPES-буфер, pH 7,0.

При этом пептиды  $A\beta_{42}$  и H6R- $A\beta_{42}$  формировали агрегаты приблизительно одинакового размера ( $D \approx 2-2,5$  мкм), в то время как размер агрегатов D7H- $A\beta_{42}$  был в  $\sim 2$  раза больше. Некоторая часть пептидов изначально (до добавления  $Zn^{2+}$ ) находится в агрегированном состоянии: метод ДРС детектировал

наличие в препаратах пептидов  $A\beta_{42}$ , D7H- $A\beta_{42}$  и H6R- $A\beta_{42}$  «предсуществующих» агрегатов размером  $\sim 270$ ,  $\sim 700$  и  $\sim 70$  нм, соответственно (рис. 9). Хотя пептиды обрабатывались перед использованием гексафторизопропанолом, что позволяет получить большинство пептидов в форме мономеров [Stine et al., 2011], полностью избавиться от предсуществующих агрегатов можно только используя специальные процедуры, такие как ультрафильтрация или хроматографическое фракционирование (Bitan et al., 2003).

При добавлении растворов НК к  $z\beta_{42}$ , наблюдалось связывание НК с агрегатами пептида, определяемое по их ко-седиментации с агрегатами (рис. 10). В отсутствие пептида, НК при идентичных условиях центрифугирования (16000 g, 30 мин, 20°C) не седиментировали в диапазоне концентраций  $Zn^{2+}$  от 0 до 150 мкМ. В одинаковых условиях молекулы с-РНК демонстрировали более высокий уровень связывания, чем молекулы ДНК. Следует отметить, что прирост количества молекул НК, ко-седиментирующих с агрегатами  $z\beta_{42}$ , в диапазоне молярных отношений цинк/пептид от 0,5 до 2 составил 50-70% (рис. 10), при этом не наблюдалось сколь-либо существенного изменения размера  $z\beta_{42}$  (рис. 9) и, как можно ожидать, седиментационных характеристик агрегатов. Это указывает на изменение либо свойств поверхности агрегатов, определяющих эффективность связывания с ними молекул НК, либо на увеличение числа агрегатов с ростом концентрации цинка (что при неизменном среднем размере агрегатов означает увеличение степени агрегации – относительного количества пептида в составе агрегатов).

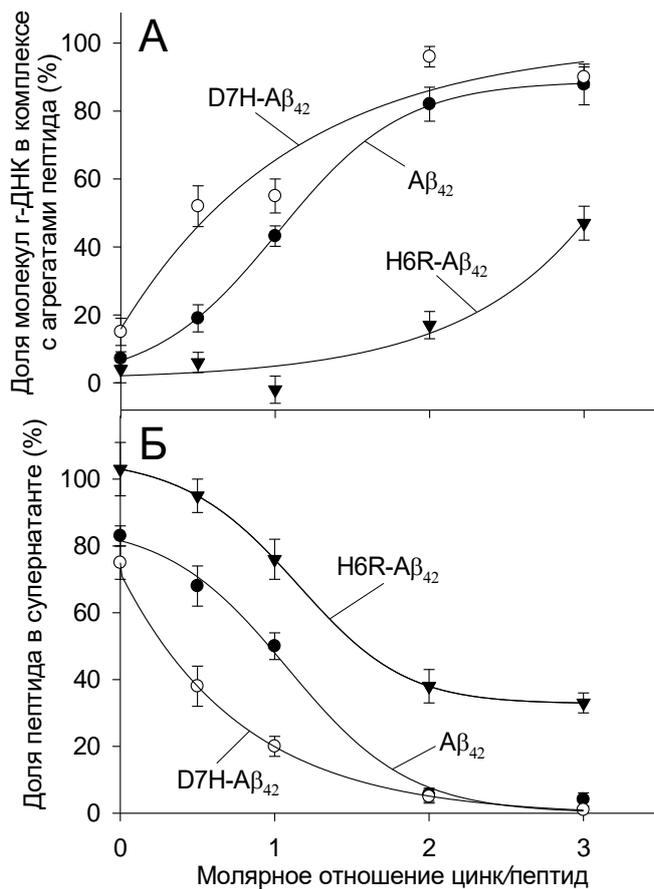
Оценку степени агрегации пептида проводили, определяя величину растворимой фракции пептида – долю пептида, не осаждаемого центрифугированием (16000 g, 30 мин). Как видно на рис. 11, увеличение связывания r-ДНК с цинк-индуцированными агрегатами пептидов  $A\beta_{42}$ , D7H- $A\beta_{42}$  и H6R- $A\beta_{42}$  сопровождается ростом степени агрегации пептида, проявляющимся снижением величины растворимой фракции пептидов (рис 11, А vs. Б). Рост степени агрегации пептида при неизменности среднего размера агрегатов свидетельствует об увеличении количества агрегатов, что и объясняет увеличение относительного количества

**Рис. 11.** Зависимости (А) относительного количества молекул г-ДНК, связанных с цинк-индуцированными агрегатами пептидов Аβ<sub>42</sub>, D7Н-Аβ<sub>42</sub> и Н6R-Аβ<sub>42</sub> и (Б) величины растворимой фракции этих пептидов от молярного отношения Zn<sup>2+</sup>/пептид. Концентрация пептида – 50 мкМ, концентрация г-ДНК – 0,5 мкМ. HEPES-буфер, рН 7,0.

НК, ко-седиментирующих с цинк-индуцированными агрегатами пептидов Аβ<sub>42</sub>, D7Н-Аβ<sub>42</sub> и Н6R-Аβ<sub>42</sub> с ростом отношения цинк/пептид (рис. 10 и 11А).

Предсуществующие агрегаты Н6R-Аβ<sub>42</sub> ( $D \approx 70$  нм, рис. 9), детектируемые методом ДРС в препаратах пептида в отсутствие Zn<sup>2+</sup>, не осаждаются при заданном режиме центрифугирования (16000 g, 30 мин), так как не наблюдалось осаждения какого-либо пептидного материала (рис. 11Б). Однако предсуществующие агрегаты большего размера, присутствующие в препаратах Аβ<sub>42</sub> и D7Н-Аβ<sub>42</sub> ( $D \approx 270$  и 700 нм, соответственно, рис. 9), осаждались при центрифугировании, поскольку доля пептида в супернатанте уменьшалась соответственно на  $\approx 17\%$  и  $\approx 25\%$  (рис. 11Б). Очевидно, осаждение этих агрегатов ответственно за седиментацию приблизительно 7% и 15% молекул г-ДНК в препаратах Аβ<sub>42</sub> и D7Н-Аβ<sub>42</sub>, соответственно, в отсутствие Zn<sup>2+</sup> (рис. 11А). Необходимо отметить, что предварительное центрифугирование препаратов Аβ<sub>42</sub> (16000 g, 30 мин) приводило к тому, что при последующем добавлении г-ДНК и центрифугировании смеси пептид/ДНК какого-либо заметного осаждения г-ДНК не наблюдалось.

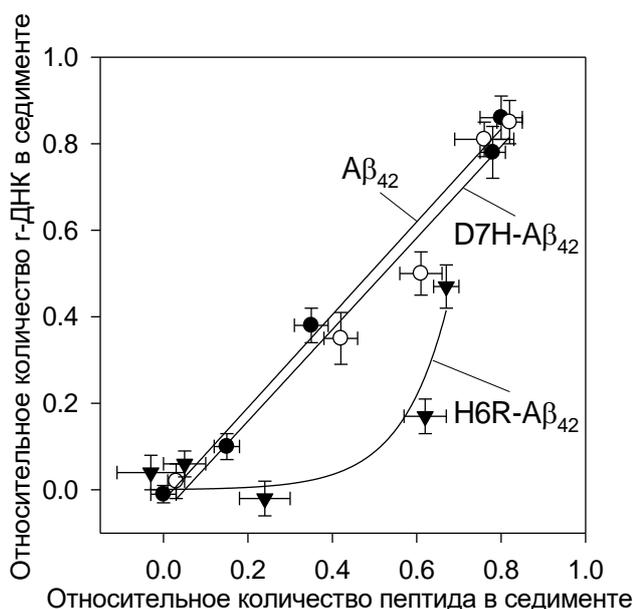
Аминокислотные замены D7Н и Н6R оказывают существенное влияние на характер цинк-индуцированной агрегации пептидов. Изоформа D7Н-Аβ<sub>42</sub> вероятно более склонна к агрегации как в отсутствие Zn<sup>2+</sup> (наличие более крупных предсуществующих агрегатов и меньшее количество пептида в составе растворимой фракции), так и к цинк-индуцированной агрегации – формирующиеся агрегаты больше по размеру, чем в случае Аβ<sub>42</sub> (рис. 9), а степень агрегации в присутствии эквимольных и субэквимольных концентраций Zn<sup>2+</sup> превышает этот показатель для Аβ<sub>42</sub> (рис. 11Б). Напротив, замена остатка гистидина Н6 на остаток аргинина приводила к улучшению растворимости пептида (наименьший размер предсуществующих агрегатов и отсутствие фракции пептида, осаждающейся при центрифугировании, рис. 9 и 11Б) и снижала способность пептида формировать цинк-индуцированные агрегаты – количество пептида Н6R-Аβ<sub>42</sub> в растворимой фракции



систематически выше соответствующих значений для пептида  $A\beta_{42}$  (рис. 11Б). Полученные результаты, касающиеся влияния замен D7H и H6R на цинк-индуцированную агрегацию  $A\beta$ , согласуются с недавно предложенным механизмом «цинк-зависимой полимеризации» [Istrate et al., 2016], необходимым шагом которого является координация  $Zn^{2+}$  остатками H6 и H13 двух пептидов. Отсутствие H6, по-видимому, направляет процесс цинк-индуцированной агрегации по менее эффективному пути с участием других аминокислотных остатков металл-связывающих доменов двух пептидов  $A\beta$  в координации  $Zn^{2+}$  [Miller et al., 2012].

Очевидно, что молекулы ДНК способны связываться с поверхностью цинк-индуцированных агрегатов как пептида  $A\beta_{42}$ , так и его изоформ D7H- $A\beta_{42}$  и H6R- $A\beta_{42}$ , если такие агрегаты сформировались и присутствуют в препарате пептида (рис. 11, А vs. Б). Однако нельзя исключить, что исследованные аминокислотные замены, дополнительно к влиянию на характер цинк-индуцированной агрегации, могут также влиять на эффективность связывания ДНК с поверхностью цинк-индуцированных агрегатов. Для анализа влияния аминокислотных замен D7H и H6R на эффективность связывания, количество  $\gamma$ -ДНК, ко-седиментирующей с агрегатами пептидов, было сопоставлено с долей пептида в агрегатах, которые седиментируют при центрифугировании. Чтобы избежать влияния предсуществующих агрегатов, препараты пептидов  $A\beta_{42}$ , D7H- $A\beta_{42}$  и H6R- $A\beta_{42}$  подвергали предварительному центрифугированию (16000 g, 20°C, 30 мин). Супернатант отбирали, определяли концентрацию пептида и разводили супернатант HEPES-буфером до требуемой концентрации. Полученные растворы пептидов использовали для приготовления цинк-индуцированных агрегатов, разводя  $Zn^{2+}$ -содержащим HEPES-буфером (pH 7,0) в требуемых пропорциях.

На рис. 12 показаны зависимости относительного количества  $\gamma$ -ДНК, связанной с цинк-индуцированными агрегатами, от относительного количества пептида в агрегированном состоянии.



Как можно видеть, в случае пептидов  $A\beta_{42}$  и D7H- $A\beta_{42}$  количество  $\gamma$ -ДНК в комплексе с агрегатами практически прямо пропорционально количеству пептида

**Рис. 12.** Зависимости относительного количества  $\gamma$ -ДНК, связанной с цинк-индуцированными агрегатами, от относительного количества пептида в агрегированном состоянии. Результаты седиментационного анализа взаимодействия  $\gamma$ -ДНК с пептидами  $A\beta_{42}$ , D7H- $A\beta_{42}$  и H6R- $A\beta_{42}$ . Концентрация пептидов – 50 мкМ, концентрация  $\gamma$ -ДНК – 0,5 мкМ. HEPES-буфер (pH 7,0).

в агрегированной форме: зависимости хорошо описываются линейным уравнением  $Y = A \cdot X + Y_0$ , где коэффициент пропорциональности  $A$  близок к единице, а свободный член  $Y_0$  – к нулю ( $A = 1,07$  и  $1,08$  и  $Y_0 = -0,02$  и  $-0,05$  для  $A\beta_{42}$  и  $D7H-A\beta_{42}$ , соответственно). Коэффициенты корреляции Пирсона равны соответственно  $0,997$  и  $0,982$  для случаев  $A\beta_{42}$  и  $D7H-A\beta_{42}$ . Регрессионный анализ выполнялся с помощью программы SigmaPlot.

Результаты, представленные на рис. 12, свидетельствуют, что эффективности связывания ДНК с цинк-индуцированными агрегатами  $A\beta_{42}$  и  $D7H-A\beta_{42}$  существенно не отличаются и различия в количестве ДНК, остающейся в супернатанте (рис. 11А), определяются в первую очередь различиями в склонности пептидов к агрегации под влиянием ионов цинка. Напротив, связывание г-ДНК с цинк-индуцированными агрегатами изоформы  $H6R-A\beta_{42}$  описывается совершенно другой, нелинейной зависимостью. При этом количество молекул ДНК, связанных с фракцией пептидов в агрегированном состоянии, ниже или существенно ниже, чем для  $A\beta_{42}$  и  $D7H-A\beta_{42}$  (рис. 12). Как отмечалось выше, отсутствие остатка гистидина  $H6$  направляет процесс цинк-индуцированной агрегации  $A\beta$  по пути, реализуемому с участием другого аминокислотного остатка металл-связывающего домена  $A\beta$  в координации иона цинка. Это, по-видимому, изменяет конформацию металл-связывающего домена, участвующего в координации  $Zn^{2+}$  и, соответственно, структуру анион-связывающего сайта. Как результат, взаимодействие фосфатных групп ДНК становится слабее, что и проявляется в уменьшении количества г-ДНК, связываемой с цинк-индуцированными агрегатами  $H6R-A\beta_{42}$ , в сравнении с  $A\beta_{42}$  (рис. 12).

Таким образом, цинк-индуцированные агрегаты  $A\beta_{42}$  способны связывать различные типы НК. Остаток гистидина  $H6$  играет важную роль во взаимодействии  $zA\beta_{42}$  с ДНК, влияя как на способность пептида агрегировать под действие ионов цинка, так и на эффективность связывания молекул ДНК с поверхностью сформировавшихся агрегатов, предположительно через изменение структуры анион-связывающих сайтов. Замена  $D7H$ , вводящая четвертый гистидиновый остаток в полипептидную цепь  $A\beta$ , усиливает способность пептида формировать аморфные агрегаты под действием ионов цинка, но не оказывает влияния на эффективность связывания молекул ДНК с поверхностью агрегатов.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Углубление знаний о причинах и механизмах БА представляет теоретический и практический интерес, связанный с пониманием общих основ патогенеза нейродегенеративных заболеваний и направленным поиском средств лечения БА. Олигомеры и агрегаты  $A\beta$  рассматриваются сегодня как наиболее вероятные патогенные агенты этого заболевания. Обозначившийся в последнее десятилетие сдвиг интереса в исследовании патогенеза БА в сторону большего понимания роли внутриклеточного  $A\beta$  в возникновении и развитии БА ставит вопрос о необходимости исследования всех возможных

механизмов его патогенного воздействия на нейроны. В основе одного из таких потенциальных механизмов лежит взаимодействие агрегатов Аβ с геномной ДНК и молекулами информационной РНК, которое может приводить к нарушениям нормальной экспрессии генов.

Общепринято, что ионы цинка играют важную роль в патогенезе БА. Поскольку оксидативный и/или нитрозирующий стресс, ассоциированные с появлением БА, вызывают нарушение гомеостаза внутриклеточного цинка, вопрос о том, как цинк может модифицировать взаимодействие между агрегатами Аβ и нуклеиновыми кислотами, заслуживает ответа.

Как первый шаг ответа на этот вопрос, в рамках выполненного исследования было изучено влияние ионов цинка на взаимодействие модельных пептидов, представляющих металл-связывающий домен Аβ, и полноразмерных пептидов Аβ с молекулами ДНК и РНК, различающимися по размеру и конформации. Было установлено, что ионы цинка способны значительно усиливать взаимодействие нуклеиновых кислот с фибриллярными агрегатами Аβ, вызывая появление высокоаффинного сайта связывания на поверхности фибрилл. Было также показано, что цинк-индуцированные агрегаты Аβ способны взаимодействовать с молекулами ДНК и РНК и что металл-связывающий домен Аβ может выступать в качестве цинк-зависимого сайта взаимодействия Аβ с нуклеиновыми кислотами. Взаимодействие определяется координацией иона цинка остатками гистидинов металл-связывающего домена и существенно зависит от участия остатка гистидина Н6 в координации иона цинка. Взаимодействие имеет электростатическую природу и в этом смысле «универсально», то есть приводит к взаимодействию металл-связывающего домена и с другими полианионами, отличными от нуклеиновых кислот.

Полученные результаты создают предпосылку для исследования взаимодействия агрегатов внутриклеточного Аβ с геномной ДНК и информационной РНК нейронов в условиях нормального и нарушенного гомеостаза внутриклеточного цинка.

## ВЫВОДЫ

1. Показано, что ионы цинка вызывают взаимодействие между нуклеиновыми кислотами и синтетическим пептидом Аβ<sub>16</sub>, моделирующим металл-связывающий домен амилоида-β. Ионы других двухвалентных металлов, таких как магний, кальций, никель, марганец и медь, не вызывают взаимодействия Аβ<sub>16</sub> с ДНК, сопоставимого с эффектом ионов цинка.
2. Обнаружено, что цинк-зависимое взаимодействие нуклеиновых кислот с металл-связывающим доменом амилоида-β критически зависит от координации иона цинка остатками гистидинов Н6 и Н13 пептида.

3. Установлено, что ионы цинка индуцируют взаимодействие пептидов  $A\beta_{16}$  с сульфированными полисахаридами, причём взаимодействие критически зависит от наличия у полисахаридов отрицательно заряженных сульфогрупп. Это указывает на электростатический характер цинк-индуцированного взаимодействия  $A\beta_{16}$  с полианионами и предполагает формирование анион-связывающего сайта при координации иона цинка аминокислотными остатками металл-связывающего домена амилоида- $\beta$ .
4. Показано, что ионы цинка значительно усиливают связывание молекул ДНК и РНК с фибриллярными агрегатами синтетического полноразмерного пептида  $A\beta_{42}$ , приводя к появлению высокоаффинных мест связывания на поверхности фибриллы, характеризующихся значением константы диссоциации порядка 10 нМ. Остаток гистидина Н6 не участвует в цинк-зависимом связывании ДНК с фибриллярными агрегатами  $A\beta_{42}$ .
5. Установлено, что цинк-индуцированные агрегаты  $A\beta_{42}$  связывают молекулы нуклеиновых кислот. Показано, что формирование цинк-индуцированных агрегатов  $A\beta_{42}$  и взаимодействие молекул ДНК с поверхностью агрегатов зависит от участия остатка гистидина Н6 в координации ионов цинка. Аминокислотная замена Н6R существенно ингибировала цинк-индуцированную агрегацию  $A\beta_{42}$  и уменьшала связывание молекул ДНК с агрегатами пептида.

## СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### Публикации в научных журналах:

1. **Khmeleva S.A.** Zinc-induced interaction of the metal-binding domain of amyloid- $\beta$  peptide with DNA / S.A. Khmeleva, Y.V. Mezentsev, S.A. Kozin, P.O. Tsvetkov, A.S. Ivanov, N.V. Bodoev, A.A. Makarov, S.P. Radko // Journal of Alzheimer's Disease. – 2013. – Vol. 36. – № 4. – P. 633-636.
2. **Хмелёва С.А.** Влияние мутаций и модификаций аминокислотных остатков на цинк-индуцированное взаимодействие металлсвязывающего домена  $\beta$ -амилоида с ДНК / С.А. Хмелёва, Ю.В. Мезенцев, С.А. Козин, В.А. Митькевич, А.Е. Медведев, А.С. Иванов, Н.В. Бодоев, А.А. Макаров, С.П. Радько // Молекулярная биология. – 2015. – Т. 49. – №3. – С. 507-514.
3. Радько С.П. Физико-химические методы исследования агрегации  $\beta$ -амилоида / С.П. Радько, С.А. Хмелёва, Е.В. Супрун, С.А. Козин, Н.В. Бодоев, А.А. Макаров, А.И. Арчаков, В.В. Шумянцева // Биомедицинская химия. – 2015. – Т. 61. – №2. – С. 203-218.

4. **Хмелёва С.А.** Цинк-индуцированное взаимодействие металл-связывающего домена бета-амилоида с нуклеиновыми кислотами и гликозаминогликанами / С.А. Хмелёва, С.А. Козин, Я.Ю. Киселёва, В.А. Митькевич, А.А. Макаров, С.П. Радько // Молекулярная биология. – 2016. – Т. 50. – №6. – С. 1049-1052.
5. **Khmeleva S.A.** Zinc-mediated binding of nucleic acids to amyloid- $\beta$  aggregates: role of histidine residues / S.A. Khmeleva, S.P. Radko, S.A. Kozin, Y.Y. Kiseleva, YV. Mezentsev, V.A. Mitkevich, L.K. Kurbatov, A.S. Ivanov, A.A. Makarov // Journal of Alzheimer's Disease. – 2016. – Vol. 54. – № 2. – P. 809-819.

#### **Материалы научных конференций:**

6. **Khmeleva S.A.** Interaction of the zinc-binding domain of the beta-amyloid peptide with DNA / S.A. Khmeleva, Y.V. Mezentsev, S.P. Radko, S.A. Kozin, A.S. Ivanov, N.V. Bodoev, A.A. Makarov // Материалы I Всероссийской интернет-конференции с международным участием «Биологические основы психических расстройств». – Казань, 2012. – С. 82.
7. Mitkevich V. Mutations and modifications in the metal-binding domain of Abeta affect its zinc-induced interaction with DNA / V. Mitkevich, **S. Khmeleva**, A. Makarov, S. Radko // Proceedings of the 12th International Conference AD/PD “Mechanisms, Clinical Strategies, and Promising Treatments of Neurodegenerative Diseases”. Neurodegener. Dis. – 2015. – Vol. 15. – Suppl. 1. – P. 358.
8. **Хмелёва С.А.** Цинк-индуцированное взаимодействие различных изоформ металл-связывающего домена  $\beta$ -амилоида с ДНК / С.А. Хмелёва, Ю.В. Мезенцев, А.С. Иванов, Н.В. Бодоев, С.П. Радько // Сборник тезисов Конференция молодых учёных ИБМХ. – Москва, 2015. – С. 5.
9. Ромашова Ю.А. Сравнительный анализ методов приготовления мономеров бета-амилоидного пептида / Ю.А. Ромашова, **С.А. Хмелёва**, С.П. Радько, А.И. Арчаков, В.В. Шумянцева // Сборник тезисов 20-й Международной Пушкинской школы-конференции молодых ученых «БИОЛОГИЯ - НАУКА XXI ВЕКА». – Пушкино, 2016. – С. 186.
10. **Khmeleva S.A.** Intraneuronal amyloid-beta, zinc, and disturbance of gene expression – is there a link? / S.A. Khmeleva, S.P. Radko // Сборник тезисов 20-й Международной Пушкинской школы-конференции молодых ученых «БИОЛОГИЯ - НАУКА XXI ВЕКА». – Пушкино, 2016. – С. 166.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- БА – болезнь Альцгеймера;
- а. о. – аминокислотный остаток;
- A $\beta$  – амилоид- $\beta$ ;
- A $\beta$ <sub>42</sub> – изоформа  $\beta$ -амилоидного пептида длиной 42 а. о.;
- fA $\beta$ <sub>42</sub> – фибриллярные агрегаты A $\beta$ <sub>42</sub>
- ziA $\beta$ <sub>42</sub> – цинк-индуцированные агрегаты A $\beta$ <sub>42</sub>
- A $\beta$ <sub>16</sub> – металл-связывающий домен амилоида- $\beta$ , включающий а. о. с 1 по 16;
- вкA $\beta$  – внутриклеточный амилоид- $\beta$ ;
- Zn<sup>2+</sup> – ионы цинка;
- вкZn<sup>2+</sup> – внутриклеточный цинк;
- ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота;
- РНК – рибонуклеиновая кислота;
- НК – нуклеиновые кислоты
- п. о. – пара оснований;
- нт – нуклеотид;
- Да, кДа – дальтон, килодальтон;
- СПС – сульфированные полисахариды
- ГАГ – гликозаминогликаны
- ДС-6 – декстран сульфат со средним молекулярным весом 6 кДа;
- ДС-40 – декстран сульфат со средним молекулярным весом 40 кДа;
- ХС – хондроитин сульфат;
- Д-5 – декстран со средним молекулярным весом 5 кДа;
- МТ – металлотионеины;
- NEPES – 2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethanesulfonic acid;
- ППР – поверхностный плазмонный резонанс;
- RU – resonance units (резонансные единицы);
- ДРС – динамическое рассеяние света;