

РОЛЬ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ ЦИНКА И БЕТА-АМИЛОИДА В ПАТОГЕНЕЗЕ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА

©2023 г.

С. А. КОЗИН

*Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта
Российской академии наук, Москва*

I. Введение. II. Молекулярный механизм образования мономерных цинксвязанных комплексов бета-амилоида. III. Молекулярный механизм цинкзависимой олигомеризации бета-амилоида. IV. Использование изоформ бета-амилоида для модулирования церебрального амилоидогенеза в трансгенных моделях болезни Альцгеймера. V. Цинковый комплекс isoD7-A β как необходимый и достаточный агент инициирования амилоидогенеза *in vivo*. VI. Заключение.

I. ВВЕДЕНИЕ

Болезнь Альцгеймера (синоним – деменция альцгеймеровского типа) представляет собой наиболее распространённую форму первичных дегенеративных деменций позднего возраста, которая характеризуется постепенным малозаметным началом в пресенильном или старческом возрасте, неуклонным прогрессированием расстройств памяти и высших корковых функций вплоть до тотального распада интеллекта и психической деятельности в целом, а также характерным комплек-

Принятые сокращения: а.о. – аминокислотный остаток; БА – болезнь Альцгеймера; ЦА – церебральный амилоидогенез при болезни Альцгеймера; ЯМР – ядерный магнитный резонанс; А β – бета-амилоид; А β (i-j) – непрерывный линейный фрагмент с i-ой позиции по j-ую позицию аминокислотной последовательности человеческого А β , ¹DAEFRHDSGYEVNHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA⁴² (в стандартных однобуквенных кодах); HAEE – тетрапептид Acetyl-HAEE-NH₂; isoD7 – изомеризованный аминокислотный остаток D7 бета-амилоида; isoD7-A β – изоформа бета-амилоида с isoD7; pS8 – фосфорилированный аминокислотный остаток S8 бета-амилоида; pS8-A β – изоформа бета-амилоида с pS8; SPR – поверхностный плазмонный резонанс (Surface Plasmon Resonance).

Адрес для корреспонденции: e-mail: kozinsa@gmail.com

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 19-74-30007).

сом нейропатологических признаков [1]. По оценкам на 2020 год, 5,8 миллиона жителей США в возрасте 65 лет и старше страдают от деменции альцгеймеровского типа [2]. Проецируя эти данные на Россию, можно предполагать, что число граждан РФ с диагнозом болезни Альцгеймера составляет около 1,5 миллионов человек. Более 35 миллионов человек во всем мире страдали от всех типов деменции в 2010 году, когда ежегодные затраты оценивались в 604 миллиарда долларов США; ожидается, что к 2050 году число людей с деменцией превысит 115 миллионов [3]. По данным Всемирной Организации Здравоохранения, болезнь Альцгеймера (БА) является наиболее распространенной причиной деменции (приобретенного слабоумия) – на неё приходится 60–70% всех случаев [4].

В мировой клинической практике используются лишь несколько препаратов для лечения БА, которые включают ингибиторы ацетилхолинэстеразы донепезил, ривастигмин и галантамин (одобрены в США правительственным Агентством по администрированию продуктов питания и лекарств, the US Food and Drug Administration (FDA), в 1996 г., 1998 г. и 2001 г., соответственно), а также неконкурентный антагонист рецептора N-метил-D-аспартата мемантин (одобрен FDA в 2003 г.) [5]. Полезность этих препаратов ограничена, поскольку они обеспечивают лишь частичное облегчение симптомов пациентам с деменцией и не могут изменить ход развития БА [6].

Начиная с середины 1980-х годов, идёт постоянное накопление знаний о молекулярно-биологических аспектах БА [7] и использование этих знаний для разработки эффективных методов терапии данной патологии [8, 9]. В настоящее время БА определяется следующим нейропатологическим профилем: (1) отложение агрегатов бета-амилоида (A β) в форме диффузных и амилоидных (нейритических, сенильных) бляшек и (2) присутствие нейрофибриллярных клубков (внутринейрональных) и нейропильных нитей (в дистрофических нейритах), состоящих из агрегированного гиперфосфорилированного белка тау [10, 11]. Данные патоморфологические признаки наблюдаются в коре головного мозга [12, 13], но особенно распространены в гиппокампе, области мозга, критической для обучения и памяти, где амилоидные бляшки, нейрофибриллярные клубки и нейропильные нити появляются на самых ранних стадиях БА [14, 15]. Помимо классических нейропатологических признаков, БА характеризуется системными аномалиями и нарушениями метаболизма мозга, которые проявляются на молекулярном и биохимическом уровнях и включают холинергическую недостаточность [16], нейровоспаление, активацию апоптоза, митохондриальную дисфункцию, метаболические нарушения и хронический окислительный стресс [17].

Подавляющее большинство экспериментальных сведений о патологической физиологии БА свидетельствуют в пользу гипотезы амилоидного каскада патогенеза БА [18, 19]. Данная гипотеза постулирует, что накопление агрегатов Аβ в головном мозге (церебральный амилоидогенез) запускает сигнальный каскад, который вызывает патологическую трансформацию белка тау, нейровоспаление и нейродегенерацию. Факторами, повышающими риск заболевания или влияющими на патологические процессы, являются семейные мутации, травмы головного мозга, образ жизни и особенности окружающей среды, воспалительные процессы и сердечно-сосудистые заболевания [20]. Таким образом, агрегация Аβ может быть ключевым событием в иницировании патологического каскада БА, в то время как нейровоспаление и накопление белка тау могут быть основными движущими силами нейродегенерации [6]. В зависимости от стадии заболевания, предложена следующая идеализированная последовательность терапевтического вмешательства при лечении БА [20]: (1) ингибирование образования и/или агрегации Аβ; (2) удаление агрегатов Аβ и/или нейтрализация токсичности таких агрегатов; (3) блокирование внеклеточного распространения белка тау; (4) защита от токсических эффектов белка тау; (5) компенсация клеточных дисфункций; (6) регенерация поражённых нейрональных клеток; (7) симптоматическая терапия. На протяжении последних 30 лет именно Аβ, а также олигомеры и агрегаты Аβ являются наиболее исследуемыми и используемыми в клинических испытаниях объектами в качестве лекарственных мишеней для разработок болезнь-модифицирующих терапевтических стратегий при патогенезе БА [21].

В норме эндогенный Аβ представляет собой полипептид из 39–43 аминокислотных остатков (а.о.) [22]. Пептид Аβ образуется при протеолизе белка-предшественника амилоида [22] и присутствует как в тканях мозга, так и в периферических органах [23]. Физиологическая роль Аβ может включать регуляцию синаптической функции, защиту от инфекций, восстановление поврежденных участков гематоэнцефалического барьера и компенсацию последствий травмы [24]. При патогенезе БА в биологических жидкостях организма появляются растворимые димеры и олигомеры Аβ, которые при связывании с клеточными рецепторами вызывают дисфункцию и дегенерацию синапсов [25]. Предполагается, что на поздних стадиях БА олигомеры Аβ находятся в динамическом равновесии с агрегированными молекулами Аβ амилоидных бляшек [26]. Последовательность наиболее часто встречающегося в амилоидных бляшках бета-амилоида, Аβ(1–42), содержит 42 а.о. [27]. Помимо Аβ и его

химически модифицированных изоформ [28], амилоидные бляшки содержат множество других компонентов, включая протеогликаны, углеводсвязывающие белки врожденной иммунной системы, нуклеиновые кислоты, ионы переходных металлов (Zn(II), Cu(II), Fe(II)), липиды и транспортные белки [29]. Считается, что такие компоненты могут серьезно влиять на процессы агрегации Аβ при патогенезе БА [30].

Анализ морфологии амилоидных фибрилл, выделенных из тканей мозга пациентов с диагнозом БА, показал, что несмотря на полиморфность фибрилл все они состоят из протофиламентов с аналогичной структурой [31]. Пространственная структура растворимых мономеров и олигомеров Аβ в физиологически релевантных условиях недоступна вследствие спонтанной агрегации Аβ при концентрациях, необходимых для исследования современными физико-химическими методами [32]. Общепринято, что конформационное превращение и агрегация мономерных молекул Аβ происходит по зародышевому механизму [33–35]. Согласно этому механизму, за медленной и термодинамически неблагоприятной фазой зародышеобразования следует стадия быстрой полимеризации. При этом в фазе зародышеобразования этапом, определяющим интегральную скорость всей агрегации, является формирование стабильного зародыша полимеризованного белка. В составе зародыша должен обязательно находиться Аβ в олигомерном состоянии, но роль дополнительных молекулярных агентов, которые наряду с Аβ присутствуют в амилоидных бляшках, в появлении зародыша патологической агрегации Аβ также представляется весьма существенной [36].

Ряд наблюдений указывает на возможное участие взаимодействий Аβ с ионами цинка в патогенезе БА [37]: (1) амилоидные бляшки содержат аномально высокие количества ионов цинка [38]; (2) цинк связывается с Аβ и вызывает его быструю агрегацию [39], предположительно, вследствие модулирования конформационного превращения Аβ и популяционного сдвига равновесия полиморфных состояний Аβ [40]; (3) в постмортальных образцах тканей мозга пациентов с диагнозом БА области повышенной концентрации цинка совпадают с местами образования амилоидных бляшек [41]; (4) области мозга, наиболее затронутые патологией БА, насыщены цинксодержащими аксонами, в то время как области мозга, менее затронутые патологией, содержат незначительные количества цинксодержащих окончаний [42]. Цинк является вторым (после железа) по содержанию микроэлементом в мозге человека [43] и служит незаменимым структурным и каталитическим компонентом

для более чем 10% белков, кодируемых в геноме человека [44]. При физиологической норме цинк участвует в модулировании синаптической пластичности, может регулировать нейрогенез, миграцию и дифференцировку нейронов, играет роль в нейротрансмиссии [45], а также обладает нейропротекторными свойствами и может защищать от окислительного стресса [46, 47]. Несмотря на то, что физиологические функции цинка и Аβ во многом пересекаются, а при патогенезе БА цинк и Аβ являются основными компонентами амилоидных бляшек и находятся в непосредственном контакте друг с другом, до начала 2000-х годов литературные данные о кооперативных эффектах Аβ и цинка практически отсутствовали [48].

В настоящем обзоре обсуждаются современный уровень фундаментальных знаний о молекулярных механизмах цинк-зависимых взаимодействий Аβ и возможности использования таких знаний для определения молекулярных агентов и событий, которые могут запускать или же останавливать потенциально патогенные процессы цинк-зависимой олигомеризации и агрегации Аβ при болезни Альцгеймера.

II. МОЛЕКУЛЯРНЫЙ МЕХАНИЗМ ОБРАЗОВАНИЯ МОНОМЕРНЫХ ЦИНКСВЯЗАННЫХ КОМПЛЕКСОВ БЕТА-АМИЛОИДА

Способность молекул Аβ связывать ионы цинка впервые была показана в 1994 г. на примере Аβ(1–40) [39]. Однако, установить механизм взаимодействия Аβ с ионами цинка долгое время было невозможно вследствие быстрой цинк-индуцированной агрегации как наиболее распространённых в организме полноразмерных вариантов Аβ, Аβ(1–40) и Аβ(1–42), так и усеченных по С-концу изоформ Аβ, в частности, Аβ(1–28) [39, 49–53]. Косвенные данные указывали на то, что именно на участке 1–28 бета-амилоида находятся ответственные за хелатирование ионов цинка аминокислотные остатки. В 2001 г. с использованием метода спектроскопии кругового дихроизма было показано, что: (1) синтетический аналог участка 1–16 Аβ в форме пептида Аβ(1–16), на N- и С-концах которого имелись ацетильная и амидная защитные группы, соответственно, специфически связывает ион цинка со стехиометрией 1 : 1; (2) эквимольный комплекс Аβ(1–16) с ионом цинка (Аβ(1–16)/Zn²⁺) растворим и стабилен в течение нескольких месяцев в водных буферных системах при нейтральных рН; (3) связывание иона цинка вызывает изменение конформации пептида в сторону более структурированного состояния [54]. Таким образом, область 1–16 (Аβ(1–16)) в различных изоформах Аβ была

идентифицирована как автономный цинксвязывающий домен. Методом масс-спектрометрии с электрораспылительной ионизацией (ESI-MS) в экспериментах по столкновительной фрагментации (CID) катионизированной формы комплекса $A\beta(1-16)/Zn^{2+}$ было показано, что по сравнению с другими катионами металлов (Ni^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+}) только ион цинка участвует в образовании стабильного эквимольного комплекса с $A\beta(1-16)$, который существует в газовой фазе после мягкой десольватации, и также была выявлена роль трёх гистидинов (H6, H13 и H14) в хелатировании иона цинка [55].

Конформационная пластичность домена $A\beta(1-16)$ и контрольного пептида $A\beta(1-10)$ при взаимодействии с ионами цинка была исследована иммуноферментным анализом [56]. Известно, что модификация аффинности специфических антител к антигену белковой природы может быть использована для характеристики конформационных изменений в антигене, вызванных связыванием катионов металлов, которые либо повышают, либо снижают доступность эпитопов тестируемой белковой молекулы. В качестве молекулярных проб были использованы моноклональные антитела 6E10 и Bam-10, которые распознают эпитоп ${}^4FRHDSGY^{10}$ на участке 1–16 $A\beta$. Было обнаружено, что в отличие от $A\beta(1-10)$, связывание $A\beta(1-16)$ с ионом цинка приводило к резкому усилению связывания антител с этим эпитопом. Такое усиленное распознавание эпитопа ${}^4FRHDSGY^{10}$ обоими антителами свидетельствует о значительных индуцированных цинком конформационных изменениях $A\beta(1-16)$ при образовании цинксвязанного комплекса.

Сведения о пространственной структуре домена $A\beta(1-16)$ как в свободном состоянии, так и в цинксвязанном комплексе в водных буферных растворах были получены методами спектроскопии ЯМР и молекулярного моделирования [57] (рис. 1). В свободном $A\beta(1-16)$ N-концевой участок ${}^1DAEFRH^6$ не обладает жёстко определённой конформацией, тогда как нерегулярная структура была охарактеризована в части ${}^7DSGYEVHMQ^{15}$, включая поворот с центром на остатках ${}^7DS^8$. Ориентация боковых цепей аминокислотных остатков в C-концевой области предполагает наличие стабилизирующих внутримолекулярных водородных связей с участием пар D7/K16 и E11/H13, а также карбонильной группы основной цепи H14 и боковой цепи Y10. Также в структуре $A\beta(1-16)$ имеется изгиб в области ${}^9GYEV^{12}$. При связывании иона цинка топология основной полипептидной цепи комплекса $A\beta(1-16)/Zn^{2+}$ на участке ${}^7DSGYEVHMQ^{15}$ остаётся в целом без изменений, однако, участок ${}^1DAEFRH^6$ приобретает чёткую конформацию, и структура цинксвя-

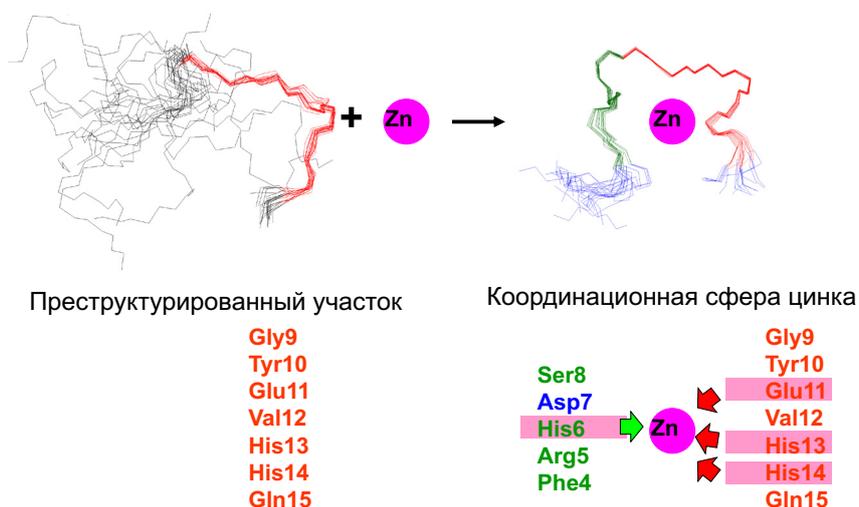


Рис. 1. Схема молекулярного механизма образования водорастворимого мономерного цинксвязанного комплекса пептида Аβ(1–16).

званного комплекса становится значительно более компактной по сравнению со свободным пептидом. В Аβ(1–16)/Zn²⁺ катион Zn²⁺ тетраэдрически координирован аминокислотными остатками Н6, Н13 и Н14 через их атомы N-1, N-2 и N-1, соответственно, а также а.о. Е11 через карбоксильную группу его боковой цепи. Замена а.о. D7 на его изомеризованный вариант (isoD7), которая является наиболее распространённой болезнью-ассоциированной спонтанной химической модификацией в домене 1–16 Аβ [58], приводило к локальному изменению конформации isoD7-Аβ(1–16) на участке ⁶HDS⁸, но общая пространственная организация isoD7-Аβ(1–16) оставалась такой же, как у Аβ(1–16). Однако, в отличие от Аβ(1–16), пептид isoD7-Аβ(1–16) в аналогичных экспериментальных условиях в присутствии ионов цинка быстро агрегировал и выпадал в осадок, что исключило возможность определения пространственной структуры цинксвязанного isoD7-Аβ(1–16) методом ЯМР.

Для определения молекулярных детерминант образования цинксвязанного комплекса Аβ(1–16) были использованы метод калориметрии изотермического титрования (ИТС), метод спектроскопии ЯМР и комбинированный метод квантовой механики/молекулярной механики (QM/ММ). Установлено, что участок ⁶HDSGYEVHH¹⁴ Аβ (Аβ(6–14)) является минимальным цинксвязывающим центром Аβ, в котором аминокислотные остатки Н6, Е11, Н13 и Н14 образуют

тетраэдрическую координационную сферу иона цинка [59]. Тетрапептидный фрагмент $^{11}\text{EVNH}^{14}$ A β (A β (11–14)) является первичным центром распознавания иона цинка и образует комплекс с ионом цинка, в котором внешняя молекула воды предоставляет четвертую координационную связь. Пептидный аналог фрагмента A β (11–14)) легко образует димеры, связанные через ион цинка, аналогично модели, предложенной для цинкзависимой агрегации A β [40]. Сегмент $^1\text{DAEFR}^5$ A β не участвует во взаимодействии с ионами цинка, но в свободном A β (1–16) аминокислотные остатки D1 и E3 из этого сегмента образуют водородную связь с а.о. H6 и, таким образом, могут частично затруднять участие а.о. H6 в хелатировании иона цинка. Последнее предположение основано на том, что аффинность к ионам цинка у A β (6–14) примерно в 5 раз выше чем у A β (1–16). Важно отметить, что в отличие от комплекса A β (1–16)/Zn $^{2+}$, пептид A β (6–14) образует видимые агрегаты при взаимодействии с ионами цинка в калориметрической ячейке, но так как эта агрегация не влияет на стехиометрию связывания Zn $^{2+}$, то был сделан вывод о том, что цинкзависимая агрегация A β (6–14) происходит не через опосредованные цинком межмолекулярные интерфейсы, но через гидрофобные взаимодействия комплексов A β (1–16)/Zn $^{2+}$ между собой подобно тому, как это было показано ранее на примере цинкзависимой агрегации A β [60].

Таким образом, в молекулах A β участок аминокислотной последовательности 1–16 представляет собой цинксвязывающий домен, в котором фрагмент $^6\text{HDSGYEVNH}^{14}$ является минимальным цинксвязывающим центром. При связывании с доменом 1–16 бета-амилоида ион цинка сначала образует три координационные связи с аминокислотными остатками E11, H13 и H14 из пререструктурированного фрагмента $^7\text{DSGYEVNHQ}^{15}$, а затем образуется четвертая координационная связь с а.о. H6 и, как следствие, происходит структурирование фрагмента $^1\text{DAEFRH}^6$, что приводит к появлению компактной конформации всего домена 1–16, в котором один ион цинка тетраэдрически координирован аминокислотными остатками H6, H13 и H14 через их атомы N-1, N-2 и N-1, соответственно, а также аминокислотным остатком E11 через карбоксильную группу его боковой цепи.

III. МОЛЕКУЛЯРНЫЙ МЕХАНИЗМ ЦИНКЗАВИСИМОЙ ОЛИГОМЕРИЗАЦИИ БЕТА-АМИЛОИДА

Физиологическая роль растворимых мономерных цинковых комплексов Аβ остаётся неизвестной, скорее всего, такие комплексы являются нормальными участниками физиологических процессов, но с изменёнными по сравнению со свободными молекулами Аβ функциями. Однако, изменения в механизме взаимодействия молекул Аβ с ионами цинка под влиянием химических модификаций аминокислотных остатков из домена 1–16 могут иметь критическое значение для потенциально патогенной цинкзависимой олигомеризации Аβ. Очевидно, что субъединица цинк-индуцированного олигомера Аβ принимает участие в образовании, по крайней мере, двух цинкзависимых межмолекулярных интерфейсов. Нативный Аβ имеет лишь один высокоаффинный центр связывания цинка, но под влиянием химических модификаций аминокислотных остатков в домене 1–16 могут образоваться склонные к цинкзависимой олигомеризации изоформы Аβ.

Как нативный, так и изомеризованный по остатку D7 домены бета-амилоида, Аβ(1–16) и isoD7-Аβ(1–16), связывают ион цинка с одинаковой стехиометрией (1 : 1) и с практически равными константами ассоциации ($(1,7 \pm 0,4) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ и $(1,3 \pm 0,4) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, соответственно) [61]. Однако, термодинамические профили связывания иона цинка этими пептидами различаются: для Аβ(1–16) $\Delta H = -3,8 \pm 0,2 \text{ ккал} \times \text{M}^{-1}$ и $T\Delta S = 2,0 \pm 0,1 \text{ ккал} \times \text{M}^{-1}$; для isoD7-Аβ(1–16) $\Delta H = -4,8 \pm 0,2 \text{ ккал} \times \text{M}^{-1}$ и $T\Delta S = 0,8 \pm 0,1 \text{ ккал} \times \text{M}^{-1}$. Наиболее вероятно, разница в значениях энтропии отражает существенные различия в конформациях полипептидных цепей цинковых комплексов isoD7-Аβ(1–16) и Аβ(1–16). Методом ESI-MS было показано, что в выбранных экспериментальных условиях в отсутствие ионов цинка как Аβ(1–16), так и isoD7-Аβ(1–16) находились в виде мономеров. При добавлении ионов цинка к исследуемым образцам пептидов Аβ(1–16) оставался в мономерном состоянии, однако, isoD7-Аβ(1–16) присутствовал как в форме мономера, так и в виде димера. Следовательно, в отличие от Аβ(1–16) конформация isoD7-Аβ(1–16) способствует образованию межмолекулярного интерфейса между цинковыми комплексами isoD7-Аβ(1–16).

Для выявления минимальной аминокислотной последовательности, которая участвует в цинк-индуцированных взаимодействиях между молекулами Аβ, был использован оптический биосенсор на эффекте поверхностного плазмонного резонанса (SPR), с помощью которого были определены кинетические и термодинамические

параметры взаимодействия иммобилизованного домена Аβ(1–16) (далее по тексту – Лиганд) с находящимся в водной буферной системе одним из следующих пептидов (далее по тексту – Аналит): Аβ(1–16), Аβ(6–14), Аβ(7–14), Аβ(6–13), Аβ(11–14), Аβ(1–5) [62]. В присутствии ионов цинка в буферной системе было обнаружено образование комплексов Лиганд/Аналит с участием в качестве Аналитов Аβ(1–16), Аβ(6–14), Аβ(7–14) и Аβ(11–14) с константами ассоциации $(2,0 \pm 1,0) \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, $(1,0 \pm 0,4) \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, $(5,2 \pm 0,8) \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ и $(3,0 \pm 1,0) \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, соответственно. Эти данные свидетельствуют о том, что участок $^{11}\text{EVNH}^{14}$ пептида Аβ является необходимым и достаточным элементом межмолекулярного интерфейса со стороны Аналита в цинксвязанных димерах с участием домена Аβ(1–16) в качестве Лиганда. Далее методом ESI-MS было показано, что в присутствии ионов цинка пептид Аβ(11–14) не образовывал комплексов ни с Аβ(11–14), ни с Аβ(1–16). В присутствии ионов цинка были обнаружены цинксвязанные комплексы Аβ(11–14)/Zn²⁺/Аβ(11–14) и Аβ(11–14)/Zn²⁺/Аβ(1–16) с одинаковой стехиометрией 1:1:1. С помощью компьютерного моделирования было показано, что в комплексе Аβ(11–14)/Zn²⁺/Аβ(11–14) предпочтительными хелаторами являются аминокислотные остатки E11 и H14 взаимодействующих субъединиц. Методом ИТС было определено, что пептид EVRH связывает ион цинка с такой же стехиометрией и с той же аффинностью, что и пептид EVNH, тем самым подтверждая, что а.о. H13 не участвует в интерфейсе цинксвязанных димеров Аβ(11–14)/Zn²⁺/Аβ(11–14) и Аβ(11–14)/Zn²⁺/Аβ(1–16).

В работе [63] были определены параметры взаимодействия ионов цинка и домена 1–16 Аβ, в котором имеется фосфорилированный а.о. S8 (pS8-Аβ(1–16)). Ранее было показано наличие таких фосфорилированных аминокислотных остатков в молекулах Аβ, выделенных из амилоидных бляшек, а также доказана возможность фосфорилирования Аβ по а.о. S8 в цереброспинальной жидкости эндогенными киназами [64]. Методами ИТС, ESI-MS и спектроскопии ЯМР установлено, что в присутствии ионов цинка pS8-Аβ(1–16) образует стабильные водорастворимые цинксвязанные димеры Zn²⁺/pS8-Аβ(1–16)/Zn²⁺/pS8-Аβ(1–16)/Zn²⁺, в которых на две молекулы pS8-Аβ(1–16) приходится три иона цинка [63]. На участке $^6\text{HDpS}^8$ каждой субъединицы один ион цинка образует две координационные связи с фосфогруппой а.о. pS8, одну – с имидазольным кольцом а.о. H6, и четвёртая координационная связь образуется с карбонильной группой основной цепи а.о. H6 или а.о. D7. Межмолеку-

лярный интерфейс димера $Zn^{2+}/pS8-A\beta(1-16)/Zn^{2+}/pS8-A\beta(1-16)/Zn^{2+}$ образован участками $^{11}EVNH^{14}$ двух субъединиц, аминокислотные остатки E11 и H14 из которых совместно хелатируют общий ион цинка.

Методами SPR, ИТС и спектроскопии ЯМР было показано, что домен 1–16 Аβ с наследственной «Английской» (H6R) мутацией (H6R-Аβ(1–16)) при взаимодействии с ионами цинка образует стабильные водорастворимые димерные комплексы [65]. В этих димерах межмолекулярный интерфейс устроен аналогично таковому в димерах $Zn^{2+}/pS8-A\beta(1-16)/Zn^{2+}/pS8-A\beta(1-16)/Zn^{2+}$, то есть один общий ион цинка хелатируется аминокислотными остатками E11 и H14 взаимодействующих субъединиц. На основании экспериментальных данных ЯМР о присутствии характерных резонансов аминокислотных остатков V12 и H14 установлено, что в сходных условиях Аβ(1–16) образует смесь из цинксвязанных мономеров и димеров, при этом структура димера Аβ(1–16)/ Zn^{2+} /Аβ(1–16) в целом подобна наблюдаемой для цинксвязанного димера H6R-Аβ(1–16)/ Zn^{2+} /H6R-Аβ(1–16). Однако, доля димеров в общем количестве цинксвязанных комплексов с участием Аβ(1–16) представляется практически незаметной.

Для выявления структурных детерминант индуцированной цинком олигомеризации Аβ, то есть структурных элементов, которые отвечают за способность домена 1–16 Аβ образовывать цинксвязанные олигомеры, был использован метод спектроскопии ЯМР высокого разрешения [66]. В качестве объектов исследования выступали синтетические пептиды Аβ(1–16), H6R-Аβ(1–16), isoD7-Аβ(1–16), а также несколько усеченных и мутантных форм вышеуказанных пептидов. Было найдено, что доминирующая конформация основной цепи фрагмента 10–15 является идентичной для пептидов Аβ(1–16), H6R-Аβ(1–16) и isoD7-Аβ(1–16) как в отсутствие, так и в присутствии ионов цинка. Во всех этих доменах фрагмент 10–15 полипептидной цепи участвует в образовании первичного опосредованного цинком интерфейса димеризации. Установлена пространственная структура комплекса H6R-Аβ(1–16)/ Zn^{2+} /H6R-Аβ(1–16), на основании которой реконструирован механизм образования этого интерфейса. Показано, что индуцированная цинком олигомеризация синтетических пептидов, представляющих домен 1–16 природных вариантов Аβ, следует одному и тому же молекулярному механизму (рис. 2): (1) димер пептида образуется через первичный опосредованный цинком интерфейс $^{11}EVNH^{14}$; (2) перегруппировка боковых групп аминокислотных остатков H6 и H13 приводит к появлению второго цинкзависимого межмолекулярного интерфейса в каждой субъединице

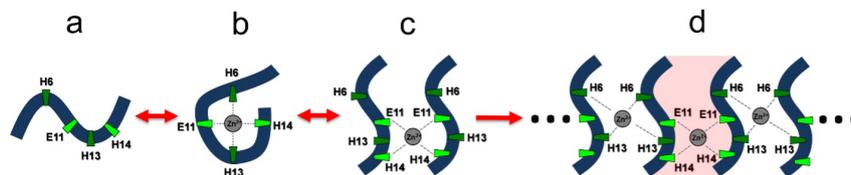


Рис. 2. Схема молекулярного механизма цинк-зависимой олигомеризации изоформ бета-амилоида. В качестве пептидной субъединицы изображен домен $A\beta(1-16)$.

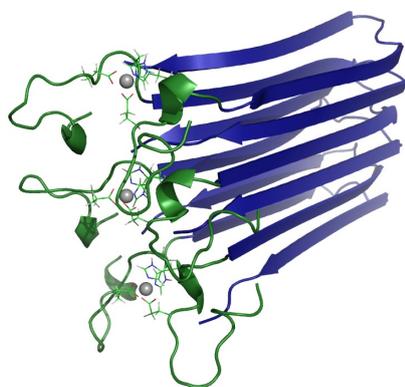


Рис.3. Модель цинк-связанного олигомера $A\beta(1-42)$.

димера с участием этих остатков; (3) димер становится зародышем последующей цинкзависимой олигомеризации мономерных молекул. Выявлено, что склонность цинк-связывающих доменов изоформ $A\beta$ подвергаться индуцированной цинком олигомеризации определяется степенью конформационной свободы а.о. Н6, которая достигает наивысшего значения в молекулах isoD7- $A\beta$. Важно отметить, что isoD7- $A\beta$ образуется вследствие спонтанного старения нативного $A\beta$ [57], а концентрация isoD7- $A\beta$ в биологических тканях повышается при развитии патогенеза БА [67, 68].

Таким образом, для всех исследованных природных изоформ $A\beta$ димеризация цинк-связанных комплексов соответствующих молекул $A\beta$ происходит через образование межмолекулярного интерфейса, в котором один ион цинка совместно хелатируется парами аминокислотных остатков E11 и H14 из жестко структурированных участков ${}^{11}\text{EVNH}^{14}$ двух взаимодействующих пептидных субъединиц. В зависимости от наличия в домене 1–16 химических модификаций аминокислотных остатков, такие цинк-индуцированные димеры могут либо подвергаться дальнейшей цепной реакции олигомеризации и переходить (как в случае $A\beta$ и isoD7- $A\beta$) в нерастворимые цинк-связанные агрегаты, подобные амилоидным бляшкам при БА (рис. 3), либо оставаться растворимыми димерами в равновесии с цинк-связанными мономерными комплексами (в случае pS8- $A\beta$).

IV. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ИЗОФОРМ БЕТА-АМИЛОИДА ДЛЯ МОДУЛИРОВАНИЯ ЦЕРЕБРАЛЬНОГО АМИЛОИДОГЕНЕЗА В ТРАНСГЕННЫХ МОДЕЛЯХ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА

Одним из главных признаков патогенеза БА является церебральный амилоидогенез (ЦА) – процесс образования амилоидных бляшек в мозге пациента [10, 11]. Соответственно, ингибирование ЦА представляется критически важным для терапии БА. Очевидно также, что прежде, чем искать возможности для рационального ингибирования ЦА, необходимо установить природу молекулярного агента, вызывающего ЦА. Известно, что ЦА у модельных животных резко ускоряется под влиянием инъекций гомогенизированных препаратов мозга больных с диагнозом БА [36]. Важно отметить, что доля isoD7-Аβ составляет свыше 50% от всех молекул Аβ в амилоидных бляшках [58] и, соответственно, в таких гомогенатах содержится значительное количество isoD7-Аβ. Молекулярный механизм образования *in vitro* цинк-индуцированных олигомеров природных изоформ бета-амилоида [66] предполагает, что isoD7-Аβ способен выступать в качестве зародыша агрегации эндогенных нативных молекул Аβ в присутствии высоких концентраций свободного цинка *in vivo*, например, в межсинаптических щелях холинергических нейронов, где уровень ионов цинка достигает 300 μМ [69, 70].

Действительно, в работе [71] было показано, что в отличие от Аβ(1–42), isoD7-Аβ(1–42) при внутривенном введении трансгенным мышам линии B6C3Tg (APP^{swE}, PSEN1^{dE9})85Dbo/j вызывал резкое ускорение развития ЦА. Экспериментальные группы включали самцов животных, которые выращивались в свободных от специфических патогенов условиях и ежемесячно подвергались внутривенным инъекциям препаратов Аβ(1–42) или isoD7-Аβ(1–42) (в дозах 100 мкг), начиная с 2-месячного возраста. Затем в образцах мозга 4- и 10-месячных животных определяли количество фибриллярных амилоидных бляшек в гиппокампе, кортексе и ядрах таламуса. Было установлено, что в отличие от когорт 4-месячных мышей, в которых количество амилоидных бляшек в гиппокампе и коре головного мозга было примерно в 9 и 4 раза выше у инъекцированных животных, чем у интактных контрольных животных, 10-месячные когорты показали для этих областей мозга меньшую разницу – примерно в 3 и 1,5 раза соответственно. В ядрах таламуса разница между инъекцированными и интактными 10-месячными трансгенными мышами снова была очень высокой – в 5,2 раза, тогда как 4-месячные трансгенные мыши, незави-

симо от вводимого препарата ($A\beta(1-42)$, isoD7- $A\beta(1-42)$) не имели амилоидных бляшек в этой области мозга. В отличие от трансгенных мышей, внутривенные инъекция isoD7- $A\beta(1-42)$ мышам дикого типа не вызвали образования амилоидных бляшек у животных независимо от их возраста. Таким образом, впервые было показано, что isoD7- $A\beta(1-42)$ играет роль зародыша агрегации эндогенных молекул $A\beta$ при развитии ЦА в трансгенной модели БА.

Позднее было установлено, что интрацеребральное введение цинксвязывающего домена 1–16 isoD7- $A\beta$ трансгенным мышам линии 5XFAD значительно усиливало ЦА [72]. В возрасте 3 месяцев двум группам самцов трансгенных мышей линии 5XFAD с помощью процедуры стереотаксиса делали однократную интрацеребральную инъекцию раствора isoD7- $A\beta(1-16)$ или $A\beta(1-16)$. Мозг извлекали через 1 месяц после процедуры стереотаксиса, и сагитальные срезы мозга толщиной 8 мкм анализировали гистохимически с использованием окрашивания Конго красным. Среднее количество конгофильных амилоидных бляшек в группе трансгенных мышей, которым вводили isoD7- $A\beta(1-16)$, составляло $19,9 \pm 2,0$, в то время как среднее количество конгофильных амилоидных бляшек в группе животных, которым вводили $A\beta(1-16)$, составляло $12,9 \pm 2,1$. Таким образом, isoD7- $A\beta(1-16)$ был идентифицирован как минимальный зародыш цинк-зависимой агрегации эндогенных молекул $A\beta$.

В работе [73] методом турбидиметрии и динамического светорассеяния было определено, что фосфорилирование а.о. S8 эффективно подавляет способность $A\beta(1-42)$ к образованию индуцированных цинком агрегатов *in vitro*. При этом было установлено, что значения характеристических параметров индуцированной цинком агрегации pS8- $A\beta(1-42)$ аналогичны таковым для эквимольной смеси pS8- $A\beta(1-42)$ и $A\beta(1-42)$. С учётом данных о молекулярном механизме цинкзависимой димеризации домена 1–16 изоформы pS8- $A\beta$ [63], полученные результаты свидетельствовали о способности pS8- $A\beta(1-42)$ образовывать цинксвязанные гомодимеры, а также цинксвязанные гетеродимеры с $A\beta(1-42)$. Таким образом, присутствие pS8- $A\beta(1-42)$ в смесях с $A\beta(1-42)$ может существенно сдерживать рост индуцированных цинком агрегатов $A\beta(1-42)$, а также может приводить к разрушению таких агрегатов. Поэтому далее было проанализировано влияние внутривенных инъекций pS8- $A\beta(1-42)$ на развитие церебрального амилоидогенеза в животной модели БА. В качестве модельных животных были использованы самцы и самки трансгенных мышей линии B6C3Tg(APP^{swe},PSEN1^{dE9})85Dbo/j.

Гистологический анализ амилоидной нагрузки в гиппокампе показал, что в отличие от Аβ(1–42), который не оказывал влияния на конституциональный ЦА у данных животных, ежемесячные инъекции pS8-Аβ(1–42) (в дозе 10 мкг) в течение полугода, начиная с 2-месячного возраста, снижали количество фибриллярных амилоидных бляшек в гиппокампе мышей на одну треть по сравнению с интактными животными [73].

В работе [74] были исследованы агрегационные свойства *in vitro* и влияние на ЦА *in vivo* искусственно сконструированной молекулы Аβ(1–42), которая содержит в себе изомеризованный а.о. D7 и фосфорилированный а.о. S8 (isoD7-pS8-Аβ(1–42)). Ранее были установлены фундаментальные причины, по которым в молекулярном механизме цинкзависимой олигомеризации Аβ две вышеупомянутые модификации играют противоположные роли: если изомеризация а.о. D7 усиливает этот потенциально патогенный процесс, то фосфорилирование а.о. S8 ингибирует его [66]. Также уже были получены экспериментальные свидетельства того, что в одной и той же животной модели БА (на основе трансгенных мышей линии B6C3-Tg(APP^{swe},PSEN1^{dE9})85Dbo/j) внутривенные инъекции isoD7-Аβ(1–42) ускоряет развитие ЦА [71], а инъекции pS8-Аβ(1–42) – тормозят его [73]. Однако, одновременное присутствие в молекуле Аβ двух природных пост-трансляционных модификаций, первая из которых, изомеризация а.о. D7, образуется вследствие спонтанного старения и по этой причине может быть патогенной, а вторая, фосфорилирование а.о. S8, образуется под действием внеклеточных киназ и, соответственно, может играть нормальную физиологическую роль, в живых системах не наблюдалось. С помощью методов турбидиметрии и флуорометрии на основе ThT, а также с использованием трансгенных мышей линии B6C3-Tg(APP^{swe},PSEN1^{dE9})85Dbo/j было обнаружено, что: (1) синтетический пептид isoD7-pS8-Аβ(1–42) менее склонен *in vitro* к спонтанной и индуцированной цинком агрегации по сравнению с isoD7-Аβ(1–42) и Аβ(1–42); (2) внутривенные инъекции isoD7-pS8-Аβ(1–42) вызывают примерно четырехкратное снижение количества конгофильных амилоидных бляшек в гиппокампе мышей, которым вводили isoD7-pS8-Аβ(1–42), по сравнению с контрольными животными. Полученные данные свидетельствуют о том, что по своим агрегационным свойствам isoD7-pS8-Аβ(1–42) принципиально отличается от isoD7-Аβ(1–42), но весьма схож с pS8-Аβ(1–42), однако,

в отличие от последнего, оказывает гораздо более мощный эффект в качестве экзогенного ингибитора ЦА у модельных животных.

Вышеприведенные результаты, полученные с использованием трансгенных мышинных моделей БА, убедительно доказывают, что isoD7-Aβ является необходимым молекулярным агентом, инициирующим ЦА. Однако, на таких модельных системах невозможно выявить способность молекул isoD7-Aβ выступать в качестве зародышей цинк-индуцированной олигомеризации и агрегации эндогенного бета-амилоида, так как при введении в кровь животных препараты цинковых комплексов isoD7-Aβ образуют нерастворимые агрегаты, приводящие к летальному исходу вследствие, вероятно, нарушения кровообращения.

V. ЦИНКОВЫЙ КОМПЛЕКС isoD7-Aβ КАК НЕОБХОДИМЫЙ И ДОСТАТОЧНЫЙ АГЕНТ ИНИЦИИРОВАНИЯ АМИЛОИДОГЕНЕЗА *IN VIVO*

Трансгенные нематоды *C. elegans*, которые сверхпродуцируют человеческий Aβ, представляют собой популярную животную модель в исследованиях роли церебрального амилоидогенеза при БА [75–78]. У таких нематод по мере старения происходит появление фибриллярных амилоидных бляшек в различных тканях организма, а также наблюдаются многообразные функциональные отклонения. Однако средняя продолжительность жизни животных остаётся практически неизменной, что свидетельствует о незначительном влиянии конститутивных амилоидных бляшек на основные функции нематод. Одним из объяснений относительной безвредности амилоидогенеза для нематод может быть недостаточное количество молекулярных компонентов, которые присутствуют в амилоидных бляшках человека, а именно, ионов цинка и isoD7-Aβ. При обычных условиях жизни нематод концентрация ионов цинка в их организме не может достигать высоких пиковых значений [79, 80]. Также, маловероятно появление isoD7-Aβ у нематод, так как спонтанная изомеризация Asp7 в бета-амилоиде требует значительного времени [81], превышающего длительность жизни этих животных.

В работе [82] были проанализированы изменения трёх основных экспериментальных характеристик, ассоциированных с развитием амилоидогенеза у трансгенных нематод (интегральный объём амилоидных бляшек в тканях; степень мышечного паралича; продолжительность жизни), при добавлении в питательную среду различных

молекулярных агентов (Аβ, isoD7-Аβ, ионы цинка), которые присутствуют в амилоидных бляшках пациентов с диагнозом БА. Поодиночке каждый из этих агентов не оказывал никаких эффектов на жизнь животных. Также безвредной для нематод была бинарная смесь Аβ и ионов цинка. Однако, одновременное добавление ионов цинка и isoD7-Аβ приводило к резкому утяжелению амилоидной нагрузки, к увеличению степени парализованности и к сокращению жизни животных. Таким образом, впервые *in vivo* была продемонстрирована определяющая роль цинкового комплекса isoD7-Аβ в запуске цепного процесса цинк-индуцированной агрегации эндогенных молекул Аβ, сопряженной с тяжелыми функциональными последствиями для жизни экспериментальных животных.

Из молекулярного механизма цинк-зависимой олигомеризации изоформ бета-амилоида [66] следует, что молекулярные агенты, которые могут совместно с участками ¹¹EVNH¹⁴ бета-амилоида хелатировать общий ион цинка, будут ингибировать цинк-зависимую олигомеризацию Аβ. В роли одного из таких агентов в работе [82] был протестирован тетрапептид Acetyl-NAEE-NH₂ (NAEE), для которого ранее на трансгенной модели БА было показано, что внутривенные инъекции NAEE значительно ограничивали развитие ЦА у экспериментальных животных [83]. В работе [82] на основании экспериментов с использованием биосенсора на эффекте SPR, спектроскопии ЯМР и молекулярного моделирования сначала было определено, что как Аβ, так и isoD7-Аβ образует с NAEE стабильный нековалентный комплекс *in vitro*, в котором один ион цинка находится на межмолекулярном интерфейсе ¹¹EVNH¹⁴ / NAEE (рис. 4). Затем в работе [82] было показано, что присутствие NAEE полностью нейтрализует отрицательные эффекты цинкового комплекса isoD7-Аβ на качество жизни нематод.

В совокупности результаты работы [82] указывают на принципиальную роль нековалентных комплексов иона цинка и isoD7-Аβ в качестве необходимого и достаточного молекулярного агента, запускающего цепной процесс патологической агрегации эндогенных молекул Аβ. Также пример тетрапептида NAEE доказывает, что молекулярные агенты, подавляющие способность изоформ Аβ участвовать в цинк-зависимой олигомеризации, могут выступать в роли потенциальных лекарственных средств, останавливающих развитие церебрального амилоидогенеза при болезни Альцгеймера.

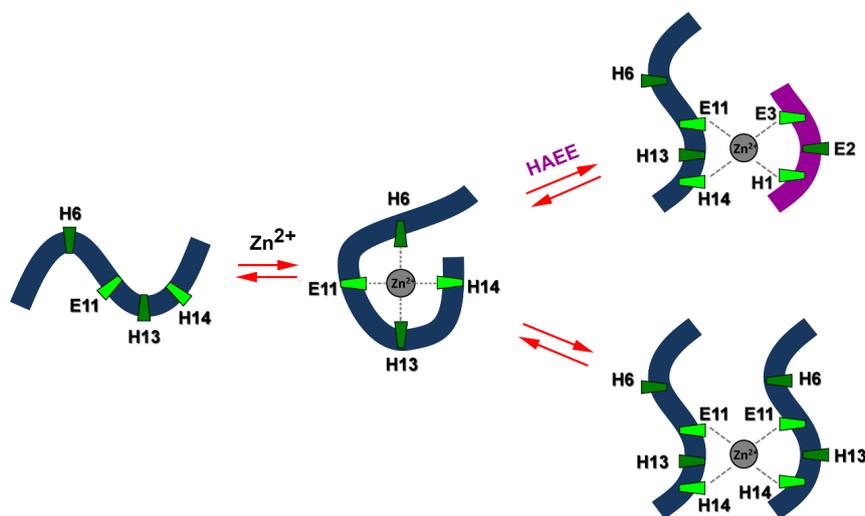


Рис.4. Схема молекулярного механизма образования цинк-связанного комплекса $A\beta(1-16)$ с HAEE и цинк-связанного гомодимера $A\beta(1-16)$.

VI. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

За последние 20 лет были получены существенные сведения о молекулярных механизмах взаимодействия различных изоформ бета-амилоида с ионами цинка. Было установлено, что в молекуле бета-амилоида участок 1–16 выступает в качестве автономного металлсвязывающего домена, участок 6–14 представляет собой минимальный цинк-связывающий центр, а участок 11–14 играет роль первичного цинк-связывающего центра. Результаты ряда исследований указывают на то, что образование растворимых цинк-связанных мономерных и димерных комплексов является нормальным физиологическим процессом для $A\beta$. Такие комплексы участвуют во взаимодействиях с другими биомолекулами в отличной от свободного $A\beta$ манере: предположительно, через образование межмолекулярного интерфейса, в котором со стороны $A\beta$ участвует фрагмент $^{11}EVNH^{14}$. Фосфорилирование а.о. S8 бета-амилоида (например, специфическими киназами) приводит к появлению растворимых цинк-связанных гомодимеров фосфорилированного $A\beta$ и изменяет профиль взаимодействующих с ним белков [84–86], но не влияет на механизм связывания.

вания Аβ с первичным ионом цинка. Таким образом, как нативные, так и фосфорилированные по S8 молекулы (pS8-Аβ) бета-амилоида в комплексе с ионами цинка не проявляют явно выраженных вредоносных свойств и, скорее всего, являются нормальными участниками физиологических процессов, но с изменёнными по сравнению со свободными молекулами Аβ функциями.

Напротив, изомеризация а.о. D7 существенно изменяет свойства цинксвязанного бета-амилоида, у которого вследствие локального изменения конформационной подвижности основной полипептидной цепи резко возрастает склонность к самопроизвольной агрегации. То, что при внутривенном введении изомеризованный по а.о. D7 бета-амилоид (isoD7-Аβ) вызывает резкое ускорение церебрального амилоидогенеза в трансгенной животной модели болезни Альцгеймера, свидетельствует о патогенном характере isoD7-Аβ и, как следствие, о высоком потенциале использования isoD7-Аβ в качестве биомаркера и лекарственной мишени при создании новых подходов к диагностике и лечению болезни Альцгеймера.

Для биомедицинского использования современных знаний о фундаментальных молекулярных механизмах взаимодействий Аβ и ионов цинка (в первую очередь, с целью разработки эффективных средств для лечения болезни Альцгеймера) наиболее интересной стратегией дальнейших исследований является поиск и/или конструирование специфических молекулярных агентов различной природы (антитела, низкомолекулярные соединения, пептиды, пептидомиметики и т.д.), способных ингибировать цинк-индуцированную агрегацию природных изоформ Аβ либо за счёт непосредственного связывания с сайтом ¹¹EVNH¹⁴ бета-амилоида [87–89], либо за счёт образования нековалентных цинксвязанных комплексов с этим сайтом [82, 90]. Обнадёживающим примером соединения, действующего в рамках такой стратегии, является пептид НАЕЕ.

Конфликт интересов: Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гаврилова, С. И. (2007) *Фармакотерапия болезни Альцгеймера*. Москва: Пульс, 360 с.
2. 2020 Alzheimer's disease facts and figures, *Alzheimer's & Dementia*, **16**, 391–460.
3. (2014) G8 dementia summit: a chance for united action, *The Lancet Neurology*, **13**, 1.
4. (2020) Деменция, *Всемирная Организация Здравоохранения* (официальный сайт).
5. Yiannopoulou, K.G., Papageorgiou, S.G. (2020) Current and Future Treatments in Alzheimer Disease: An Update, *Journal of Central Nervous System Disease*, **12**, 1179573520907397.
6. Long, J.M., Holtzman, D.M. (2019) Alzheimer Disease: An Update on Pathobiology and Treatment Strategies, *Cell*, **179**, 312–339.
7. Querfurth, H.W., LaFerla, F.M. (2010) Alzheimer's disease, *The New England journal of medicine*, **362**, 329–344.
8. Ghosh, S., Durgvanshi, S., Agarwal, S., Raghunath, M., Sinha, J.K. (2020) Current Status of Drug Targets and Emerging Therapeutic Strategies in the Management of Alzheimer's Disease, *Current Neuropharmacology*, **18**, 883–903.
9. Cummings, J., Lee, G., Nahed, P., Kambar, M., Zhong, K., Fonseca, J. & Taghva, K. (2022) Alzheimer's disease drug development pipeline: 2022, *Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions*, **8**, e12295.
10. Jack, C.R., Bennett, D.A., Blennow, K., Carrillo, M.C., Dunn, B., Haeberlein, S.B., Holtzman, D.M., Jagust, W., Jessen, F., Karlawish, J., Liu, E., Molinuevo, J.L., Montine, T., Phelps, C., Rankin, K.P., Rowe, C.C., Scheltens, P., Siemers, E., Snyder, H.M., Sperling, R., Elliott, C., Masliah, E., Ryan, L., Silverberg, N. (2018) NIA-AA Research Framework: Toward a biological definition of Alzheimer's disease, *Alzheimer's & Dementia*, **14**, 535–562.
11. Jagust, W., Jack, C.R., Jr., Bennett, D.A., Blennow, K., Haeberlein, S.B., Holtzman, D.M., Jessen, F., Karlawish, J., Liu, E., Molinuevo, J.L., Montine, T., Phelps, C., Rankin, K.P., Rowe, C.C., Scheltens, P., Siemers, E., Sperling, R. (2019) «Alzheimer's disease» is neither «Alzheimer's clinical syndrome» nor «dementia», *Alzheimer's & Dementia*, **15**, 153–157.
12. Serrano-Pozo, A., Frosch, M.P., Masliah, E., Hyman, B.T. (2011) Neuro-pathological Alterations in Alzheimer Disease, *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, **1**:a006189.
13. Small, S.A., Schobel, S.A., Buxton, R.B., Witter, M.P., Barnes, C.A. (2011) A pathophysiological framework of hippocampal dysfunction in ageing and disease, *Nature Reviews Neuroscience*, **12**, 585–601.
14. Braak, H., Braak, E., Bohl, J. (1993) Staging of Alzheimer-Related Cortical Destruction, *European Neurology*, **33**, 403–408.
15. Wahlund, L.-O., Julin, P., Lindqvist, J., Scheltens, P. (1999) Visual assessment of medial temporal lobe atrophy in demented and healthy control subjects: correlation with volumetry, *Psychiatry Research: Neuroimaging*, **90**, 193–199.
16. Hampel, H., Mesulam, M.M., Cuello, A.C., Farlow, M.R., Giacobini, E., Grossberg, G.T., Khachaturian, A.S., Vergallo, A., Cavado, E., Snyder, P.J., Khachaturian, Z.S. (2018) The cholinergic system in the pathophysiology and treatment of Alzheimer's disease, *Brain*, **141**, 1917–1933.

17. Polis, B., Samson, A.O. (2019) A New Perspective on Alzheimer's Disease as a Brain Expression of a Complex Metabolic Disorder, *Alzheimer's Disease [Internet]* / editor T. Wisniewski. Brisbane (AU): Codon Publications, 2019 Dec 20, Chapter 1.
18. Karran, E., Mercken, M., De Strooper, B. (2011) The amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease: an appraisal for the development of therapeutics, *Nature Reviews Drug Discovery*, **10**, 698–712.
19. Selkoe, D.J., Hardy, J. (2016) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years, *EMBO molecular medicine*, **8**, 595–608.
20. Golde, T.E., DeKosky, S.T., Galasko, D. (2018) Alzheimer's disease: The right drug, the right time, *Science*, **362**, 1250–1251.
21. Huang, L.K., Chao, S.P., Hu, C.J. (2020) Clinical trials of new drugs for Alzheimer disease, *Journal of Biomedical Science*, **27**:18.
22. Masters, C.L., Selkoe, D.J. (2012) Biochemistry of Amyloid β -Protein and Amyloid Deposits in Alzheimer Disease, *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, **2**(6):a006262.
23. Wang, J., Gu, B.J., Masters, C.L., Wang, Y.-J. (2017) A systemic view of Alzheimer disease — insights from amyloid- β metabolism beyond the brain, *Nature Reviews Neurology*, **13**, 612–623.
24. Brothers, H.M., Gosztyla, M.L., Robinson, S.R. (2018) The Physiological Roles of Amyloid- β Peptide Hint at New Ways to Treat Alzheimer's Disease, *Frontiers in Aging Neuroscience*, **10**:118.
25. Smith, L.M., Strittmatter, S.M. (2017) Binding Sites for Amyloid- β Oligomers and Synaptic Toxicity, *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, **7**(5):a024075.
26. Cohen, S.I.A., Linse, S., Luheshi, L.M., Hellstrand, E., White, D.A., Rajah, L., Otzen, D.E., Vendruscolo, M., Dobson, C.M., Knowles, T.P.J. (2013) Proliferation of amyloid- β 42 aggregates occurs through a secondary nucleation mechanism, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **110**, 9758–9763.
27. Masters, C.L., Simms, G., Weinman, N.A., Multhaup, G., McDonald, B.L., Beyreuther, K. (1985) Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **82**, 4245–4249.
28. Mukherjee, S., Perez, K.A., Lago, L.C., Klatt, S., McLean, C.A., Birchall, I.E., Barnham, K.J., Masters, C.L., Roberts, B.R. (2021) Quantification of N-terminal amyloid- β isoforms reveals isomers are the most abundant form of the amyloid- β peptide in sporadic Alzheimer's disease, *Brain communications*, **3**(2):fcab028.
29. Walker, L.C. (2020) A β Plaques, *Free Neuropathology*, **1**:31.
30. Stewart, K.L., Radford, S.E. (2017) Amyloid plaques beyond A β : a survey of the diverse modulators of amyloid aggregation, *Biophysical Reviews*, **9**, 405–419.
31. Kollmer, M., Close, W., Funk, L., Rasmussen, J., Bsoul, A., Schierhorn, A., Schmidt, M., Sigurdson, C.J., Jucker, M., Fändrich, M. (2019) Cryo-EM structure and polymorphism of A β amyloid fibrils purified from Alzheimer's brain tissue, *Nature Communications*, **10**:4760.
32. Takano, K. (2008) Amyloid beta conformation in aqueous environment, *Current Alzheimer Research*, **5**, 540–547.
33. Eisenberg, D., Jucker, M. (2012) The Amyloid State of Proteins in Human Diseases, *Cell*, **148**, 1188–1203.
34. Jucker, M., Walker, L.C. (2011) Pathogenic protein seeding in Alzheimer disease and other neurodegenerative

- disorders, *Annals of neurology*, **70**, 532–540.
35. Soto, C., Pritzkow, S. (2018) Protein misfolding, aggregation, and conformational strains in neurodegenerative diseases, *Nature neuroscience*, **21**, 1332–1340.
 36. Jucker, M., Walker, L.C. (2018) Propagation and spread of pathogenic protein assemblies in neurodegenerative diseases, *Nature neuroscience*, **21**, 1341–1349.
 37. Craddock, T.J.A., Tuszyński, J.A., Chopra, D., Casey, N., Goldstein, L.E., Hameroff, S.R., Tanzi, R.E. (2012) The Zinc Dyshomeostasis Hypothesis of Alzheimer's Disease, *PloS One*, **7(3)**:e33552.
 38. Lovell, M.A., Robertson, J.D., Teesdale, W.J., Campbell, J.L., Markesbery, W.R. (1998) Copper, iron and zinc in Alzheimer's disease senile plaques, *Journal of the neurological sciences*, **158**, 47–52.
 39. Bush, A.I., Pettingell, W.H., Multhaup, G., d Paradis, M., Vonsattel, J.P., Gusella, J.F., Beyreuther, K., Masters, C.L., Tanzi, R.E. (1994) Rapid induction of Alzheimer A beta amyloid formation by zinc, *Science*, **265**, 1464–1467.
 40. Miller, Y., Ma, B., Nussinov, R. (2010) Zinc ions promote Alzheimer Abeta aggregation via population shift of polymorphic states, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **107**, 9490–9495.
 41. Miller, L.M., Wang, Q., Telivala, T.P., Smith, R.J., Lanzirrotti, A., Miklossy, J. (2006) Synchrotron-based infrared and X-ray imaging shows focalized accumulation of Cu and Zn co-localized with beta-amyloid deposits in Alzheimer's disease, *Journal of structural biology*, **155**, 30–37.
 42. Suh, S.W., Jensen, K.B., Jensen, M.S., Silva, D.S., Kessler, P.J., Danscher, G., Frederickson, C.J. (2000) Histochemically-reactive zinc in amyloid plaques, angiopathy, and degenerating neurons of Alzheimer's diseased brains, *Brain Research*, **852**, 274–278.
 43. DeBenedictis, C.A., Raab, A., Ducie, E., Howley, S., Feldmann, J., Grabrucker, A.M. (2020) Concentrations of Essential Trace Metals in the Brain of Animal Species-A Comparative Study, *Brain Sciences*, **10(7)**:460.
 44. Andreini, C., Banci, L., Bertini, I., Rosato, A. (2006) Counting the zinc-proteins encoded in the human genome, *Journal of Proteome Research*, **5**, 196–201.
 45. Krall, R.F., Tzounopoulos, T., Aizenman, E. (2021) The Function and Regulation of Zinc in the Brain, *Neuroscience*, **457**, 235–258.
 46. Prasad, A.S. (2008) Clinical, immunological, anti-inflammatory and antioxidant roles of zinc, *Experimental Gerontology*, **43(5)**, 370–377.
 47. Tapiero, H., Tew, K.D. (2003) Trace elements in human physiology and pathology: zinc and metallothioneins, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **57**, 399–411.
 48. Cuajungco, M.P., Fagét, K.Y. (2003) Zinc takes the center stage: its paradoxical role in Alzheimer's disease, *Brain Research Reviews*, **41**, 44–56.
 49. Bush, A.I., Pettingell, W.H., Jr., Paradis, M.D., Tanzi, R.E. (1994) Modulation of A beta adhesiveness and secretase site cleavage by zinc, *Journal of Biological Chemistry*, **269**, 12152–12158.
 50. Liu, S.-T., Howlett, G., Barrow, C.J. (1999) Histidine-13 Is a Crucial Residue in the Zinc Ion-Induced Aggregation of the Aβ Peptide of Alzheimer's Disease, *Biochemistry*, **38**, 9373–9378.
 51. Huang, X., Cuajungco, M.P., Atwood, C.S., Moir, R.D., Tanzi, R.E., Bush, A.I. (2000) Alzheimer's

- Disease, β -Amyloid Protein and Zinc, *The Journal of Nutrition*, **130**, 1488S–1492S.
52. Miura, T., Suzuki, K., Kohata, N., Takeuchi, H. (2000) Metal binding modes of Alzheimer's amyloid beta-peptide in insoluble aggregates and soluble complexes, *Biochemistry*, **39**, 7024–7031.
53. Yang, D.S., McLaurin, J., Qin, K., Westaway, D., Fraser, P.E. (2000) Examining the zinc binding site of the amyloid-beta peptide, *European journal of biochemistry*, **267**, 6692–6698.
54. Kozin, S.A., Zirah, S., Rebuffat, S., Hui Bon Hoa, G., Debey, P. (2001) Zinc binding to Alzheimer's A β (1–16) peptide results in stable soluble complex, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **285**, 959–964.
55. Zirah, S., Rebuffat, S., Kozin, S.A., Debey, P., Fournier, F., Lesage, D., Tabet, J.-C. (2003) Zinc binding properties of the amyloid fragment A β (1–16) studied by electrospray ionization mass spectrometry, *International Journal of Mass Spectrometry*, **228**, 999–1016.
56. Zirah, S., Stefanescu, R., Manea, M., Tian, X., Cecal, R., Kozin, S.A., Debey, P., Rebuffat, S., Przybylski, M. (2004) Zinc binding agonist effect on the recognition of the β -amyloid (4–10) epitope by anti- β -amyloid antibodies, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **321**, 324–328.
57. 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 β -peptide upon zinc binding and in vitro aging, *Journal of Biological Chemistry*, **281**, 2151–2161.
58. Roher, A.E., Lowenson, J.D., Clarke, S., Wolkow, C., Wang, R., Cotter, R.J., Reardon, I.M., Zürcher-Neely, H.A., Henrikson, R.L., Ball, M.J., Greenberg, B.D. (1993) Structural alterations in the peptide backbone of beta-amyloid core protein may account for its deposition and stability in Alzheimer's disease, *Journal of Biological Chemistry*, **268**, 3072–3083.
59. 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- β , *Biophysical Journal*, **99**, L84–L86.
60. Talmard, C., Guilloreau, L., Coppel, Y., Mazarguil, H., Faller, P. (2007) Amyloid-beta peptide forms monomeric complexes with Cu(II) and Zn(II) prior to aggregation, *ChemBioChem*, **8**, 163–165.
61. 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 β (1–16) peptide, *ChemBioChem*, **9**, 1564–1567.
62. Kozin, S.A., Mezentsev, Y.V., Kulikova, A.A., Indeykina, M.I., Golovin, A.V., Ivanov, A.S., Tsvetkov, P.O., Makarov, A.A. (2011) Zinc-induced dimerization of the amyloid- β metal-binding domain 1–16 is mediated by residues 11–14, *Molecular BioSystems*, **7**, 1053–1055.
63. Kulikova, A.A., Tsvetkov, P.O., Indeykina, M.I., Popov, I.A., Zhokhov, S.S., Golovin, A.V., Polshakov, V.I., Kozin, S.A., Nudler, E., Makarov, A.A. (2014) Phosphorylation of Ser8 promotes zinc-induced dimerization of the amyloid-beta metal-binding domain, *Molecular bioSystems*, **10**, 2590–2596.
64. Kumar, S., Rezaei-Ghaleh, N., Terwel, D., Thal, D.R., Richard, M., Hoch, M., Mc Donald, J.M., Wüllner, U., Glebov, K., Heneka, M.T., Walsh,

- D.M., Zweckstetter, M., Walter, J. (2011) Extracellular phosphorylation of the amyloid β -peptide promotes formation of toxic aggregates during the pathogenesis of Alzheimer's disease, *The EMBO journal*, **30**, 2255–2265.
65. Kozin, S.A., Kulikova, A.A., Istrate, A.N., Tsvetkov, P.O., Zhokhov, S.S., Mezentsev, Y.V., Kechko, O.I., Ivanov, A.S., Polshakov, V.I., Makarov, A.A. (2015) The English (H6R) familial Alzheimer's disease mutation facilitates zinc-induced dimerization of the amyloid- β metal-binding domain, *Metallomics*, **7**, 422–425.
66. Istrate, A.N., Kozin, S.A., Zhokhov, S.S., Mantsyzov, A.B., Kechko, O.I., Pastore, A., Makarov, A.A., Polshakov, V.I. (2016) Interplay of histidine residues of the Alzheimer's disease A β peptide governs its Zn-induced oligomerization, *Scientific Reports*, **6**:21734.
67. Gnoth, K., Piechotta, A., Kleinschmidt, M., Konrath, S., Schenk, M., Taudte, N., Ramsbeck, D., Rieckmann, V., Geissler, S., Eichentopf, R., Barendrecht, S., Hartlage-Rübsamen, M., Demuth, H.-U., Roßner, S., Cynis, H., Rahfeld, J.-U., Schilling, S. (2020) Targeting isoaspartate-modified A β rescues behavioral deficits in transgenic mice with Alzheimer's disease-like pathology, *Alzheimer's research & therapy*, **12**:149.
68. Moro, M.L., Phillips, A.S., Gaimster, K., Paul, C., Mudher, A., Nicoll, J.A.R., Boche, D. (2018) Pyroglutamate and Isoaspartate modified Amyloid-Beta in ageing and Alzheimer's disease, *Acta Neuropathologica Communications*, **6**(1):3.
69. Paoletti, P., Vergnano, A.M., Barbour, B., Casado, M. (2009) Zinc at glutamatergic synapses, *Neuroscience*, **158**, 126–136.
70. Xie, X.M., Smart, T.G. (1991) A physiological role for endogenous zinc in rat hippocampal synaptic neurotransmission, *Nature*, **349**, 521–524.
71. Kozin, S.A., Cheglakov, I.B., Ovsepyan, A.A., Telegin, G.B., Tsvetkov, P.O., Lisitsa, A.V., Makarov, A.A. (2013) Peripherally applied synthetic peptide isoAsp7-A β (1–42) triggers cerebral β -amyloidosis, *Neurotoxicity research*, **24**, 370–376.
72. Kulikova, A.A., Cheglakov, I.B., Kukharsky, M.S., Ovchinnikov, R.K., Kozin, S.A., Makarov, A.A. (2016) Intracerebral Injection of Metal-Binding Domain of Abeta Comprising the Isomerized Asp7 Increases the Amyloid Burden in Transgenic Mice, *Neurotoxicity research*, **29**, 551–557.
73. Barykin, E.P., Petrushanko, I.Y., Kozin, S.A., Telegin, G.B., Chernov, A.S., Lopina, O.D., Radko, S.P., Mitkevich, V.A., Makarov, A.A. (2018) Phosphorylation of the Amyloid-Beta Peptide Inhibits Zinc-Dependent Aggregation, Prevents Na,K-ATPase Inhibition, and Reduces Cerebral Plaque Deposition, *Frontiers in Molecular Neuroscience*, **11**:302.
74. Kozin, S.A., Barykin, E.P., Telegin, G.B., Chernov, A.S., Adzhubei, A.A., Radko, S.P., Mitkevich, V.A., Makarov, A.A. (2018) Intravenously Injected Amyloid- β Peptide With Isomerized Asp7 and Phosphorylated Ser8 Residues Inhibits Cerebral β -Amyloidosis in A β PP/PS1 Transgenic Mice Model of Alzheimer's Disease, *Frontiers in neuroscience*, **12**:518.
75. Alexander, A.G., Marfil, V., Li, C. (2014) Use of *Caenorhabditis elegans* as a model to study Alzheimer's disease and other neurodegenerative diseases, *Frontiers in genetics*, **5**:279.
76. Chen, X., Barclay, J.W., Burgoyne, R.D., Morgan, A. (2015) Using C.

- elegans to discover therapeutic compounds for ageing-associated neurodegenerative diseases, *Chemistry Central Journal*, **9**:65.
77. Dostal, V., Link, C.D. (2010) Assaying β -amyloid toxicity using a transgenic *C. elegans* model, *Journal of Visualized Experiments*, **44**:e2252.
78. Ewald, C.Y., Li, C. (2010) Understanding the molecular basis of Alzheimer's disease using a *Caenorhabditis elegans* model system, *Brain Structure and Function*, **214**, 263–283.
79. Earley, B.J., Mendoza, A.D., Tan, C.H., Kornfeld, K. (2021) Zinc homeostasis and signaling in the roundworm *C. elegans*, *Biochimica and Biophysica Acta—Molecular Cell Research*, **1868**(1):118882.
80. Kumar, J., Barhydt, T., Awasthi, A., Lithgow, G.J., Killilea, D.W., Kapahi, P. (2016) Zinc Levels Modulate Lifespan through Multiple Longevity Pathways in *Caenorhabditis elegans*, *PLoS One*, **11**:e0153513.
81. Shimizu, T., Watanabe, A., Ogawara, M., Mori, H., Shirasawa, T. (2000) Isoaspartate formation and neurodegeneration in Alzheimer's disease, *Archives of biochemistry and biophysics*, **381**, 225–234.
82. Mitkevich, V.A., Barykin, E.P., Eremina, S., Pani, B., Katkova-Zhukotskaya, O., Polshakov, V.I., Adzhubei, A.A., Kozin, S.A., Mironov, A.S., Makarov, A.A., Nudler, E. (2022) Zn-dependent β -amyloid Aggregation and its Reversal by the Tetrapeptide HAEE, *Aging and disease*, **Early access data Sep 19**: DOI: 10.14336/AD.2022.0827.
83. Tsvetkov, P.O., Cheglakov, I.B., Ovseryan, A.A., Mediannikov, O.Y., Morozov, A.O., Telegin, G.B., Kozin, S.A. (2015) Peripherally Applied Synthetic Tetrapeptides HAEE and RADD Slow Down the Development of Cerebral beta-Amyloidosis in AbetaPP/PS1 Transgenic Mice, *Journal of Alzheimers Disease*, **46**, 849–853.
84. Medvedev, A.E., Buneeva, O.A., Kopylov, A.T., Mitkevich, V.A., Kozin, S.A., Zgoda, V.G., Makarov, A.A. (2016) Chemical modifications of amyloid-beta(1–42) have a significant impact on the repertoire of brain amyloid-beta(1–42) binding proteins, *Biochimie*, **128–129**, 55–58.
85. Ершов, П.В., Мезенцев, Ю.В., Яблоков, Е.О., Калужский, Л.А., Иванов, А.С., Гнучев, Н.В., Митькевич, В.А., Макаров, А.А., Козин, С.А. (2020) Прямой молекулярный фишинг цинкзависимых белковых партнеров бета-амилоида 1–16 с «Тайваньской» (D7H) мутацией и с фосфорилированным остатком SER8, *Молекулярная биология*, **54**, 1029–1036.
86. Иванов, А.С., Ершов, П.В., Мольнар, А.А., Мезенцев, Ю.В., Калужский, Л.А., Яблоков, Е.О., Флоринская, А.В., Гнеденко, О.В., Медведев, А.Е., Козин, С.А., Митькевич, В.А., Макаров, А.А., Гилеп, А.А., Лушник, А.Я., Гайдукевич, И.В., Усанов, С.А. (2016) Прямой молекулярный фишинг в исследовании молекулярных партнеров белок-белковых и белок-пептидных взаимодействий, *Биоорганическая химия*, **42**, 18–27.
87. Deigin, V.I., Poluektova, E.A., Benia-shvili, A.G., Kozin, S.A., Poluektov, Y.M. (2022) Development of Peptide Biopharmaceuticals in Russia, *Pharmaceutics*, **14**:716.
88. Козин, С.А., Барыкин, Е.П., Митькевич, В.А., Макаров, А.А. (2018) Антиамилоидная терапия болезни Альцгеймера: современное состояние и перспективы, *Биохимия*, **83**, 1331–1342.

89. Козин, С.А., Макаров, А.А. (2019) Конвергенция концепций патогенеза болезни Альцгеймера, *Молекулярная биология*, **53**, 1020–1028.
90. Козин, С.А., Польшаков, В.И., Мезенцев, Ю.В., Иванов, А.С., Жоханов, С.С., Юринская, М.М., Винокуров, М.Г., Макаров, А.А., Митькевич В.А. (2018) Эналаприлат ингибирует цинк-зависимую олигомеризацию металл-связывающего домена изоформ бета-амилоида и защищает клетки нейробластомы человека от их токсического действия, *Молекулярная биология*, **52**, 683–691.