

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ  
БИОПОЛИМЕРОВ И ИХ КОМПЛЕКСОВ

УДК 577.29

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МИНИМАЛЬНОГО ЦИНК-СВЯЗЫВАЮЩЕГО ЦЕНТРА  
ПРИРОДНЫХ ИЗОФОРМ ДОМЕНА 1–16 БЕТА-АМИЛОИДА  
МЕТОДОМ ESI-MS

© 2013 г. И. А. Попов<sup>1,2,3,4,5</sup>, М. И. Индейкина<sup>1,2,3</sup>, А. С. Кононихин<sup>1,3</sup>, Н. Л. Стародубцева<sup>1</sup>,  
С. А. Козин<sup>2,5\*</sup>, А. А. Макаров<sup>2</sup>, Е. Н. Николаев<sup>1,3,4,5</sup>

<sup>1</sup>Институт энергетических проблем химической физики им. В.Л. Тальрозе Российской академии наук, Москва, 119334

<sup>2</sup>Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991

<sup>3</sup>Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук, Москва, 119334

<sup>4</sup>Московский физико-технический институт (государственный университет), Москва, 117303

<sup>5</sup>Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича Российской академии  
медицинских наук, Москва, 119334

Поступила в редакцию 10.10.2012 г.

Принята к печати 16.10.2012 г.

Болезнь Альцгеймера – смертельная нейродегенеративная патология, сопровождающаяся образованием водорастворимых нейротоксичных олигомеров бета-амилоида Аβ человека, которые затем накапливаются в виде полимерных внеклеточных агрегатов (так называемых амилоидных бляшек). Изомеризованная по аспартату 7 изоформа Аβ человека (isoАβ) – основной компонент амилоидных бляшек, и ее рассматривают в качестве потенциального патогенного агента болезни Альцгеймера. При этом существует вероятный механизм образования этой изоформы из генетически обусловленного варианта бета-амилоида D7N (мутация Тоттори). Напротив, Аβ крысы/мыши (ratАβ), который по сравнению с Аβ человека имеет три аминокислотные замены в металл-связывающем домене 1–16, не подвержен патогенной агрегации *in vivo* в отличие от других известных генетически обусловленных или химически модифицированных природных изоформ Аβ. Взаимодействие с ионами цинка играет критическую роль в агрегации мономерного Аβ человека *in vitro* и *in vivo*. В настоящей работе с использованием метода масс-спектрометрии ESI-MS высокого разрешения впервые показано, что домены 1–16 изоформ isoАβ и D7NАβ связывают ион цинка так же, как и домен 1–16 Аβ человека. В то же время структура минимального цинк-связывающего центра ratАβ существенно отличается. Полученные результаты подтверждают общий механизм взаимодействия ионов цинка с изоформами бета-амилоида человека и позволяют предположить, что модуляция структуры участка 6–14 бета-амилоида может быть использована в качестве перспективного терапевтического подхода для лечения болезни Альцгеймера.

**Ключевые слова:** структура, механизм, хелатирование, масс-спектрометрия, бета-амилоид, цинк.

IDENTIFICATION OF THE MINIMAL ZINC-BINDING CENTER IN NATURAL ISOFORMS OF AMYLOID-BETA DOMAIN 1-16 USING ESI-MS, by I. A. Popov<sup>1,3,4,5</sup>, M. I. Indeykina<sup>1,2,3</sup>, A. S. Kononikhin<sup>1,3</sup>, N. L. Starodubtseva<sup>1</sup>, S. A. Kozin<sup>2,5\*</sup>, A. A. Makarov<sup>2</sup>, E. N. Nikolaev<sup>1,3,4,5</sup> (<sup>1</sup>Tal'roze Institute for Energy Problems of Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119334 Russia; <sup>2</sup>Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia, \*e-mail: kozinsa@gmail.com; <sup>3</sup>Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119334 Russia; <sup>4</sup>Moscow Institute of Physics and Technology (State University), Moscow, 117303 Russia; <sup>5</sup>Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, 119334 Russia). Alzheimer's disease, is a lethal neurodegenerative pathology, characterized by the formation of soluble neurotoxic oligomers of the human amyloid-beta peptide Aβ, which get accumulated forming polymeric extracellular aggregates (so-called amyloid plaques). The isomerized at aspartate 7 isoform of the human Aβ (isoAβ) is the main component of these plaques and is considered as the potential pathogenic agent of AD. Besides this, there is a possible generation mechanism for this isoform from a genetically deficient D7N Aβ variant (Tottori mutation). On the contrary the rodent Aβ (rat Aβ), which has three amino acid substitutions in its metal-binding domain, is not susceptible to pathogenic aggregation *in vivo*, unlike the other known natural isoforms of Aβ. In-

Принятые сокращения: БА – болезнь Альцгеймера; ЯМР – ядерный магнитный резонанс; Аβ – бета-амилоид; CID – collision induced dissociation – столкновительная фрагментация (фрагментация ионов в столкновениях с нейтралями); D7NАβ – бета-амилоид человека, содержащий точечную мутацию D7N; ECD – electron capture dissociation – фрагментация при захвате электрона; isoАβ – изомеризованная по аспартату 7 изоформа бета-амилоида человека; MS/MS – двойная масс-спектрометрия; ESI – электроспрейная ионизация; ratАβ – бета-амилоид крысы/мыши.

\* Эл. почта: kozinsa@gmail.com

teractions with zinc ions play a crucial role in the aggregation of monomeric human A $\beta$  *in vitro* and *in vivo*. In the presented article using high resolution ESI-MS methods it was shown that domains 1–16 of isoA $\beta$  and D7NA $\beta$  bind zinc ions in the exactly the same manner as the normal human A $\beta$ 1–16, whereas ratA $\beta$  has significant differences in structure of its minimal zinc binding center. These results confirm the overall interaction mechanism between zinc ions and the humanA $\beta$  isoforms and allows to suppose that perhaps modulation of the structure of region 6–14 of A $\beta$  can be used as a promising therapeutic approach to AD treatment.

**Keywords:** structure, mechanism, chelation, mass-spectrometry, amyloid-beta, zinc.

**DOI:** 10.7868/S0026898413020122

## ВВЕДЕНИЕ

Согласно общепринятой амилоидной гипотезе возникновения болезни Альцгеймера (БА) избыточное накопление бета-амилоида (A $\beta$ ) в тканях мозга в виде внеклеточных надмолекулярных ансамблей – амилоидных бляшек – главная молекулярная причина этой нейродегенеративной патологии человека и большинства других видов млекопитающих [1]. Однако движущие силы структурного перехода A $\beta$  из физиологически нормального мономерного состояния в димеры и далее в олигомеры, которые в итоге формируют амилоидные бляшки, остаются неизвестными [2].

Ключом к пониманию механизма возникновения БА может быть анализ влияния отдельных аминокислотных остатков на структурно-функциональные свойства A $\beta$ . Действительно, одни природные варианты A $\beta$ , включая A $\beta$  человека, а также его изомеризованную по аспартату 7 изоформу (isoA $\beta$ ), накапливаются *in vivo* в виде амилоидных бляшек и таким образом участвуют в патогенезе болезни Альцгеймера [3], в то время как другие (бета-амилоид крысы/мыши, ratA $\beta$ ), отличающийся от A $\beta$  остальных млекопитающих тремя аминокислотными заменами R5G, Y10F и H14R), никогда таких бляшек не образует, и эти грызуны не подвержены данному заболеванию [4–5]. Важно отметить: что существует генетически обусловленный вариант бета-амилоида с заменой D7N, так называемой мутацией Тоттори, который ассоциирован с наследственной формой болезни Альцгеймера [6] и является наиболее вероятным предшественником изомеризованной формы, так как аспарагин очень легко может превратиться в изоаспарат [3]. Ионы цинка играют критическую роль в олигомеризации и последующей агрегации A $\beta$  человека [7]. Многочисленные попытки определить молекулярный механизм образования цинк-индуцированных димеров и олигомеров из мономерных форм A $\beta$  оказались безуспешными, так как спонтанная агрегация A $\beta$  не позволяет достоверно определять структурно-функциональные характеристики исследуемого процесса. Однако при использовании коротких синтетических аналогов A $\beta$  обнаружили, что в связывании ионов цинка главную роль играет аминокислотный участок 1–16 A $\beta$  [8–9], который позднее идентифицировали как металл-связыва-

ющий домен A $\beta$  для всех млекопитающих [10]. Недавно предположили, что именно этот домен контролирует цинк-зависимую димеризацию нативной изоформы A $\beta$  человека за счет образования специфических нековалентных связей между аминокислотными остатками взаимодействующих молекул в присутствии ионов цинка [7].

Для A $\beta$  человека ранее определен молекулярный механизм взаимодействий с ионами цинка, согласно которому один ион этого металла вначале хелатируется боковыми группами аминокислотных остатков E11, H13 и H14, а четвертую координационную связь занимает молекула воды, которая впоследствии замещается боковой группой остатка H6 [11]. Установлено, что участок 6–14 – минимальный цинк-связывающий центр A $\beta$  человека. С помощью спектроскопии ЯМР и изотермической калориметрии титрования показано, что синтетический пептид, соответствующий домену 1–16 ratA $\beta$ , образует с ионом цинка устойчивый межмолекулярный комплекс в соотношении 2 : 1, а фрагмент 6–14 образует структурное ядро цинк-связанного димера A $\beta$  крысы/мыши [12]. Молекулярный механизм образования такого димера наиболее вероятно должен включать образование комплекса [пептид] : [ион цинка] (1 : 1), однако экспериментальных данных о свойствах такого комплекса в настоящее время нет. В то же время, с помощью метода масс-спектрометрии показано, что домен 1–16 изомеризованной по аспартату 7 изоформы A $\beta$  человека (isoA $\beta$ ), выделенной из амилоидных бляшек пациентов с диагнозом болезни Альцгеймера [13], формирует цинк-индуцированные димеры в условиях, при которых домен 1–16 нативного A $\beta$  остается в мономерном состоянии [14]. Эти данные подтвердили участие ионов цинка в патогенезе БА и обосновали потенциальную роль isoA $\beta$  в качестве патогенного агента этого заболевания. Таким образом, сравнение цинк-связывающих свойств домена 1–16 нативного A $\beta$  человека, A $\beta$  крысы/мыши, а также изомеризованного по аспартату 7 A $\beta$  человека могло бы дать представление о физиологическом и патогенном взаимодействиях ионов цинка с A $\beta$ .

В настоящей работе структуры минимального цинк-связывающего центра каждой из вышеупомянутых природных изоформ A $\beta$  (A $\beta$  человека, isoA $\beta$ , D7NA $\beta$  и ratA $\beta$ ) определены с использова-

нием модернизированного методологического подхода на основе масс-спектрометрии высокого разрешения, который ранее эффективно использовали при изучении комплексов домена 1–16 нативного Аβ человека с катионами переходных металлов [15]. В этом подходе молекулярные ионы цинк-связанных комплексов синтетических 16-членных пептидов, соответствующих домену 1–16 исследуемых изоформ Аβ, подвергали столкновительной фрагментации (CID) или фрагментации при захвате электрона (ECD), а затем на основании детектируемых фрагментов определяли участки аминокислотной цепи, вовлеченные в связывание ионов цинка. В результате впервые получены данные о том, что во всех исследованных изоформах Аβ человека минимальный цинк-связывающий центр расположен на участке 6–14 аминокислотной последовательности, в то время как соответствующий центр для ratАβ расположен на участке 3–14.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В качестве объектов исследования использованы синтетические пептиды с аминокислотными последовательностями домена 1–16 Аβ человека, isoАβ, D7NAβ и ratАβ:

1. DAEFRHDSGYEVNHQK (“Аβ(1–16)”);
2. DAEFRH[isoD]SGYEVNHQK (“isoАβ(1–16)”);
3. DAEFRHNSGYEVNHQK (“D7NAβ(1–16)”);
4. DAEFGHDSGFVVRHQR (“ratАβ(1–16)”).

Структуру комплексов бета-амилоида с цинком определяли с использованием масс-спектрометрии сверхвысокого разрешения. Исследования проводили на комбинированном масс-спектрометре LTQ FT Ultra (Thermo Scientific, Бремен, Германия), в котором совмещены возможности масс-спектрометра ионного циклотронного резонанса с преобразованием Фурье и масс-спектрометра с линейной ионной ловушкой. Ионизацию проводили методом электрораспыления (ESI) с использованием ионного источника Ion Max (Thermo Scientific, Бремен, Германия) с металлическим распылительным капилляром. Параметры ионного источника: скорость подачи раствора – 1 мкл/мин, температура нагреваемого капилляра 120°C, распылительный газ выключен, напряжение на электроспрейном капилляре – 3.5 кВ, расстояние между электроспрейным и нагреваемым капиллярами – 5 мм. Исследуемые вещества подавали в ионный источник в смеси воды и метанола с добавлением  $Zn(CH_3COO)_2$ , общая концентрация пептидов в растворе составляла 10 мкМ, концентрация соли – 300 мкМ, pH 6.3, в раствор добавляли муравьиную кислоту в количестве до 0.5%. При ионизации электрораспылением образуются преимущественно многозарядные ионы пептидов и белков. В данном исследовании работу проводили в основном с ионами, заряд которых равен +4, +3, +2. При исследовании структу-

ры использовали возможности измерения масс-спектров фрагментов комплексов пептидов с цинком. Чтобы получить фрагменты исследуемых комплексов, использовали два метода фрагментации ионов в масс-спектрометре: за счет столкновений с нейтралями (CID) – реализуется в линейной ионной ловушке, и при захвате электрона (ECD) – осуществляется в измерительной ячейке ионного циклотронного резонанса. Одновременное использование двух разных методов фрагментации позволяет существенно повысить информативность исследований за счет того, что в них фрагменты образуются при разрыве разных связей: в методе CID – при разрыве пептидной связи, в методе ECD – между альфа- и бета-атомами углерода в каждой аминокислоте белка. CID- и ECD-фрагментацию различных зарядовых состояний комплексов пептид-металл осуществляли для молекулярных ионов  $[M + Zn]^{2+}$ ,  $[MH + Zn]^{3+}$  и  $[MH_2 + Zn]^{4+}$  в условиях, описанных ранее [16].

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

На рис. 1 представлены фрагменты масс-спектров, полученных для комплексов исследованных пептидов с ионами цинка. Все изоформы домена Аβ(1–16) образуют значительные популяции комплексов с ионами цинка. Чтобы локализовать цинк-связывающий домен, применяли следующую процедуру обработки данных MS/MS: для всех масс-спектров фрагментов строили таблицы (так называемые масс-листы), содержащие информацию об их массах и зарядах. Затем эти масс-листы сравнивали с таблицами теоретически возможных фрагментов исследуемой аминокислотной последовательности. Чтобы идентифицировать фрагменты, к которым присоединен атом цинка, при обработке учитывали смещение массы таких фрагментов на величину массы цинка, а также структуру изотопного распределения цинка. Суть окончательной проверки правильности идентификации ионов состоит в том, что природное изотопное распределение ионов цинка таково, что при их присоединении к пептиду изотопное распределение образующихся при этом комплексов значительно и характерным образом отличается от стандартного изотопного распределения, характерного для пептидов, несвязанных с ионами цинка, что, в конечном счете, полностью исключает возможность неверной идентификации соответствующих сигналов (рис. 2). Результаты анализа спектров фрагментации ECD и CID для исследованных пептидов представлены на рис. 3 и 4 соответственно.

Анализ спектров фрагментации ECD комплекса Аβ(1–16)/Zn<sup>2+</sup> показал, что в серии N-концевых фрагментов только ионы длиннее “с6” (“с6”–“с8”, “с10”–“с15”) связаны с ионом цинка, и, аналогично, несущий ионы цинка минимальный C-концевой фрагмент – фрагмент

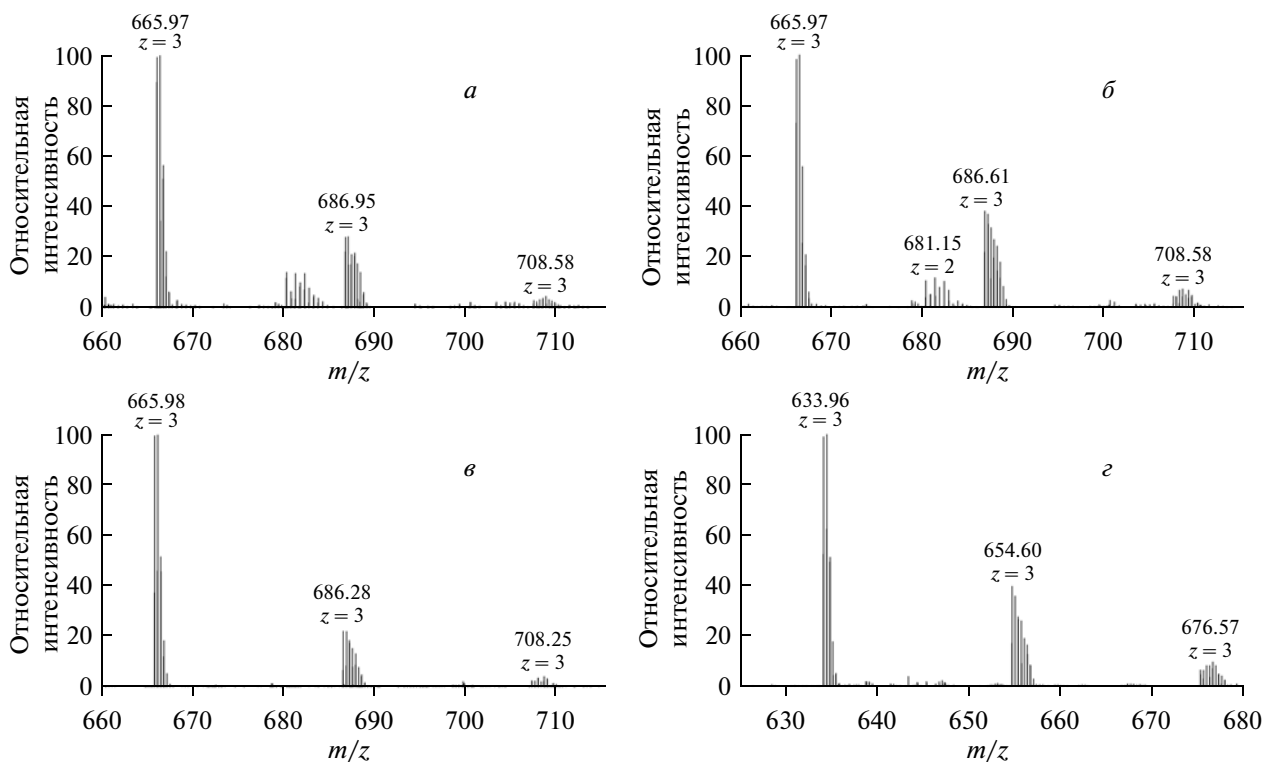


Рис. 1. Фрагменты масс-спектров, полученных для комплексов исследованных пептидов с ионами цинка. *a* –  $\text{A}\beta(1-16) + \text{Zn}^{2+}$ , *b* –  $\text{isoA}\beta(1-16) + \text{Zn}^{2+}$ , *v* –  $\text{D7N-A}\beta(1-16) + \text{Zn}^{2+}$ , *z* –  $\text{ratA}\beta(1-16) + \text{Zn}^{2+}$ .

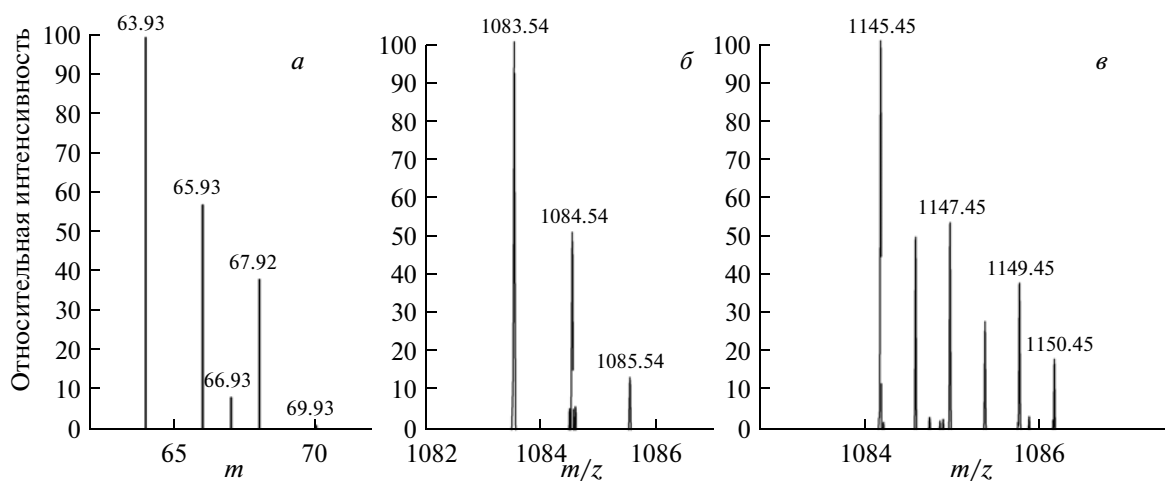
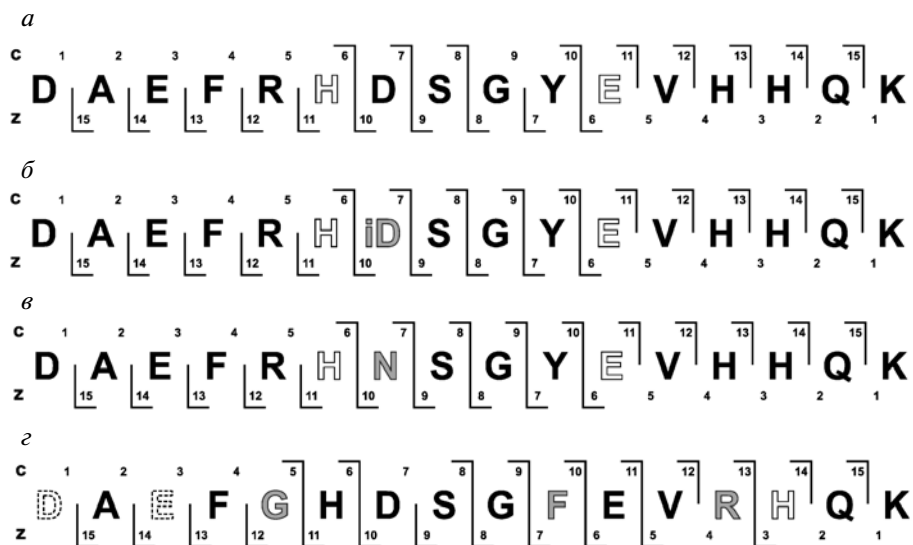


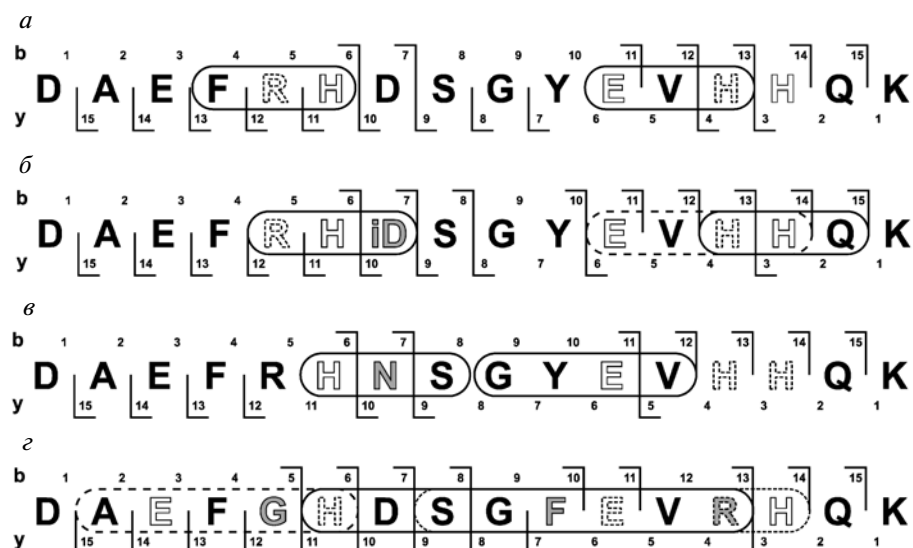
Рис. 2. Проверка правильности идентификации фрагментов с цинком по уникальной изотопной структуре. Изотопное распределение атомов цинка (*a*), фрагмента “y9” (*b*) и комплекса иона “y9” с цинком (*v*).

“z6” (“z6”–“z15” связаны с цинком). Наиболее вероятно, что связывание цинка происходит на аминокислотах H6 и E11, хотя мы не можем исключить, что в нем принимают участие участки пептида 1–6 и 11–16. Более точно локализовать сайт связывания позволяют спектры CID-фрагментации. При CID-фрагментации комплекса  $\text{A}\beta(1-16) + \text{Zn}^{2+}$  минимальными связанными с цинком N- и C-концевыми фрагментами являются ионы “b6” и “y3”, соответственно. Кроме того, при CID-фраг-

ментации наряду с N- и C-концевыми фрагментами (“b” и “y” фрагменты) образуются внутренние ионы, несущие цинк, среди них минимальным являются ионы FRH на N-концевом участке и EVNH на C-конце. Данные CID-фрагментации свидетельствуют о том, что в комплексе  $\text{A}\beta(1-16)/\text{Zn}^{2+}$  ион цинка координируется четырьмя остатками из R5, H6, E11, H13 и H14. Причем ключевую роль, наиболее вероятно, играют остатки гистидина-6, глутамата-11 и гистидина-



**Рис. 3.** Идентифицированные методом ECD несущие цинк фрагменты комплексов  $A\beta(1-16) + Zn^{2+}$  (a),  $isoA\beta(1-16) + Zn^{2+}$  (б),  $D7N-A\beta(1-16) + Zn^{2+}$  (в) и  $ratA\beta(1-16) + Zn^{2+}$  (г). Серым цветом обозначены аминокислоты, отличающиеся в каждой изоформе от нативной формы человеческого  $A\beta$ . Изоаспаратат – iD. Наиболее вероятные хелаторы цинка выделены белым, причем те аминокислоты, которые нельзя обоснованно выбрать на основе полученных МС/МС-данных, оконтурены пунктиром.



**Рис. 4.** Идентифицированные методом CID несущие цинк фрагменты комплексов  $A\beta(1-16) + Zn^{2+}$  (a),  $isoA\beta(1-16) + Zn^{2+}$  (б),  $D7N-A\beta(1-16) + Zn^{2+}$  (в),  $ratA\beta(1-16) + Zn^{2+}$  (г). Аминокислоты, отличающие каждую изоформу от нативной формы человеческого  $A\beta$ , выделены серым. Изоаспаратат обозначен как iD. Овалами показаны минимальные обнаруженные внутренние ионы (сплошная и пунктирная линии использованы для подчеркивания границ у пересекающихся фрагментов). Наиболее вероятные хелаторы цинка белого цвета, причем те аминокислоты, среди которых нельзя сделать обоснованный выбор на основе полученных MS/MS-данных, имеют пунктирный контур.

14, так как только концевые фрагменты, содержащие эти аминокислотные остатки, несут ионы цинка, а между аргинином-5 и гистидином-13, исходя из полученных данных, нельзя сделать обоснованного выбора.

При ECD-фрагментации комплексов  $isoA\beta(1-16) + Zn^{2+}$  картина наблюдаемых фрагментов в целом похожа на картину фрагментов

комплекса  $A\beta(1-16) + Zn^{2+}$ : обнаружены концевые фрагменты, связанные с цинком, “сб”–“с15” и “z6”–“z15”. При уточнении наблюдаемой картины с помощью метода CID выявлены концевые фрагменты (“b6”–“b8”, “b10”–“b15”) а также “y3”, “y6”, “y8”–“y15”) и внутренние фрагменты RHD, EVNH, NHQ. Таким образом, в качестве основных хелаторов цинка мы можем выделить аминокислоты H6, E11 и H14. Четвер-

тым хелатором цинка может быть либо R5, либо H13, ни один из них нельзя исключить, основываясь только на масс-спектрометрических данных.

Картины фрагментации комплексов D7N- $\text{A}\beta(1-16) + \text{Zn}^{2+}$  и  $\text{isoA}\beta(1-16) + \text{Zn}^{2+}$  практически не отличаются, в частности, в ECD-фрагментации они полностью совпадают. Отличия обнаружены только при CID-фрагментации: среди образующихся фрагментов концевые фрагменты “b6”, “b7”, “b11”–“b15”, а также “y5”, “y9”, “y10”, “y13”–“y15” и внутренние фрагменты HNS и GYEV связаны с цинком. Таким образом, в качестве основных хелаторов цинка мы можем указать аминокислоты H6 и E11, а также H13 и/или H14.

Фрагментация комплекса  $\text{ratA}\beta(1-16) + \text{Zn}^{2+}$  имеет существенные отличия. В спектре ECD фрагменты “c5”–“c6” и “c8”–“c15”, а также “z3”, “z5”–“z15” несут на себе цинк. При CID- и ECD-фрагментациях обнаружены множественные, в том числе крупные фрагменты, связанные с цинком, а именно фрагменты “b5”–“b8”, “b10”–“b11”, “b13”–“b15”, “y3”, “y7”–“y15”, а также крупные внутренние фрагменты – AEFGH, HDSGFEVR и SGFEVRH. Анализ картины фрагментации показывает, что наиболее вероятными хелаторами цинка могут быть аминокислоты E3 и H14, в качестве двух других хелаторов цинка – остатки H6, E11 и R13, которые нельзя обоснованно исключить, основываясь только на масс-спектрометрических данных.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Сводная информация об аминокислотах, участвующих в связывании цинка согласно полученным MS/MS-данным, представлена в таблице. Однако этих данных недостаточно для достоверного определения цинк-связывающих центров исследованных изоформ  $\text{A}\beta$  вследствие объективных ограничений, сопровождающих использование метода масс-спектрометрии. Следует учитывать дополнительные сведения из опубликованных источников о взаимодействии ионов цинка с полипептидами вообще и с молекулами  $\text{A}\beta$  в частности. Известно, что в белках координационное число цинка равно четырем, а в роли специфических хелаторов этого иона чаще всего выступают боковые группы гистидина и глутаминовой кислоты. Ранее нами определена пространственная структура комплекса  $\text{A}\beta(1-16) + \text{Zn}^{2+}$  методом спектроскопии ЯМР [9] и показано, что в этой структуре остаток аргинина исключен из координационной сферы цинка. Таким образом, роль аргинина в хелатировании иона цинка по данным использованного в настоящей работе масс-спектрометрического подхода представляется методическим артефактом. Следовательно, минимальным цинк-связывающим центром пептида  $\text{A}\beta(1-16)$  яв-

Сводная информация об аминокислотах, участвующих в связывании цинка, согласно полученным MS/MS данным

Комплекс	Аминокислотная последовательность
$\text{A}\beta(1-16) + \text{Zn}^{2+}$	DAEFRHDSGYEVHHQK
$\text{isoA}\beta(1-16) + \text{Zn}^{2+}$	DAEFRHDSGYEVHHQK
$\text{D7N-A}\beta(1-16) + \text{Zn}^{2+}$	DAEFRHNSGYEVHHQK
$\text{ratA}\beta(1-16) + \text{Zn}^{2+}$	DAEFGHDSGFEVRHQK

Примечание. Вероятные хелаторы цинка выделены жирным шрифтом.

ляется участок 6–14, в котором ион цинка координируется аминокислотными остатками H6, E11, H13 и H14. Этот вывод полностью соответствует данным о структуре минимального центра связывания цинка домена  $\text{A}\beta(1-16)$  [11], Поэтому при анализе масс-спектрометрических данных, полученных для  $\text{isoA}\beta(1-16) + \text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{D7N-A}\beta(1-16) + \text{Zn}^{2+}$  и  $\text{ratA}\beta(1-16) + \text{Zn}^{2+}$ , мы также считаем, что координационное число цинка в этих комплексах равно четырем, а аргинин не принимает участия в хелатировании иона цинка. Вышеизложенное допущение позволяет на основе полученных с помощью масс-спектрометрии результатов (таблица) сделать вывод о том, что для изоформ  $\text{isoA}\beta$  и  $\text{D7N-A}\beta$  минимальным цинк-связывающим центром является участок 6–14, а для комплекса  $\text{ratA}\beta(1-16) + \text{Zn}^{2+}$  этот центр расположен на участке 3–14. Координационные сферы ионов цинка в изоформах  $\text{isoA}\beta$  и  $\text{D7N-A}\beta$  образованы аминокислотными остатками H6, E11, H13 и H14. Таким образом, несмотря на различия в составе полипептидных цепей, природные варианты бета-амилоида человека, исследованные в данной работе, обладают схожей структурой цинк-связывающих центров. Эти результаты предполагают наличие общего механизма взаимодействия ионов цинка с изоформами  $\text{A}\beta$  человека, Учитывая тот факт, что изомеризация аспартата в положении 7 играет критическую роль в способности соответствующей изоформы бета-амилоида ( $\text{isoA}\beta$ ) подвергаться цинк-зависимой олигомеризации [14], можно предположить, что направленная модуляция структуры участка 6–14 бета-амилоида может быть использована в качестве перспективного терапевтического подхода для лечения болезни Альцгеймера.

В отличие от изоформ  $\text{A}\beta$  человека, в которых тетрапептид EVHH (участок 11–14) предоставляет сразу три хелатора для иона цинка (E11, H13 и H14) и, как следствие, является предельно компактным сайтом первичного распознавания иона цинка [11, 17],  $\text{ratA}\beta$  имеет более симметричную и “растянутую” в пространстве структуру центра связывания цинка, образованного аминокислотными остатками E3, H6, E11 и H14. Ранее нами установлено, что  $\text{ratA}\beta$  образует устойчивые

цинк-индуцированные димеры, в которых каждая из мономерных субъединиц предоставляет по два аминокислотных остатка (H6 и H14) для координации иона цинка [12]. Эти данные показывают, что существенная часть аминокислот, принимающих участие в хелатировании иона цинка мономерным  $\text{ratA}\beta$ , продолжает координировать этот ион и в димерах. Важно отметить, что топология цинк-связанных димеров  $\text{ratA}\beta$  исключает дальнейшее образование плотно упакованных амилоидных агрегатов [12], в то время как  $\text{A}\beta$  человека после связывания с ионом цинка имеет высокий потенциал для патогенной полимеризации [7].

Таким образом, значительные различия между  $\text{A}\beta$  человека и  $\text{A}\beta$  крысы/мышы в структуре их комплексов с ионами цинка могут объяснять и различия в агрегационной способности этих молекул. Так как образование амилоидных агрегатов – один из важнейших признаков протеинопатий [18], то выявленные в настоящей работе структурные особенности минимальных цинк-связывающих центров природных изоформ  $\text{A}\beta$  могут быть использованы в дальнейшем при создании эффективных антиагрегационных средств для лечения болезни Альцгеймера.

Авторы выражают благодарность за поддержку работы Российскому фонду фундаментальных исследований (12-08-33089, 10-04-13306-РТ\_оми, 11-04-01367-а), Министерству образования и науки Российской Федерации (государственные контракты 14.132.21.1780, 14.132.21.1779, 8149 и 16.512.11.2081), а также Президиуму РАН (Программа фундаментальных исследований “Молекулярная и клеточная биология”).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Hardy J., Selkoe D.J. 2002. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science*. **297**, 353–356.
- Karran E., Mercken M., De Strooper B. 2011. The amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease: an appraisal for the development of therapeutics. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **10**, 698–712.
- Shimizu T., Watanabe A., Ogawara M., Mori H., Shirasawa T. 2000. Isoaspartate formation and neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Arch. Biochem. Biophys.* **381**, 225–234.
- De Strooper B., Simons M., Multhaup G., van Leuven F., Beyreuther K., Dotti C.G. 1995. Production of intracellular amyloid-containing fragments in hippocampal neurons expressing human amyloid precursor protein and protection against amyloidogenesis by subtle amino acid substitutions in the rodent sequence. *EMBO J.* **14**, 4932–4938.
- Shivers B.D., Hilbich C., Multhaup G., Salbaum M., Beyreuther K., Seeburg P.H. 1988. Alzheimer's disease amyloidogenic glycoprotein: expression pattern in rat brain suggests a role in cell contact. *EMBO J.* **7**, 1365–1370.
- Wakutani Y., Watanabe K., Adachi Y., Wada-Isoe K., Urakami K., Ninomiya H., Saido T.C., Hashimoto T., Iwatsubo T., Nakashima K. 2004. Novel amyloid precursor protein gene missense mutation (D678N) in probable familial Alzheimer's disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* **75**, 1039–1042.
- Miller Y., Ma B., Nussinov R. 2010. Zinc ions promote Alzheimer Abeta aggregation via population shift of polymorphic states. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **107**, 9490–9495.
- Kozin S.A., Zirah S., Rebuffat S., Hoa G.H., Debey P. 2001. Zinc binding to Alzheimer's Abeta(1-16) peptide results in stable soluble complex. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **285**, 959–964.
- Zirah S., Kozin S.A., Mazur A.K., Blond A., Cheminant M., Segalas-Milazzo I., Debey P., Rebuffat S. 2006. Structural changes of region 1-16 of the Alzheimer disease amyloid beta-peptide upon zinc binding and in vitro aging. *J. Biol. Chem.* **281**, 2151–2161.
- Faller P. 2009. Copper and zinc binding to amyloid-beta: coordination, dynamics, aggregation, reactivity and metal-ion transfer. *Chem. Biochem.* **10**, 2837–2845.
- Tsvetkov P.O., Kulikova A.A., Golovin A.V., Tkachev Y.V., Archakov A.I., Kozin S.A., Makarov A.A. 2010. Minimal Zn(2+) binding site of amyloid-beta. *Biophys. J.* **99**, L84–86.
- 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 abeta(1-16): toward understanding the mechanism of rats' resistance to Alzheimer's disease. *Biophys. J.* **102**, 136–143.
- Roher A.E., Lowenson J.D., Clarke S., Wolkow C., Wang R., Cotter R.J., Reardon I.M., Zurcher-Neely H.A., Heinrichson R.L., Ball M.J., et al. 1993. Structural alterations in the peptide backbone of beta-amyloid core protein may account for its deposition and stability in Alzheimer's disease. *J. Biol. Chem.* **268**, 3072–3083.
- Tsvetkov P.O., Popov I.A., Nikolaev E.N., Archakov A.I., Makarov A.A., Kozin S.A. 2008. Isomerization of the Asp7 residue results in zinc-induced oligomerization of Alzheimer's disease amyloid beta(1-16) peptide. *Chem-biochem.* **9**, 1564–1567.
- Zirah S., Rebuffat S., Kozin S.A., Debey P., Fournier F., Lesage D., Tabet J.C. 2003. Zinc binding properties of the amyloid fragment Abeta(1-16) studied by electrospray-ionization mass spectrometry. *Int. J. Mass. Spectrometry.* **228**, 999–1016.
- Indeykina M.I., Popov I.A., Kozin S.A., Kononikhin A.S., Kharybin O.N., Tsvetkov P.O., Makarov A.A., Nikolaev E.N. 2011. Capabilities of MS for analytical quantitative determination of the ratio of alpha- and betaAsp7 isoforms of the amyloid-beta peptide in binary mixtures. *Anal. Chem.* **83**, 3205–3210.
- 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-beta metal-binding domain 1-16 is mediated by residues 11–14. *Mol. Biosyst.* **7**, 1053–1055.
- Шелковникова Т.А., Куликова А.А., Цветков Ф.О., Peters O., Бачурин С.О., Бухман В.Л., Нинкина Н.Н. 2012. Протеинопатии – формы нейродегенеративных заболеваний, в основе которых лежит патологическая агрегация белков. *Молекуляр. биология.* **46**, 402–415.