

ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ В ИССЛЕДОВАНИИ АГРЕГАЦИИ β -АМИЛОИДА

©2023 г. Е. В. СУПРУН^{1,2}, С. П. РАДЬКО²,
С. А. КОЗИН³, В. А. МИТЬКЕВИЧ³, А. А. МАКАРОВ³

¹ *Московский государственный университет
имени М.В. Ломоносова, Химический факультет, Москва*

² *Научно-исследовательский институт биомедицинской химии
имени В.Н. Ореховича, Москва*

³ *Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта
Российской академии наук, Москва*

I. Введение. II. β -амилоид: полиморфизм, структурные формы, взаимодействие с ионами металлов. III. Электрохимический анализ в исследовании β -амилоида. IV. Заключение.

I. ВВЕДЕНИЕ

β -Амилоид (A β) – название, закрепившееся за группой пептидов с последовательностью NH₂–DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIAI–COOH, различающихся по длине (аллоформы от 37 до 43 аминокислотных остатков (а. о.)) и являющихся продуктами протеолитического расщепления трансмембранного белка-предшественника амилоида (англ. – amyloid precursor protein, APP). β -Амилоидные пептиды характеризуются высокой склонностью к олигомеризации и агрегации и составляют основу амилоидных (сенильных) бляшек – морфологического признака старческой

Принятые сокращения: A β – β -амилоид; а. о. – аминокислотный остаток; АСМ – атомно-силовая микроскопия; АФК – активные формы кислорода; БА – болезнь Альцгеймера; БЛ – Берлинская лазурь; БСА – бычий сывороточный альбумин; Мб – миоглобин; МСД – металл-связывающий домен; ПТМ – пост-трансляционная модификация; ПИА – проточно-инжекционный анализ; СМЖ – спинномозговая жидкость; ЧСА – альбумин сыворотки человека; ЦНС – центральная нервная система; ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота; APP – белок-предшественник амилоида (англ. – amyloid precursor protein).

Адрес для корреспонденции: e-mail: lenasuprun@mail.ru (Елена Владимировна Супрун)

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

деменции альцгеймеровского типа (болезни Альцгеймера (БА)), частота случаев которой резко возрастает с возрастом, начиная с 60–65 лет [1]. БА является одной из наиболее известных форм возрастной деменции – её доля составляет 60–70% всех случаев [2]. В 2021 году в мире насчитывалось около 55 млн. пациентов с различными формами деменции и их количество, как ожидается, достигнет к 2030 году 78 млн. человек [3]. В Российской Федерации насчитывается около 1.7 млн. человек с деменцией [4], при этом число пациентов с БА составляет приблизительно 1 млн. [5]. БА характеризуется прогрессирующим ослаблением когнитивных способностей, что связано с необратимым органическим разрушением головного мозга, которое в период от 3 до 8 лет приводит к смерти больного от остановки дыхания. В связи с длительным течением болезни, финансовая нагрузка на системы здравоохранения и семейные бюджеты в индустриально развитых странах, ассоциированная с уходом за пациентами с БА, признана одной из наиболее существенных [4] – так, только в США суммарные расходы на такой уход и лечение составили в 2020 году 305 млрд. долларов, из них 206 млрд. долларов пришлось на систему здравоохранения (на финансируемые из государственного бюджета программы Medicare и Medicaid) [6].

Различают наследственную (семейную) и спорадическую формы БА. Наследственная форма ассоциирована с мутациями в генах *APP*, *PSEN1* и *PSEN2* (последние два кодируют белки пресенилин 1 и 2), приводящими к конституциональному повышению уровня Аβ по сравнению с физиологическим и агрегации пептида [7]. Однако подавляющее количество случаев БА приходится на спорадическую форму (более 95%), которая не ассоциирована с какими-либо известными мутациями, но также сопровождается аномальной агрегацией эндогенного Аβ. Патологическая агрегация эндогенного Аβ лежит в основе гипотезы «амилоидного каскада», остающейся уже около трёх десятилетий доминирующим взглядом на молекулярный механизм возникновения и развития БА [1, 7]. Первоначальная гипотеза «амилоидного каскада» постулирует, что дисбаланс в генерации и деградации Аβ приводит к его агрегации в нерастворимую фибриллярную форму в виде сенильных бляшек, что и является иницирующим событием в патогенезе БА. В дальнейшем включаются нейротоксические механизмы, в том числе образование нейрофибриллярных клубков из-за гиперфосфорилирования таубелка, которые необратимо приводят к гибели нейронов и разрушению синаптических связей. В настоящее время гипотеза допускает, что растворимые нефибриллярные олигомеры Аβ имеют даже более

важное значение в нейродегенеративном каскаде, чем фибриллярные агрегаты [1, 7]. Наряду с гипотезой «амилоидного каскада», другими широко распространёнными гипотезами этиологии БА являются холинергическая [8] и нейровоспалительная [9]. В первом случае, БА связывают с нарушением холинергической нейротрансмиссии, во втором – с нарушением регуляции иммунного ответа центральной нервной системы (ЦНС). Также существует «металлическая теория болезни Альцгеймера» (англ. – «metal theory of Alzheimer's disease») [10], согласно которой БА связана с нарушением гомеостаза ионов таких переходных металлов, как цинк, медь и, вероятно, железо, которые вызывают патологическую агрегацию А β . Недавно была предложена концепция конвергенции этих гипотез на основе идеи «амилоидных матриц», в которой центральную роль играет взаимодействие определённых изоформ А β , формирующихся в результате пост-трансляционных ферментативных и химических модификаций (ПТМ) пептида, с никотиновыми холинорецепторами и ионами цинка, что запускает цинк-опосредованную цепную реакцию агрегации А β [11, 12].

Центральная роль агрегации А β в патогенезе БА определяет особый интерес к исследованию механизмов и характеристик процесса как спонтанной, так и металл-индуцированной агрегации различных изоформ пептида *in vitro*, для чего применяют, как правило, синтетические пептиды. В настоящее время существует широкий набор методов, используемых для исследования агрегации А β и его взаимодействия с ионами металлов [13–15]. Среди них вольтамперометрия характеризуется относительной технической простотой и возможностью детектировать переход А β в агрегированное состояние по уменьшению количества пептида в форме мономеров и небольших олигомеров [13] (Рис. 1). В этом отношении метод вольтамперометрии является комплементарным методам, основанным на детекции агрегатов А β , и позволяет получить дополнительную информацию о процессе агрегации.

Электрохимический анализ, в частности вольтамперометрия белков и пептидов, нашёл широкое применение в биомедицинских исследованиях [16]. В основе вольтамперометрической детекции белков и пептидов лежит регистрация электрохимической активности аминокислотных остатков, а именно сигналов окисления остатков Тур, Тгр, Нис, Сус и Мет [16–18]. Окисление белковых молекул при определенном потенциале на поверхности электрода генерирует электрический ток, который регистрируют на вольтамперограмме в виде пика или волны как аналитический сигнал. Предполагают, что только

аминокислотные остатки, локализованные на поверхности белковой глобулы и, таким образом, способные контактировать с поверхностью электрода, могут проявлять свои электроактивные свойства [19]. Параметры электрохимического сигнала чувствительны к изменениям конформации белка, в том числе вызванными аминокислотными заменами [17, 20, 21]. Применительно к Аβ, процесс включения пептидов в агрегаты приводит к блокировке прямого контакта электроактивных групп аминокислотных остатков с поверхностью электрода, что проявляется в виде прогрессирующего снижения интенсивности электрохимического сигнала [22] (Рис. 1).

В обзоре обсуждаются возможности и ограничения вольтамперометрии и родственных методов для исследования спонтанной и металл-индуцированной агрегации Аβ, сравнительного анализа различных изоформ пептида, а также изучения процесса комплексообразования ионов металлов с Аβ. В том числе рассмотрен цикл работ авторов обзора по комбинированию вольтамперометрии, дающей информацию об относительном количестве в образце мономеров и олигомеров Аβ, с методами, регистрирующими размер и структуру Аβ. Результатом комбинирования методов является получение более полной информации о механизмах, определяющих агрегацию Аβ *in vitro*, включая агрегацию изоформ пептида с искусственными и природными (мутации) заменами и/или модификациями аминокислотных остатков.

II. β-АМИЛОИД: ПОЛИМОРФИЗМ, СТРУКТУРНЫЕ ФОРМЫ, ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С ИОНАМИ МЕТАЛЛОВ

Аβ представляет собой продукт протеолитического процессинга APP (трансмембранного белка 1-го типа) γ- и β-секретазами [23]. APP подвергается протеолитическому расщеплению γ-секретазой в районе трансмембранного домена и β-секретазой в области, прилегающей к трансмембранному домену с N-конца. В то время как сайт расщепления APP β-секретазой строго определён (Met671/Asp672), γ-секретаза может действовать по различным сайтам. Как результат, образуются аллоформы β-амилоидного пептида длиной от 37 до 43 а. о., различающиеся протяжённостью полипептидной цепи на C-конце. При этом N-концевая часть Аβ, представленная аминокислотными остатками 1–28, относится к экстраклеточному домену APP, а оставшаяся C-концевая часть – к трансмембранному домену белка [24]. Существует также другой – «неамилоидогенный» – путь процессинга APP с участием α-секретазы, которая расщепляет APP между Lys687 и Leu688, в результате чего освобождается растворимый эктодомен

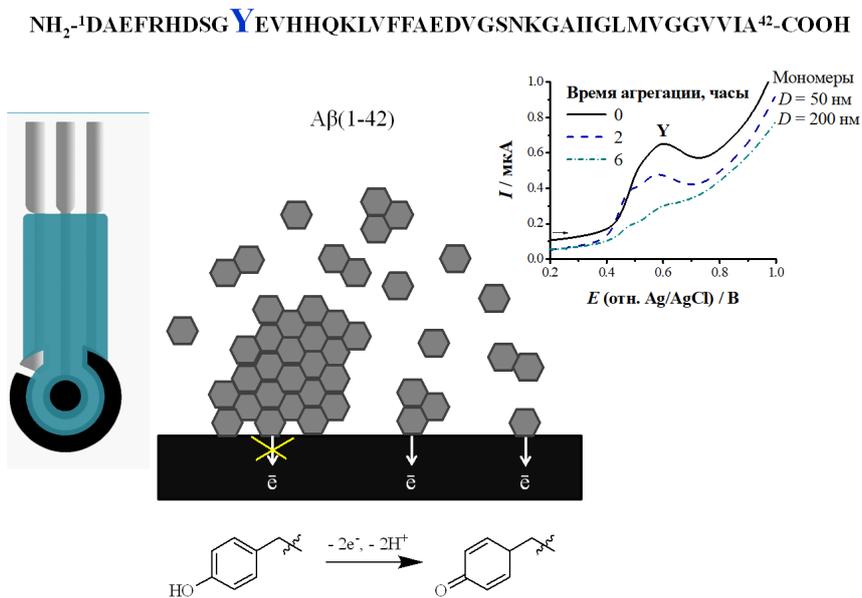


Рис. 1. Вольтамперометрический анализ агрегации β-амилоида.

APP – sAPP α , который не способен агрегировать и формировать амилоидные отложения [24]. При совместном действии α - и β -секретаз также образуется более короткая форма длиной 16 а. о., представляющая N-концевую часть A β [25]. A β , продуцируемый в процессе протеолитического процессинга APP, секретируется в межклеточное пространство и циркулирует в крови и спинномозговой жидкости (СМЖ). Изучение растворимого A β , выделенного из клеток и СМЖ, и нерастворимого A β , выделенного из мозга пациентов с БА, показало, что существует множество форм A β с широким спектром как C-, так и N-концевой гетерогенности; последняя предположительно является результатом вторичной активности β -секретазы [26].

Физиологическая функция A β точно не определена. Предполагают, что она может состоять в регуляции синаптической функции, защите от инфекций, восстановлении пораженных участков гематоэнцефалического барьера и компенсации последствий травмы [27]. В спинномозговой жидкости человека количественно доминирующей является аллоформа A β длиной 40 а. о. (A β (1–40)), за которой следуют A β (1–38) и A β (1–42) (длиной 38 и 42 а. о. соответственно) [28]. Несмотря на то, что концентрация A β (1–40) может многократно

превышать концентрацию Аβ(1–42) в СМЖ, в сенильных бляшках паренхимы головного мозга наиболее представленной формой Аβ является Аβ(1–42). Кроме того, *in vitro* Аβ(1–42) демонстрирует существенно более высокую склонность к олигомеризации и агрегации в сравнении с Аβ(1–40) и Аβ(1–38), что предполагает центральную роль этой аллоформы Аβ в патогенезе БА [26, 29].

Общепринято, что фибриллярная агрегация Аβ протекает по механизму нуклеационной полимеризации, включающей стадии нуклеации (формирование «затравки» или «нуклеуса»), элонгации и насыщения [30]. «Затравка», вероятно, представляет собой олигомер Аβ и является метастабильной структурой, и либо диссоциирует на низкомолекулярные олигомеры или мономеры, либо инициирует дальнейшую агрегацию, давая начало формированию высокомолекулярного олигомера. Высокомолекулярные предфибриллярные олигомеры Аβ (с молекулярной массой ~40–1000 кДа), сформированные как в условиях *in vivo*, так и *in vitro*, представлены агрегатами различной формы и структуры и известны как «аморфные агрегаты», мицеллы Аβ, Аβ*56, ADDL (диффундирующие лиганды, полученные из Аβ; англ. – amyloid-beta derived diffusible ligands), «глобуломеры», амилосфероиды, кольцеобразные олигомеры [31]. Дальнейшая трансформация предфибриллярных олигомеров в протофибриллы и ассоциация последних приводят к образованию амилоидных фибрилл – стабильных нерастворимых высокоупорядоченных агрегатов, характеризующихся кросс-β-листовой структурой [32].

В отличие от фибриллярной агрегации Аβ, которая происходит спонтанно и *in vitro* занимает часы или дни, металл-индуцированная агрегация Аβ, вызываемая ионами переходных металлов, такими как ионы цинка и меди (Zn(II) и Cu(II/I)), протекает быстро (от нескольких минут до часа) и характеризуется формированием так называемых «аморфных агрегатов» пептида, у которых отсутствует упорядоченная структура [33]. Ионы Zn(II) и Cu(II/I) содержатся в амилоидных бляшках в аномально высоком количестве [34]. Однако только для ионов Zn(II) на животных моделях экспериментально показана их абсолютная необходимость для формирования амилоидных бляшек [10]. Ионы Zn(II) координируются аминокислотными остатками, расположенными в N-концевой части Аβ длиной 16 а. о., которая получила название «металл-связывающего домена» (МСД) [33]. Комплексы ионов Zn(II) с пептидом Аβ(1–16), представляющим МСД, который также присутствует в организме человека как самостоятельная форма Аβ [25], могут представлять собой либо мономеры с компактно свернутым пептидом, где ион Zn(II) координирован

четырьмя аминокислотными остатками (His6, Glu11, His13 и His14) одного пептида, либо димеры, в которых один ион Zn(II) координирован парами аминокислотных остатков His6/His13 и His14/Glu11 двух пептидов [35]. В случае полноразмерных пептидов (например, A β (1–42)), Zn(II)-индуцированные димеры могут стабилизироваться дополнительным взаимодействием между участками C-концевых доменов (аминокислотные остатки с 17 по 42). При этом каждый димер имеет два интерфейса (His14/Glu11 и His6/His13) для Zn(II)-опосредованного взаимодействия с другими димерами и мономерами A β , что обеспечивает олигомеризацию пептидов по цепному механизму через формирование «цинковых мостиков» [35].

Агрегация A β зависит от изменений в полипептидной цепи пептида – замен и ПТМ аминокислотных остатков. В настоящее время известен ряд аминокислотных замен в A β , связанных с мутациями в гене *APP*, таких как замены остатка глутаминовой кислоты в положении 22 полипептидной цепи A β на остатки глутамина, глицина или лизина (E22Q, E22G или E22K соответственно), а также замены A21G, D23N, L34V, A42T [36]. Часть замен локализована в МСД A β : A2V, H6R (английская мутация), D7N (мутация Тоттории), D7H (тайваньская мутация), E11K и K16N [36]. Большая часть мутаций приводит к изменениям в скорости спонтанной агрегации, морфологии и токсичности формирующихся олигомеров и агрегатов A β [37]. Мутации, локализованные в МСД, влияют на координацию ионов цинка и меди и, таким образом, на характеристики металл-индуцированной агрегации A β [38]. Наряду с мутациями, существует широкий спектр ПТМ аминокислотных остатков в A β , таких как изомеризация остатков аспарагиновой кислоты (Asp1 и Asp7), нитрование остатка тирозина (Tyr10), фосфорилирование остатков серина (Ser8 и Ser26), окисление метионина (Met35) и превращение остатка глутаминовой кислоты в остаток пироглутаминовой кислоты в позиции 3, сопровождаемое транкированием пептида с N-конца [26]. Около 75% A β в сенильных бляшках содержат изомеризованный остаток аспарагиновой кислоты в позиции 7, а последние три типа модификаций повышают склонность A β к спонтанной агрегации и/или токсичности формирующихся агрегатов [26], что указывает на важную роль ПТМ в патогенезе БА. Так, предполагают [11], что именно A β с изомеризованным Asp7 (isoD7-A β), образующийся спонтанно вследствие «белкового старения» как агрегированных, так и циркулирующих молекул A β , способен образовывать аномально долгоживущий комплекс с никотиновым холинорецептором, формируя, таким образом, «амилоидную матрицу», которая при синаптическом

всплеске концентрации ионов $Zn(II)$ инициирует $Zn(II)$ -опосредованную олигомеризацию эндогенного $A\beta$, давая начало амилоидной бляшке.

III. ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ В ИССЛЕДОВАНИИ β -АМИЛОИДА

ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ β -АМИЛОИДА

На сегодняшний день доминирующим направлением электрохимии, используемым при изучении свойств $A\beta$, является вольтамперометрия – группа методов, основанная на исследовании зависимости тока поляризации (I) от напряжения (E), прикладываемого к электрохимической ячейке $I = f(E)$, когда потенциал рабочего электрода значительно отличается от равновесного значения [39]. Результаты измерений представляют в виде поляризационных (вольтамперных) кривых, которые получают в процессе электролиза раствора анализируемого вещества при поэтапном увеличении напряжения с одновременной регистрацией при этом силы тока. При этом электрохимическая активность $A\beta$, то есть способность пептида окисляться и/или восстанавливаться на поверхности электрода в процессе электрохимических реакций, определяется входящими в него аминокислотными остатками [40–43]. В 2005 [44] и 2008 [45] годах японскими учеными была впервые показана способность пептидов $A\beta(1-40)$ и $A\beta(1-42)$ окисляться на поверхности стеклоуглеродного и модифицированного золотом печатного графитового электродов за счёт превращений единственного остатка тирозина (Tyr10), генерируя сигнал при потенциале около 0.5–0.7 В (отн. $Ag/AgCl$, нейтральный pH). В это же время Lokszejn *et al.* [46] при изучении электрохимической активности полипептидных пленок поли(L-тирозина) и инсулина с помощью циклической и дифференциальной импульсной вольтамперометрии было выявлено различное электрохимическое поведение остатков Tyr макромолекул, определяемое конформацией полипептидных цепей. Данное явление было объяснено разной электрохимической доступностью остатков Tyr в каждой структуре [46]. Было обнаружено, что сигнал окисления остатка Tyr чувствителен к изменению концентрации пептидов, их агрегатного состояния и конформации полипептидных цепей [44–46]. Полученные результаты легли в основу применения вольтамперометрии в биохимических исследованиях, прежде всего, нейродегенеративных заболеваний, и в частности БА [47].

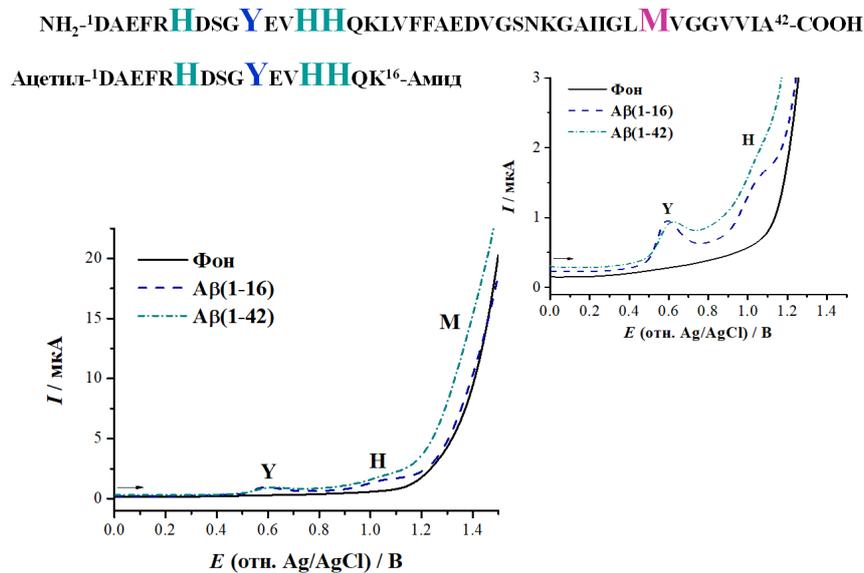


Рис. 2. Квадратно-волновые вольтамперограммы окисления $A\beta(1-16)$ и $A\beta(1-42)$.

В настоящее время несколькими научными группами показаны сигналы окисления как полноразмерного $A\beta$ ($A\beta(1-42)$), так и других аллоформ и изоформ $A\beta$ с помощью различных методов вольтамперометрии (циклической, квадратно-волновой и дифференциальной импульсной) за счёт трех видов аминокислотных остатков: Tyr, His и Met [44, 45, 48–53]. На вольтамперной кривой окисления $A\beta(1-42)$ можно выделить три области увеличения тока (Рис. 2): чёткий пик с потенциалом максимума при 0.6 В (Tyr10), менее выраженный пик с потенциалом максимума около 1 В (His6, His13, His14) и широкую волну, берущую начало при потенциале 1 В и продолжающуюся до конца области развертки (Met35) [41, 54]. В случае $A\beta(1-16)$ пики окисления более выражены, а волна в области 1–1.5 В пропадает, что согласуется с лучшей растворимостью пептида $A\beta(1-16)$ в воде и отсутствием в его последовательности Met35 по сравнению с $A\beta(1-42)$. Группой Oliveira-Brett [50] было показано электрохимическое окисление пептидов $A\beta(1-42)$ и $A\beta(1-40)$ и их мутантных вариантов на стеклоуглеродном электроде в форме двух пиков в областях 0.65 и 1 В (отн. Ag/AgCl). Отнесение первого сигнала к окислению Tyr10 не вызывает сомнений. Второй сигнал с потенциалом максимума 1 В был интерпретирован как одновременное окисление остатков His и

Met (исследование проводили в области потенциалов до 1.2 В) [50]. Из всех аминокислотных остатков Аβ, наиболее легко окисляется Туг10 как в Аβ(1–42), так и в других аллоформах, давая пик при потенциале 0.5–0.7 В (отн. Ag/AgCl) в средах с нейтральными рН [44, 49, 51, 52]. Сигнал окисления Туг10 может служить «маркёром» агрегации и комплексообразования пептидов семейства Аβ. В свою очередь, остатки His представляют наибольший интерес для изучения взаимодействия Аβ с ионами металлов, т. к. напрямую вовлечены в образование комплексов ион металла/пептид с последующей металл-индуцированной агрегацией [33, 55, 56]. Регистрация сигнала окисления остатка Met35 также потенциально может быть полезна при изучении агрегации Аβ [50, 51, 53].

Сигнал окисления Аβ за счёт Туг10 при потенциале около 0.5–0.7 В пропорционален концентрации пептида [44, 49]. При высоких концентрациях (50–100 мкМ) токи пиков окисления убывают в ряду Туг > Аβ(1–16) > Аβ(1–42), что можно объяснить увеличением молекулярной массы, приходящейся на одну электроактивную ароматическую ОН-группу и замедлением скорости диффузии к поверхности электрода при переходе от свободной аминокислоты к пептидам разной длины [49]. Важно отметить нелинейный характер зависимостей токов пиков окисления, полученных для пептидов Аβ(1–16), Аβ(1–40) и Аβ(1–42), от их концентрации, в отличие от свободной аминокислоты Туг, вероятно, из-за вклада других аминокислотных остатков в конформацию пептида и влияния адсорбции пептидов на поверхности электродов из углеродных материалов [44, 49]. Методом квадратно-волновой вольтамперометрии с использованием стеклоуглеродного электрода был достигнут предел обнаружения пептидов Аβ(1–40) или Аβ(1–42) в 0.7 мкг/мл для каждой аллоформы [44]. Однако применение прямой электрохимической детекции Аβ за счёт окисления Туг10 в биологических образцах ограничено присутствием в матрице структурно или электрохимически родственных соединений, препятствующих селективному анализу [47]. Современные электрохимические биосенсоры для определения концентрации Аβ основаны на селективном связывании мономеров пептида биораспознающими элементами, такими как антитела, аптамеры, белок-связывающий пептид или клеточный прионовый белок, и имеют пределы обнаружения от 0.1 пМ до 0.5 нМ [47, 57]. Один из первых электрохимических биосенсоров для определения микромолярных концентраций Аβ был разработан в 2008 году [45]. В его основу было положено окисление Туг10, а селективность определения обеспечивалась за счёт связывания Аβ с молекулами

сахарида, ковалентно иммобилизованного на поверхности печатного графитового электрода, модифицированного золотом [45]. Предел обнаружения такого биосенсора составил 1 мкМ для обоих пептидов, $A\beta(1-40)$ или $A\beta(1-42)$ [45].

Электрохимический сигнал белковой молекулы за счёт окисления аминокислотных остатков оказался чувствительным к изменению аминокислотной последовательности и пространственной структуры. Данный эффект был показан на примере пептидов $A\beta(1-16)$ и $A\beta(1-42)$ и их изоформ, включающих пептиды с различными мутациями и ПТМ [49–53, 58, 59]. В частности, методом квадратно-волновой вольтамперометрии было проведено исследование нескольких изоформ $A\beta(1-16)$, а именно pS8- $A\beta(1-16)$ (с фосфорилированным остатком Ser в положении 8), H6A-H13A- $A\beta(1-16)$ (с двойной заменой остатков His в положении 6 и 13 на остатки Ala), а также изоформ с аминокислотными заменами, ассоциированными с мутациями в гене *APP*, D7N- $A\beta(1-16)$, D7H- $A\beta(1-16)$ и H6R- $A\beta(1-16)$ (мутации Тоттори, тайваньская и английская соответственно), и E11K- $A\beta(1-16)$ [59]. Для всех пептидов были зарегистрированы чёткие пики окисления Tyr10 с потенциалами максимума 0.55–0.59 В (концентрация, 50 мкМ; HEPES-буфер, pH 6.8). Высоты пиков окисления мутантов H6A-H13A- $A\beta(1-16)$ и pS8- $A\beta(1-16)$ были соответственно на 60% и на 40% ниже, чем для $A\beta(1-16)$. С другой стороны, высоты пиков E11K- $A\beta(1-16)$ и D7H- $A\beta(1-16)$ были выше, чем пик окисления $A\beta(1-16)$ на 50% и 15% соответственно. Таким образом, вольтамперометрия позволила: отличить некоторые мутанты от «нормального» варианта $A\beta(1-16)$ и различить некоторые пептиды между собой. В продолжение, было изучено электрохимическое поведение $A\beta(1-42)$ выше пика мутантов и его D7H- $A\beta(1-42)$, H6R- $A\beta(1-42)$ и pS8- $A\beta(1-42)$ [51]. Протестированные полноразмерные пептиды $A\beta$ с аминокислотными заменами и модификацией показали чёткие пики окисления за счёт остатка Tyr10 с потенциалами максимума 0.60–0.63 В. Высоты пиков окисления D7H- $A\beta(1-42)$ и pS8- $A\beta(1-42)$ значимо отличались от данных для «нормального» $A\beta(1-42)$. Интересно, что вызванные мутациями изменения сигналов окисления $A\beta(1-42)$ и $A\beta(1-16)$ не согласуются между собой [51, 59]. Так, высота пика окисления D7H- $A\beta(1-42)$ была ниже по сравнению с «нормальным» вариантом $A\beta(1-42)$, а высота пика окисления D7H- $A\beta(1-16)$ значимо выше, чем у $A\beta(1-16)$. Модификация pS8 в $A\beta(1-42)$ приводила к увеличению интенсивности пика окисления Tyr10 пептида по сравнению с нефосфорилированным $A\beta(1-42)$, а подобная модификация в $A\beta(1-16)$, напротив, характеризовалась резким снижением сигнала.

Дополняя пик окисления Tug10 сигналами других электроактивных аминокислотных остатков Aβ, можно повысить точность и расширить области применения метода вольтамперометрии в отношении пептидов. Так, вольтамперограммы, прописанные в двух областях, от 0.75 до 1.25 В (характерной для окисления остатка His), и в области от 0.2 до 0.9 В (характерной для окисления остатка Tug) позволили различить между собой образцы пептидов Aβ(1–16), H6A-H13A-Aβ(1–16) и Aβ(1–16) крысы (κAβ(1–16)), отличающийся несколькими а. о. от человеческого Aβ(1–16) [49]. Замена в последовательности пептида Aβ(1–16) двух из трёх остатков His на остаток Ala привела к практически полному исчезновению пика в области 1 В, что свидетельствует о непосредственном участии His6 и/или His13 в электродной реакции. Пептид κAβ(1–16), имеющий в своей последовательности два остатка His в положениях 6 и 14 и не содержащий ни одного остатка Tug, также продемонстрировал сигнал окисления с потенциалом максимума при 1.05 В. В то же время κAβ(1–16) не дал сигнала окисления в области, характерной для остатка Tug [49]. Аналогичный результат был получен при исследовании набора пептидов Aβ, включающего Aβ(1–16), Aβ(1–28), Aβ(10–20), Aβ(12–28), Aβ(17–42) и Aβ(1–40) с помощью вольтамперометрии и атомно-силовой микроскопии (АСМ) [53]. Целью исследования [53] было определить влияние различных доменов Aβ, а именно ¹²VH¹⁵NQ (содержащего электроактивные остатки His), ¹⁶KL²⁰VFF (представляющего собой ядро гидрофобной агрегации пептида) и ³⁰PL⁴⁰GLM⁴⁰VGGV (являющегося гидрофобной областью С-конца) на механизм фибриллизации. Методом дифференциальной импульсной вольтамперометрии по двум пикам окисления Aβ при 0.65 и 1 В (отн. Ag/AgCl), относящимся к остаткам Tug и остаткам His и Met соответственно, были получены характерные значения величин токов обоих пиков в зависимости от аминокислотного состава каждого пептида [53]. Проведённый анализ электрохимического поведения различных пептидов позволил не только подтвердить соответствие регистрируемых сигналов определённым аминокислотным остаткам, но и заложить основы способа идентификации пептидов [49, 53]. Можно заключить, что регистрация вольтамперограмм в нескольких заданных областях потенциалов позволяет отнести неизвестный образец к тому или иному пептиду на основе имеющихся (или предполагаемых) данных о его аминокислотной последовательности. Разработанный способ идентификации пептидов в будущем может быть расширен созданием баз данных вольтамперограмм пептидов различной длины, содержащих различное число аминокислотных остатков каждого типа.

Согласно механизмам электрохимических реакций, модификация аминокислот должна приводить к изменению регистрируемого электрохимического сигнала. Показано, что О-фосфорилирование Туг блокирует реакцию его окисления через ОН-группу бензольного кольца (Рис. 3), что ведёт к исчезновению сигнала при 0.5–0.7 В на вольтамперограмме [19, 58, 60]. Подобный эффект О-фосфорилирования единственного остатка Туг на электрохимический сигнал окисления наблюдали для пептидов А β (1–16) [58] и фрагмента Src(521–533) белка p60^{c-src} (протеинкиназа, ассоциированная с онкогенезом) [61]. Интересно отметить, что О-сульфатация оказывает такой же блокирующий эффект на сигнал окисления Туг, как и О-фосфорилирование [60]. Добавление нитрогруппы в третье положение бензольного кольца также затрудняет окисление Туг, сдвигая пик в область более положительных потенциалов (Рис. 3) [58, 60]. Сигнал восстановления нитрогруппы, зарегистрированный при потенциале –0.75 В, позволил отличить nТуг (нитротирозин) от обычного Туг [19, 58], «нормальный» и пронитрованный БСА [19], а также «нормальный» и пронитрованный А β (1–16) (Рис. 3) [58]. Подобно восстановлению нитрогруппы в nТуг, некоторые химические группы, присоединенные к белковой молекуле в результате ПТМ, могут генерировать свой собственный электрохимический сигнал. Так, фосфорилированный и сульфатированный Туг (pТуг и sТуг соответственно) дали чёткие пики окисления за счёт новых химических групп на циклических вольтамперограммах (электрод из допированного бором алмаза, Tris-буфер, рН 6.5, отн. Ag/AgCl) при 1.4 В для pТуг и при 1.7 В для sТуг [60]. О-фосфорилирование Туг и Ser было исследовано методом квадратно-волновой вольтамперометрии на печатных графитовых электродах на примере А β (1–16) [58]: модифицированные свободные аминокислоты pТуг и pSer, также как и пептиды pY10-А β (1–16) и pS8-А β (1–16), давали новую волну при потенциалах 1.1–1.7 В. Процесс окисления при таких высоких потенциалах был отнесён к окислению фосфорильной группы. Очевидно, что эффект ПТМ на электрохимическое поведение аминокислоты будет зависеть от положения новой группы в молекуле. Как обсуждалось, новая химическая группа может блокировать электроактивную группу аминокислоты (как в случае pТуг) или оказаться рядом с электроактивной группой (как в случае nТуг). Так, окисление остатка His в природе приводит к образованию 2-оксо-His [62, 63]. Присоединение какой-либо новой группы во второе положение имидазольного кольца или рядом с ним (положения N1 или N3), скорее всего, будет значительно влиять на электродную реакцию

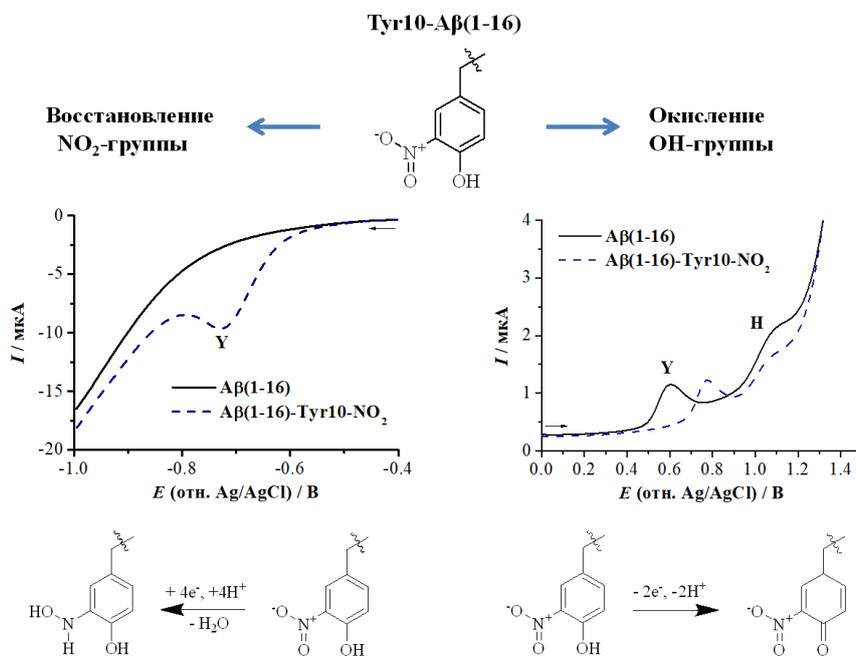


Рис. 3. Вольтамперометрическая детекция ПТМ белковых молекул на примере Аβ(1–16) с остатком 3-нитротирозина.

окисления остатка His (Рис. 3). Однако модификация остатков His в положения N1 или N3 имидазольного кольца, например, метилирование, показано только для небольшого числа белков в прокариотических и эукариотических клетках [64]. В природе наиболее часто метильная группа присоединяется к α-азоту аминокислоты His с появлением монометил-, диметил- и триметилHis [65, 66], что из-за особенностей строения молекул менее перспективно для электроанализа. Таким образом, чувствительность электрохимических реакций к модификации аминокислот открывает новые возможности детекции ПТМ, особенно в различных системах *in vitro* [67].

В отличие от общепринятой ранее точки зрения, согласно которой только шесть аминокислот могут быть непосредственно электроокислены через боковые цепи на твердых (углеродных) электродах (схемы реакций приведены в обзоре [16]), в 2020 году нашей группой было открыто специфическое электрохимическое окисление почти всех протеиногенных аминокислот (за исключением Glu) с помощью амперометрического проточно-инжекционного анализа (ПИА) на

печатных графитовых электродах (К-фосфатный буфер, pH 6.0) [68]. ПИА основан на вводе (инъекции) определённого объема пробы в создаваемый перистальтическим насосом неразрывный, несегментированный, ламинарный поток носителя, содержащего необходимые для протекания аналитической реакции реагенты [69]. При этом проба заданного микрообъёма движется по направлению к детектору в потоке инертного носителя (или раствора реагента). В потоке образуется зона образца. По мере продвижения к детектору исследуемая жидкость смешивается с носителем (или реагентом), то есть происходит дисперсия (размывание) пробы. Регистрация сводится к непрерывному измерению детектором какой-либо физической величины (в случае амперометрического ПИА – величины тока окисления или восстановления при заданном потенциале), зависящей от концентрации определяемого вещества в потоке раствора. Аналитический сигнал имеет форму пика, высота (ширина, площадь) которого зависит от концентрации определяемого вещества в пробе [69]. Было обнаружено, что модификация электродов Берлинской лазурью (БЛ, гексацианоферрат железа, $\text{Fe}^{\text{III}}_4[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_6]_3$) катализирует электроокисление аминокислот, приводя к увеличению сигналов как свободных аминокислот, так и белковых молекул [68]. Наиболее эффективный катализ с 54-, 31- и 11-кратным усилением тока наблюдали для Gln, Ser и His соответственно на электродах, модифицированных БЛ. Специфическое окисление аминокислот и их остатков в белковых молекулах открывает новый путь для изучения конформационных изменений белков и пептидов, регистрации аминокислотных замен, связывания лигандов, окислительного повреждения и ПТМ [68]. В частности, метод амперометрического ПИА с использованием печатных графитовых электродов, модифицированных БЛ, был успешно применен для определения пептидов семейства А β (К-фосфатный буфер, pH 6.0) [70]. Интересно, что выраженный каталитический эффект БЛ (увеличение тока в 10–27 раз) был обнаружен для пептидов А β , лишенных Tug10, а именно D7N-A β (1–7), кА β (1–16) и Y10A-A β (1–16), в то время как практически никакого влияния БЛ не наблюдалось для мутантов D7N-A β (1–16), H6R-A β (1–16) и E11A-A β (1–16). При этом на электродах, модифицированных БЛ, при окислении А β (1–16) получили только 1.5-кратное увеличение тока. Таким образом, комбинирование ПИА и печатных графитовых электродов, модифицированных БЛ, открывает новый путь для электрохимического исследования пептидов, лишенных по своей природе электроактивных остатков Tug, Trp, Cys, His и Met, проявляющих сигналы окисления в классической вольт-

амперометрии. Примеры таких пептидов встречаются среди изоформ Аβ как в природе, так и среди модельных пептидов, синтезированных для исследования *in vitro* механизмов агрегации Аβ и формирования комплексов пептида с ионами металла [70].

ВОЛЬТАМПЕРОМЕТРИЧЕСКАЯ ДЕТЕКЦИЯ СПОНТАННОЙ АГРЕГАЦИИ β-АМИЛОИДА

Агрегацию амилоидогенных белков и пептидов исследуют с помощью комплекса физико-химическими методами, в том числе электрохимических [13, 22, 71]. Электрохимические методы обнаружения белковых молекул – мощный инструмент для изучения агрегации Аβ [22, 71]. Сигнал окисления Туг10 Аβ, измеренный на стеклоуглеродном электроде методом квадратно-волновой вольтамперометрии, был впервые использован для изучения кинетики агрегации пептидов Аβ(1–40) и Аβ(1–42) Vestergaard *et al.* в 2005 году [44]. К настоящему времени, сигнал окисления Аβ за счёт Туг10 зарегистрирован на электродах из различных углеродных материалов, включая самые современные, такие как восстановленный оксид графена [72]. С увеличением количества пептида в агрегированном состоянии, подтверждённым флуоресцентным тестом с тиофлавином Т и АСМ, электрохимический сигнал Аβ снижается [44, 72]. Вольтамперометрия позволяет напрямую (без меток) проводить исследования ранних стадий агрегации, во время которых образуются высоко токсичные растворимые формы амилоида [13, 22, 71].

В ходе прогрессирующей самоассоциации Аβ происходит изменение конформации пептида – переход от доминирующего состояния «случайного клубка» к упорядоченной структуре в составе агрегатов. Это приводит к тому, что остатки Туг10 Аβ оказываются в изолирующем слое «неэлектроактивных» аминокислотных остатков, что приводит к экранированию ароматической ОН-группы Туг10 и блокированию её электрохимического окисления на поверхности электрода [71]. Потеря сигнала окисления Аβ может быть связана с образованием как фибриллярных, так и предфибриллярных агрегатов пептида [71]. Ингибирование неправильного сворачивания белков и пептидов в нейротоксичные олигомерные агрегаты – одна из стратегий поиска лекарственных средств для лечения нейродегенеративных заболеваний. Электрохимический анализ – экономически эффективный и удобный инструмент скрининга химических соединений для выявления *in vitro* веществ, препятствующих агрегации Аβ, а также для исследования механизмов их антиагрегационной активности [44, 71]. Так, вольтамперометрия с успехом была использована для изучения

кинетики агрегации $A\beta$ в присутствии производных сим-триазина [73], пентапептида LPFFD [74] и пептида RGKLVFFGR-NH₂ [75], блокирующих образованию β -структуры при агрегации $A\beta(1-42)$.

Развивая стратегию, предложенную Vestergaard *et al.* [44], группа Oliveira-Brett [50] с помощью вольтамперометрии и АСМ исследовала кинетику агрегации $A\beta(1-40)$ и $A\beta(1-42)$, начиная с растворимых мономеров и заканчивая полностью сформированными фибриллами. Результаты были сопоставлены с результатами, полученными для пептидов с обратными последовательностями, $A\beta(40-1)$ и $A\beta(42-1)$, а также пептидов, содержащих замены Tyr10 на остаток Phe и Met35 на остаток Nle (норлейцина), и $kA\beta(1-40)$. Агрегация пептидов происходила при комнатной температуре в фосфатном буфере без механического перемешивания. Как было выявлено с помощью АСМ, процесс последовательного изменения молекулярной формы для каждого пептида происходил с индивидуальной скоростью через формирование агрегатов различной морфологии. Дифференциальная импульсная вольтамперометрия показала, что в соответствии с первичной структурой пептиды $A\beta$ подвергаются окислению в одну или две стадии: первая стадия соответствует окислению Tyr10 (0.65 В), вторая – окислению остатков His-6, His-13, His-14 и Met35 (1 В, отн. Ag/AgCl). Процесс фибриллизации $A\beta$ был зарегистрирован электрохимически по уменьшению во времени токов пиков окисления аминокислотных остатков пептида [50]. Далее, та же научная группа протестировала набор пептидов $A\beta$, состоящий из $A\beta(1-16)$, $A\beta(1-28)$, $A\beta(10-20)$, $A\beta(12-28)$, $A\beta(17-42)$ и $A\beta(1-40)$, методом дифференциальной импульсной вольтамперометрии, регистрируя для каждого из пептидов изменение от времени агрегации высот двух пиков в областях 0.65 и 1 В (отн. Ag/AgCl), отнесенных к окислению остатков Tyr и остатков His и Met соответственно [53]. В результате исследований была обнаружена корреляция между наличием интактного высокогидрофобного ядра агрегации ¹⁶KLVFF²⁰ и зависящими от времени изменениями агрегации пептидов $A\beta$. Гидрофобный С-концевой домен ³⁰IIGLMVGGV⁴⁰, присутствующий в случае $A\beta(1-40)$, также способствовал ускоренной агрегации и фибриллизации пептида [53].

В дополнение к уже имеющимся данным, перед нашей научной группой стояла задача выявить количественную зависимость величины сигнала окисления $A\beta(1-42)$ за счёт Tyr10 от агрегационного состояния пептида [76]. С этой целью препарат полноразмерного пептида $A\beta(1-42)$ мономеризовали по специальной методике (с пропусканием раствора пептида через фильтр с порогом отсечения 10 кДа). Процесс

агрегации пептида *in vitro* ускоряли нагреванием до 37 °С и постоянным механическим перемешиванием раствора [76]. Образцы Аβ(1–42) в различном агрегационном состоянии были проанализированы одновременно тремя физико-химическими методами: динамическим светорассеянием (позволяющим измерить средний диаметр агрегатов в образцах – D); флуоресцентным анализом на основе красителя тиофлавина Т (позволяющим получить информацию о формировании агрегатов с β-структурной организацией – F) и вольтамперометрией (регистрирующей сигнал окисления Туг10 в молекулах пептида – $I_{\text{пик}}$) [76]. Зависимости тока пика окисления Туг10 Аβ(1–42) от диаметра образующихся агрегатов и относительной флуоресценции тиофлавина Т (F/F_0) имели S-образную форму. Пик окисления Аβ(1–42) начинал снижаться при достижении агрегатами размера 20 нм. Более глубокое снижение величины пика окисления наблюдалось при размере агрегатов около 35 нм. В то же время величина пика окисления оставалась неизменной (в пределах экспериментальной ошибки) при значениях F/F_0 от 1 до 3, начиная снижаться при значениях относительной флуоресценции выше 3. При размере агрегатов выше 35 нм и F/F_0 выше 3 снижение пика окисления могло быть описано линейными функциями: $I_{\text{пик}}, \text{мкА} = 0.29 - 1.93 \times D, \text{нм}; R^2 = 0.952$ и $I_{\text{пик}}, \text{мкА} = 0.279 - 0.014 \times (F/F_0), R^2 = 0.937$ (D составляет от 37 до 128 нм и F/F_0 – от 3.2 до 17.6 [76]). Из полученных результатов следовало, что электрохимическая регистрация агрегации Аβ(1–42) не чувствительна к изменению размера агрегатов вплоть до достижения ими 35 нм в диаметре. Необходимо отметить, что агрегаты таких размеров достаточно крупные. Так, бычий сывороточный альбумин (БСА) с молекулярной массой 66 кДа, существенно превышающей 4.5 кДа у Аβ(1–42), показал в тех же экспериментальных условиях диаметр молекул 6.4 нм. Было неожиданным, что включение молекул Аβ(1–42) в такие крупные агрегаты (35 нм) не оказывает значимого влияния на значение тока пика окисления Туг10, который в агрегатах экранируется от поверхности электрода другими аминокислотными остатками. Можно предположить, что интенсивность сигнала окисления Аβ(1–42) сохраняется на постоянном уровне из-за того, что только небольшая доля пептида находится в агрегированной форме. Таким образом, можно сделать вывод, что пик окисления Аβ(1–42) через остаток Туг10 генерируется преимущественно мономерами пептида, и за снижение пика окисления ответственно снижение количества мономеров в образце в результате агрегации. Следовательно, изменение сигнала окисления Аβ(1–42) может служить мерой относительного числа пептидов, не включенных в агрегаты, или мерой мономерности

препарата пептида [76]. Так, токи окисления Tug10 для $A\beta(1-42)$, pS8- $A\beta(1-42)$ и isoD7- $A\beta(1-42)$ уменьшались с близкой скоростью в ходе спонтанной агрегации пептидов [77]. Это говорит о том, что данные изоформы $A\beta$ обладают сходной способностью к агрегации. Показано, что сигнал окисления $A\beta$ генерируется пептидными молекулами, составляющими «растворимую» (устойчивую к осаждению центрифугированием) фракцию в ходе спонтанной агрегации $A\beta$ в условиях *in vitro* [77]. Чтобы проверить, вносят ли крупные агрегаты, образующиеся в растворах $A\beta(1-42)$ в процессе агрегации какой-либо вклад в общий ток окисления, были измерены значения сигналов окисления для образцов агрегированного $A\beta(1-42)$, подвергнутых или не подвергнутых центрифугированию (16000 g, 20 мин, комнатная температура) [77]. Крупные склонные к осаждению агрегаты были, вероятно, в наибольшей степени ответственны за наблюдаемое увеличение флуоресценции тиофлавина Т и мутности растворов пептидов. Интересно, что значимых различий между значениями токов пиков окисления для центрифугированных и нецентрифугированных образцов не обнаружили. Следовательно, крупные склонные к осаждению агрегаты $A\beta(1-42)$ не вносят вклада в общий ток окисления. Наблюдаемые достаточно высокие уровни «остаточного» тока окисления предположительно отражают гетерогенность препаратов $A\beta(1-42)$. По-видимому, даже после длительного периода инкубации в препаратах $A\beta(1-42)$ могут существовать различные типы агрегатов, включая агрегаты, богатые β -структурами, такие как протофибриллы и зрелые фибриллы, высокомолекулярные и низкомолекулярные олигомеры, и, возможно, мономерные молекулы. Окисление оставшихся мономеров $A\beta(1-42)$, а также пептидных молекул, которые являются частью устойчивых к осаждению агрегатов (представленных, скорее всего, низкомолекулярными и высокомолекулярными олигомерами), вероятно, приводит к наблюдаемому «остаточному» току даже после длительной инкубации (5 часов) [77]. Таким образом, электрохимический анализ, основанный на окислении $A\beta(1-42)$, давая информацию об убыли мономеров пептида, дополняет методы, способные проводить мониторинг агрегации пептида на основе наблюдения за изменением структуры и размера агрегатов.

ВОЛЬТАМПЕРОМЕТРИЧЕСКАЯ ДЕТЕКЦИЯ
КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЯ β -АМИЛОИДА С ИОНАМИ ПЕРЕХОДНЫХ
МЕТАЛЛОВ И МЕТАЛЛ-ИНДУЦИРОВАННОЙ АГРЕГАЦИИ

Как известно, амилоидные бляшки, являющиеся отличительным признаком БА, состоят в основном из агрегированного $A\beta$, а также содержат высокие концентрации ионов металлов, таких как $Cu(I/II)$, $Zn(II)$ и $Fe(II/III)$ [38, 78]. Ионы $Cu(I/II)$, $Zn(II)$ непосредственно связываются с $A\beta$ *in vivo*. В настоящее время взаимодействие $A\beta$ с ионами металлов активно исследуют с помощью различных физико-химическими методами в системах *in vitro*: изотермической титрационной калориметрией, электронным парамагнитным резонансом, ядерным магнитным резонансом, масс-спектрометрией, целым рядом оптических методов и различными электрохимическими методами [79–84]. При этом необходимо отметить, что взаимодействие $A\beta$ с ионами металлов можно разделить на две стадии: комплексообразование и агрегацию. В большинстве случаев, образование комплекса $A\beta$ с ионами металлов провоцирует последующую агрегацию пептида.

Вольтамперометрия позволяет зарегистрировать образование пептидных комплексов с ионами металлов как по изменению редокс-сигнала соответствующего металла (например, $Cu(I/II)$) [85, 86], так и по изменению сигнала окисления электроактивных аминокислотных остатков пептида (для $A\beta$, главным образом, Tyr10) [42]. Добавление к образцу $A\beta$ ионов металла, таких как $Cu(II)$ или $Zn(II)$, приводит к закономерному снижению сигнала окисления пептида и сдвигу потенциала максимума пика в сторону более положительных потенциалов (Рис. 4). В случае же металл-индуцированной агрегации, сигнал окисления аминокислотных остатков не сопровождается сдвигом потенциала максимума пика (Рис. 4). Так, электрохимическая активность $A\beta$, определяемая Tyr10, была использована для изучения действия ионов $Fe(II)$, $Cu(II)$, $Zn(II)$ и $Mg(II)$ на кинетику агрегации пептида [59, 87–90]. В частности, Geng *et al.* [88] показали, что агрегация $A\beta(1-40)$, инициированная ионами $Zn(II)$ или $Cu(II)$, зависит от концентрации ионов и обратима под действием этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА). Интенсивность пика окисления Tyr10 $A\beta(1-40)$ значительно снижалась в присутствии ионов $Zn(II)$ или $Cu(II)$, но не менялась в присутствии ионов $Mg(II)$, свидетельствуя, что связывание иона металла может изменять конформацию молекулы пептида и влиять на микроокружение Tyr10. Однако в работе [88] не был оценен количественный вклад стадии образования комплекса в снижение электрохимического сигнала окисления $A\beta(1-40)$, так

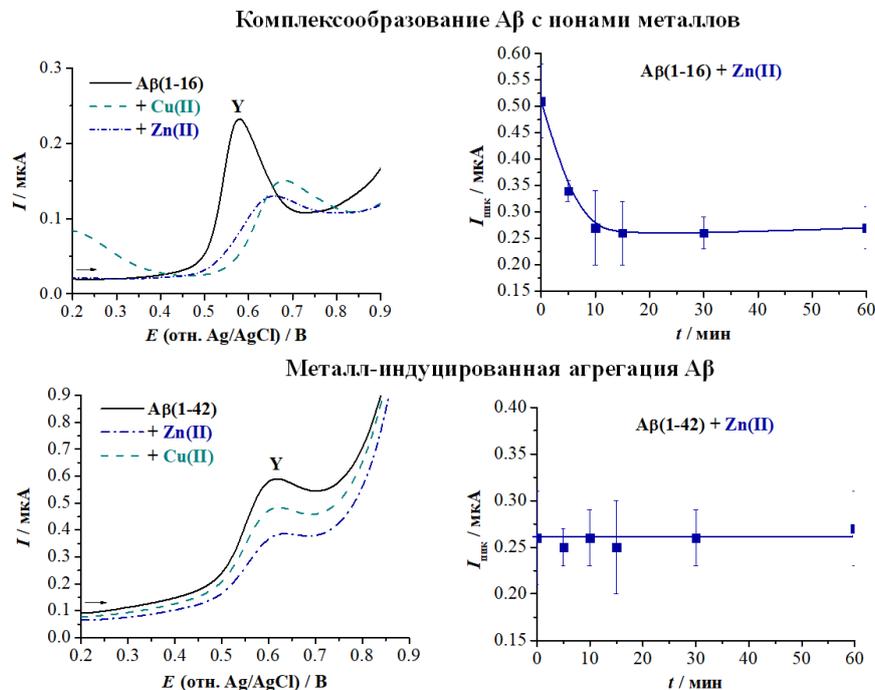


Рис. 4. Вольтамперометрическая детекция комплексообразования β -амилоида с ионами металлов и металл-индуцированной агрегации.

как и ионы $Zn(II)$, и ионы $Cu(II)$ сразу же инициировали агрегацию $A\beta$ *in vitro* [79]. В другом исследовании Hung *et al.* [87] изучали вклад ионов $Fe(II)$, $Cu(II)$ и $Zn(II)$ в изменение сигнала окисления $Tyr10$ от времени агрегации для синтетических пептидов $A\beta(1-42)$ и $A\beta(1-16)$. Цель работы [87] состояла в оценке вклада МСД (а. о. 1–16), богатого остатками His, и гидрофобной части $A\beta$ (а. о. 17–42) в кинетику агрегации пептида. Было показано, что в присутствии указанных ионов металлов уровень агрегации $A\beta(1-42)$ выше, чем $A\beta(1-16)$. Ионы $Fe(II)$ и $Zn(II)$, в отличие от ионов $Cu(II)$, вызывали агрегацию $A\beta(1-16)$ [87], затрудняя разделение вклада связывания иона металла в комплекс с пептидом от вклада агрегации в изменение сигнала окисления $Tyr10$ пептида. Более того, все эксперименты в работе [87] были проведены в фосфатном буфере, в котором возможно образование малорастворимых комплексов между фосфат-анионами и катионами исследуемых металлов [79].

Для разделения стадий комплексообразования и агрегации Аβ, наша группа использовала хорошо растворимый в воде пептид Аβ(1–16) с ацетилированным и амидированным N- и C-концами соответственно, не агрегирующий в присутствии ионов Cu(II) или Zn(II) [89]. При внесении в раствор Аβ(1–16) ионов Cu(II) или Zn(II), ток пика окисления Tyr10 значительно снижался, а потенциал максимума при 0.6 В (Tris-буфер, pH 7.2) сдвигался в сторону положительных значений, указывая на формирование комплексов Me(II)–Аβ(1–16). Когда в исследуемых образцах присутствовали только ионы Cu(II) или Zn(II), при потенциалах близких к нулю наблюдали сигнал ионов Cu(II), в то время как сигнал ионов Zn(II) в выбранной области потенциалов зарегистрирован не был. Если в образце находились и ионы Cu(II), и молекулы Аβ(1–16), электрохимические сигналы обоих компонентов значительно снижались по сравнению с сигналами индивидуальных компонентов. Кроме того, при потенциале 0.2 В появлялся новый пик, возможно, вызванный окислением ионов Cu(I) в комплексе с Аβ(1–16). Сигнал окисления Аβ(1–16) в присутствии ионов Zn(II) или Cu(II) сильно зависел от pH буферного раствора [89]. Эффективное образование обоих комплексов Cu(II)–Аβ(1–16) и Zn(II)–Аβ(1–16) имело место при pH выше 6. Известно, что три остатка His в Аβ (His6, His13 и His14) участвуют в координировании иона Zn(II) в нейтральных средах [91, 92]. При pH > 7, сигнал окисления для комплексов Zn(II)–Аβ(1–16) выходил на нижнее плато, в то время как сигнал Cu(II)–Аβ(1–16) начинал расти и при pH 8–9 возвращался к значениям, близким для образцов без ионов Me(II). Наблюдаемое отличие pH-зависимостей для комплексов Аβ(1–16) с ионами Zn(II) и Cu(II) может быть объяснено различной доступностью ионов металлов для взаимодействия с молекулами пептида при разных значениях pH. Квадратно-волновые вольтамперограммы окисления регистрировали в широкой области потенциалов, от 0 до 1 В, что позволило увидеть сигнал ионов Cu(II) при потенциале близком к 0 В перед пиком окисления Tyr10 при 0.6 В. Сигнал, относящийся к ионам Cu(II), исчезал при pH > 7.5, что может быть вызвано осаждением ионов Cu(II) в виде гидроксида или других малорастворимых соединений. 20-кратный избыток ионов Cu(II) или Zn(II) приводил к примерно двукратному снижению сигнала окисления 50 мкМ Аβ(1–16), но не к его исчезновению. В области соотношений концентраций Me(II)/пептид от 2 до 10, ионы Zn(II) вызывали снижение сигнала Аβ(1–16) сильнее, чем ионы Cu(II). Так как комплекс Аβ(1–16) с ионами Cu(II) более стабилен (согласно константе ассоциации [79]), можно предположить, что в

комплексе $\text{Cu(II)}-\text{A}\beta(1-16)$ Tyr10 более доступен для окисления, чем в $\text{Zn(II)}-\text{A}\beta(1-16)$. В завершении была проведена оценка действие ионов Zn(II) , Cu(II) , Mg(II) и Ca(II) на сигналы окисления $\text{A}\beta(1-16)$, альбумина сыворотки человека (ЧСА), миоглобина скелетных мышц лошади (Мб) и свободного Tyr [89]. Подобно $\text{A}\beta$, ЧСА и Мб способны электрохимически окисляться за счёт остатков Tyr, расположенных на поверхности белковых молекул. Ионы Ca(II) и Mg(II) не изменяли сигналы окисления $\text{A}\beta(1-16)$, белков и свободного Tyr в пределах ошибки эксперимента, в то время как ионы Cu(II) и Zn(II) снижали сигнал электроокисления во всех образцах, с наибольшим эффектом в случае Мб. Известно, что ионы Zn(II) и Cu(II) способны связываться с альбумином и миоглобином [93, 94]. Так как большинство белков способны образовывать комплексы с ионами металлов, дифференциация белков на основе данного электрохимического способа затруднительна (за исключением некоторых особых случаев). Тем не менее, разработанный электрохимический способ [89] может быть эффективно использован для изучения комплексов заданного белка или пептида с ионами металлов *in vitro*, в частности для оценки влияния различных параметров на процесс комплексообразования.

Подтверждением чувствительности сигнала окисления остатка Tyr10 к изменению конформации $\text{A}\beta(1-16)$ при образовании комплекса с ионами металлов служат результаты, полученные с использованием пептидов с аминокислотными заменами [59]. С увеличением концентрации ионов Zn(II) для всех изучаемых «мутантных» пептидов $\text{A}\beta(1-16)$ за исключением H6A-H13A- $\text{A}\beta(1-16)$ наблюдалось монотонное снижение пика окисления Tyr10 [59]. Известно, что три остатка His (His6, His13 и His14) участвуют в координации иона Zn(II) [91, 92, 95]. Таким образом, Tyr10, располагающийся непосредственно в Zn(II) -связывающей области пептида $\text{A}\beta(1-16)$ ${}^6\text{HDSGYEVNH}^{14}$, при образовании координационной сферы может экранироваться, становясь менее доступным для окисления на поверхности электрода. При замещении двух из трех аминокислотных остатков His $\text{A}\beta(1-16)$ (His6 и His13) на остатки Ala зависимость тока пика окисления пептида от концентрации ионов Zn(II) кардинально менялась. Высота пика окисления H6A-H13A- $\text{A}\beta(1-16)$ наблюдали постоянной вплоть до концентрации ионов Zn(II) , равной 100 мкМ (соотношение концентраций Zn(II) /пептид равно 2). При последующем увеличении концентрации ионов Zn(II) (> 100 мкМ) в смеси наблюдается рост пика окисления пептида. Очевидно, что в отсутствии His6 и His13 координационная сфера иона Zn(II) остается незавершенной, и при соотношении Zn(II) /пептид, равном 2 и меньше, не образуется моно-

мерного комплекса между пептидом Н6А-Н13А-Аβ(1–16) и ионом Zn(II). Однако при более высоких соотношениях Zn(II)/пептид подобные мономерные или олигомерные комплексы между ионами Zn(II) и Н6А-Н13А-Аβ(1–16) могут сформироваться. Очевидно, что Tyr10 в таких комплексах более доступен для окисления на поверхности электрода.

Возвращаясь к металл-индуцированной агрегации, напомним, что ионы Zn(II) и Cu(II) способны инициировать патогенную агрегацию Аβ и его изоформ [33]. Электрохимическое исследование металл-индуцированной агрегации Аβ(1–42) в присутствии ионов Zn(II) или Cu(II) подтвердило выдвинутую нами ранее гипотезу об основном вкладе мономеров в сигнал окисления Аβ [90, 96]. В частности, образцы Аβ(1–42) без и в присутствии ионов Zn(II) или Cu(II) были проанализированы тремя физико-химическими методами: динамическим светорассеянием, флуоресцентным анализом с использованием красителя тиофлавина Т и вольтамперометрией. При внесении в раствор мономеризованного Аβ(1–42) ионов Zn(II) или Cu(II) (комнатная температура; молярное соотношение Me(II)/пептид равно 0.125 и выше, HEPES-буфер, pH 6.8) пик окисления Tyr10 для Аβ(1–42) заметно снижался уже через несколько секунд инкубации [90, 96], что объясняется высокой скоростью металл-индуцированной агрегации Аβ(1–42) *in vitro* [79]. Пик окисления Аβ(1–42) в присутствии как ионов Zn(II), так и ионов Cu(II) выходил на нижнее плато при соотношении концентраций Me(II)/пептид, равном 1, что согласуется с данными роста размера образующихся агрегатов, установленным методом динамического светорассеяния. Интересно, что зависимость величины электрохимического сигнала окисления Аβ(1–42) от концентрации ионов Zn(II) по форме практически совпадает с кривой убыли концентрации пептида, остающегося в надосадочной жидкости после центрифугирования. Это ещё раз свидетельствует в пользу предположением о регистрации сигнала, генерируемого окислением оставшихся мономерных молекул пептида, а не образующихся агрегатов. Таким образом, ток пика электроокисления Аβ может служить мерой доли пептидных молекул Аβ, не включенных в индуцированные ионами Zn(II) пептидные агрегаты/олигомеры. Вольтамперометрический анализ кинетики Zn(II)-индуцированной агрегации Аβ(1–42) в комбинации с турбидиметрией и динамическим рассеянием света показал, что Zn(II)-индуцированная агрегация молекул Аβ(1–42) протекает по двухступенчатому механизму, который включает в качестве первой стадии быстрое образование олигомеров Аβ(1–42) (достаточно больших, чтобы эффективно подавлять

электроокисление $A\beta(1-42)$ через Tyr10), за которым следует относительно медленная сборка этих олигомеров в объемные агрегаты микронного размера [96]. В дополнение было показано, что скорость олигомеризации $A\beta(1-42)$, вызванной $Zn(II)$, и, следовательно, общая скорость $Zn(II)$ -индуцированной агрегации $A\beta(1-42)$ сильно зависят от ионной силы раствора. Агрегационное поведение N-усечённой и фосфорилированной изоформ, $A\beta(6-42)$ и pS8- $A\beta(1-42)$, отличалось от поведения пептида $A\beta(1-42)$ [96]. В то время как олигомеры $A\beta(6-42)$, образованные в присутствии $Zn(II)$, продемонстрировали более высокую склонность к формированию агрегатов микронного размера по сравнению с $A\beta(1-42)$, олигомеры pS8- $A\beta(1-42)$, инициированные внесением ионов $Zn(II)$, не обладали способностью образовывать крупные агрегаты. Каждая изоформа $A\beta$ характеризовалась индивидуальной зависимостью тока пика окисления Tyr10 от молярного соотношения ион металла/пептид [90]. Формы кривых свидетельствовали о различиях в процессах $Zn(II)$ и $Cu(II)$ -индуцированной агрегации «мутантных» пептидов D7N- $A\beta(1-42)$ и pS8- $A\beta(1-42)$ по сравнению с «нормальным» $A\beta(1-42)$. В то время как для пептида H6R- $A\beta(1-42)$ значимых различий с $A\beta(1-42)$ выявлено не было. Данные вольтамперометрии хорошо согласовались с данными изменения размеров молекул пептидов от соотношения концентраций ион металла/пептид. Интересно, что в случае пептида pS8- $A\beta(1-42)$, метод динамического светорассеяния не зафиксировал образования крупных агрегатов в результате его взаимодействия с ионами $Zn(II)$ или $Cu(II)$. Очевидно, что электрохимический метод анализа перспективен в качестве дополнительного к существующим физико-химическим методам наблюдения за процессом агрегации пептидов $A\beta$ *in vitro*, так как позволяет количественно детектировать убыль мономеров и небольших олигомеров в анализируемом образце.

Наряду с инициализацией агрегации $A\beta$, ионы переходных металлов (в частности, ионов $Cu(I/II)$) в комплексе с $A\beta$ могут играть роль катализаторов образования в мозге пациентов пероксинитрита и активных форм кислорода (АФК), которые, как предполагают, вносят вклад в прогрессирование БА [38, 78, 97, 98]. В частности, было показано, что комплекс $A\beta$ с ионами $Cu(II)$ ($Cu(II)$ - $A\beta$) способен катализировать образование пероксинитрита из аскорбиновой кислоты, кислорода и оксида азота(II), что ведёт к окислительным повреждениям в мозге [33]. Таким образом, одной из потенциальных мишеней для терапевтических средств против БА является комплекс $Cu(II)$ - $A\beta$, усиливающий выработку АФК. Так, было предположено, что выработку АФК можно замедлить, нарушив взаимодействие между

A β и Cu(II) с помощью соединений, хелатирующих ионы меди, таких как ЭДТА. В частности, используя циклическую вольтамперометрию, исследовали, как различные лиганды (глицин, фенилаланин, бета-аланин, 2,2'-бипиридин, 1,10-фенантролин и дипиридиламин) влияют на электрохимическое поведение ионов меди в растворе, раскрывая важную информацию о механизмах образования АФК и химических взаимодействиях, приводящих к снижению их уровня [98]. Было показано, что АФК образуются как в присутствии A β (1–16), так и Cu(II) в растворе, но количество образующегося H₂O₂ увеличивается при взаимодействии Cu(II) с A β (1–16). При добавлении в образец A β (1–16) с ионами Cu(II) лигандов, хелатирующих медь, происходит снижение выработки АФК [98].

IV. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, электрохимический анализ (в частности, методы вольтамперометрии) – новый удобный инструмент исследования комплексообразования и агрегации A β . Сигнал окисления A β на поверхности электрода генерируется входящими в молекулу аминокислотными остатками (Tyr10; His6, His13, His14; Met35), наиболее используемым из которых является сигнал Tyr10 при потенциале 0.6 В (отн. Ag/AgCl). Изменение величины и положения пика окисления A β на вольтамперной кривой даёт информацию о формировании комплексов A β с ионами металлов и процессе агрегации A β . Детекция агрегации происходит через оценку относительного количества пептидов, находящихся в мономерном состоянии в исследуемом образце. Сочетание электроанализа с методами регистрации структуры и размера агрегатов позволяет глубже понять процесс агрегации различных изоформ β -амилоидных пептидов. Возможности вольтамперометрии, основанной на окислении аминокислотных остатков (в частности, остатков Tyr), для исследования агрегации были также подтверждены на α -синуклеине – белке, представляющем главный компонент телец Леви, вовлечённого в патогенез болезни Паркинсона [99, 100].

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Selkoe, D.J., Hardy, J. (2016) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years, *EMBO Molecular Medicine*, **8**, 595–608.
2. Mielke, M.M. (2018) Sex and Gender Differences in Alzheimer's Disease Dementia, *Psychiatric Times*, **35**, 14–17.
3. Gauthier, S., Rosa-Neto, P., Morais, J.A., Webster, C. (2021) World Alzheimer Report 2021: Journey through the diagnosis of dementia. London: Alzheimer's Disease International.
4. Javaid, S.F., Giebel, C., Khan, M.A., Hashim, M.J. (2021) Epidemiology of Alzheimer's disease and other dementias: rising global burden and forecasted trends, *F1000Research*, **10**, 425.
5. Гаврилова, С.И. (2007) Фармакотерапия болезни Альцгеймера. М.: Пульс, 319 с.
6. Wong, W. (2020) Economic burden of Alzheimer disease and managed care considerations, *The American Journal of Managed Care*, **26**, S177–S183.
7. Wolfe, M.S. (2019) In search of pathogenic amyloid β -peptide in familial Alzheimer's disease, *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, **168**, 71–78.
8. 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**(7), 1917–1933.
9. Cao, W., Zheng, H. (2018) Peripheral immune system in aging and Alzheimer's disease, *Molecular Neurodegeneration*, **13**, 51.
10. Bush, A.I. (2013) The metal theory of Alzheimer's disease, *The Journal of Alzheimer's Disease*, **33**, S277–S281.
11. Козин, С.А., Макаров, А.А. (2018) Конвергенция концепций патогенеза болезни Альцгеймера, *Молекулярная биология*, **53**, 1020–1028.
12. 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.
13. Радько, С.П., Хмелева, С.А., Супрун, Е.В., Козин, С.А., Бодоев, Н.В., Макаров, А.А., Арчаков, А.И., Шумянцева, В.В. (2015) Физико-химические методы исследования агрегации β -амилоида, *Биомедицинская химия*, **61**, 203–218.
14. Matuszyk, M.M., Garwood, C.J., Ferraiuolo, L., Simpson, J.E., Staniforth, R.A., Wharton, S.B. (2022) Biological and methodological complexities of beta-amyloid peptide: Implications for Alzheimer's disease research, *Journal of Neurochemistry*, **160**, 434–453.
15. Zakharova, N.V., Kononikhin, A.S., Indeykina, M.I., Bugrova, A.E., Strelnikova, P., Pekov, S., Kozin, S.A., Popov, I.A., Mitkevich, V., Makarov, A.A., Nikolaev, E.N. (2022) Mass spectrometric studies of the variety of beta-amyloid proteoforms in Alzheimer's disease, *Mass Spectrometry Reviews*, **28**, e21775.
16. Suprun, E.V., Shumyantseva, V.V., Archakov, A.I. (2014) Protein Electrochemistry: Application in Medicine. A Review, *Electrochimica Acta*, **140**, 72–82.
17. Brabec, V., Mornstein, V. (1980) Electrochemical behaviour of proteins at graphite electrodes. I. Electrooxidation of proteins as a new probe of protein structure and reactions, *Biochimica et Biophysica Acta*, **625**, 43–50.
18. Brabec, V., Mornstein, V. (1980) Electrochemical behaviour of proteins at graphite electrodes. II. Electrooxidation of amino acids, *Biophysical Chemistry*, **12**, 159–165.
19. Suprun, E.V., Zharkova, M.S., Morozevich, G.E., Veselovsky, A.V., Shumyantseva, V.V., Archakov, A.I. (2013) Analysis of Redox Activity

- of Proteins on the Carbon Screen Printed Electrodes, *Electroanalysis*, **25**, 2109–2116.
20. Ostatna, V., Cernocka, H., Kurzatowska, K., Palecek, E. (2012) Native and denatured forms of proteins can be discriminated at edge plane carbon electrodes, *Analytica Chimica Acta*, **735**, 31–36.
 21. Somji, M., Dounin, V., Muench, S.B., Schulze, H., Bachmann, T.T., Kerman, K. (2012) Electroanalysis of amino acid substitutions in bioengineered acetylcholinesterase, *Bioelectrochemistry*, **88**, 110–113.
 22. Veloso, A., Kerman, K. (2013) Advances in electrochemical detection for study of neurodegenerative disorders, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **405**, 5725–5741.
 23. Liu, X., Liu, Y., Ji, S. (2021) Secretases Related to Amyloid Precursor Protein Processing, *Membranes (Basel)*, **11**, 983.
 24. Zhang, Y.W., Thompson, R., Zhang, H., Xu, H. (2011) APP processing in Alzheimer's disease, *Molecular Brain*, **4**, 3.
 25. Portelius, E., Price, E., Brinkmalm, G., Stiteler, M., Olsson, M., Persson, R., Westman-Brinkmalm, A., Zetterberg, H., Simon, A.J., Blennow, K. (2011) A novel pathway for amyloid precursor protein processing, *Neurobiology of Aging*, **32**, 1090–1098.
 26. Roher, A.E., Kokjohn, T.A., Clarke, S.G., Sierks, M.R., Maarouf, C.L., Serrano, G.E., Sabbagh, M.S., Beach, T.G. (2017) APP/A β structural diversity and Alzheimer's disease pathogenesis, *Neurochemistry International*, **110**, 1–13.
 27. 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.
 28. Maddalena, A.S. Papassotiropoulos, A., Gonzalez-Agosti, C., Signorell, A., Hegi, T., Pasch, T., Nitsch, R.M., Hock, C. (2004) Cerebrospinal fluid profile of amyloid beta peptides in patients with Alzheimer's disease determined by protein biochip technology, *Neurodegenerative Diseases*, **1**, 231–235.
 29. Tiwari, S., Atluri, V., Kaushik, A., Yndart, A., Nair, M. (2019) Alzheimer's disease: pathogenesis, diagnostics, and therapeutics, *The International Journal of Nanomedicine*, **14**, 5541–5554.
 30. Sinnige, T. (2022) Molecular mechanisms of amyloid formation in living systems, *Chemical Science*, **13**, 7080–7097.
 31. Oren, O., Taube, R., Papo, N. (2021) Amyloid β structural polymorphism, associated toxicity and therapeutic strategies, *Cellular and Molecular Life Sciences*, **78**, 7185–7198.
 32. Fandrich, M. (2007) On the structural definition of amyloid fibrils and other polypeptide aggregates, *Cellular and Molecular Life Sciences*, **64**, 2066–2078.
 33. Faller, P., Hureau, C., Berthoumieu, O. (2013) Role of metal ions in the self-assembly of the Alzheimer's amyloid- β peptide, *Inorganic Chemistry*, **52**, 12193–12206.
 34. 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.
 35. 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.
 36. Urban, A.S., Pavlov, K.V., Kamynina, A.V., Okhrimenko, I.S., Arseniev, A.S., Bocharov, E.V. (2021) Structural Studies Providing Insights into Production and Conformational Behavior of Amyloid- β Peptide Associated with Alzheimer's Disease Development, *Molecules*, **26**, 2897.
 37. Hatami, A., Monjazebe, S., Milton, S., Glabe, C.G. (2017) Familial Alzheimer's

- mer's Disease Mutations within the Amyloid Precursor Protein Alter the Aggregation and Conformation of the Amyloid- β Peptide, *The Journal of Biological Chemistry*, **292**, 3172–3185.
38. Atrián-Blasco, E., Gonzalez, P., Santoro, A., Alies, B., Faller, P., Hureau, C. (2018) Cu and Zn coordination to amyloid peptides: From fascinating chemistry to debated pathological relevance, *Coordination Chemistry Reviews*, **375**, 38–55.
39. Комптон Р. Г. Постигая вольтамперометрию : пер. 2-го изд. / Ричард Г. Комптон, Крэйг Е. Бэнкс ; пер. с англ. Э. А. Захаровой, А. С. Кабакаева ; под ред. С. В. Романенко ; Нац. исслед. Том. политехн. ун-т. - 2-е изд., перераб. - Томск : Издательство Томского политехнического университета, 2016, 501 с.
40. Chiorcea-Paquim, A. M., Enache, T. A., Oliveira-Brett, A. M. (2018) Electrochemistry of Alzheimer disease amyloid beta peptides, *Current Medicinal Chemistry*, **25**, 4066–4083.
41. Šek, S., Vacek, J., Dorčák, V. (2019) Electrochemistry of peptides, *Current Opinion in Electrochemistry*, **14**, 166–172.
42. Chiorcea-Paquim, A.M., Oliveira-Brett, A.M. (2022) Amyloid beta peptides electrochemistry: A review, *Current Opinion in Electrochemistry*, **31**, 100837.
43. Kowalczyk, A., Matysiak-Brynda, E., Nowicka, A.N. (2019) Proteins and peptides voltammetry: Trends, potential, and limitations, *Current Opinion in Electrochemistry*, **14**, 44–52.
44. Vestergaard, M.A., Kerman, K., Saito, M., Nagatani, N., Takamura, Y., Tamiya E. (2005) Rapid Label-Free Electrochemical Detection and Kinetic Study of Alzheimer's Amyloid Beta Aggregation, *The Journal of the American Chemical Society*, **127**, 11892–11893.
45. Chikae, M., Fukuda, T., Kerman, K., Idegami, K., Miura, Y., Tamiya, E. (2008) Amyloid- β detection with saccharide immobilized gold nanoparticle on carbon electrode, *Bioelectrochemistry*, **74**, 118–123.
46. Lokszejn, A., Dzwolak, W., Krysiński, P. (2008) Tyrosine side chains as an electrochemical probe of stacked β -sheet protein conformations, *Bioelectrochemistry*, **72**, 34–40.
47. Ferapontova, E.E. (2022) Bioelectrochemical analysis of neurodegeneration: Refocusing efforts, *Current Opinion in Electrochemistry*, **32**, 100924.
48. Lopes, P., Xu, M., Zhang, M., Zhou, T., Yang, Y., Wang, C., Ferapontova, E.E. (2014) Direct electrochemical and AFM detection of amyloid- β peptide aggregation on basal plane HOPG, *Nanoscale*, **6**, 7853–7857.
49. Suprun, E.V., Khmeleva, S.A., Radko, S.P., Kozin, S.A., Archakov, A.I., Shumyantseva V.V. (2016) Direct electrochemical oxidation of amyloid- β peptides via tyrosine, histidine, and methionine residues, *Electrochemistry Communications*, **65**, 53–56.
50. Enache, T.A., Chiorcea-Paquim, A.M., Oliveira-Brett, A.M. (2016) Amyloid- β peptides time-dependent structural modifications: AFM and voltammetric characterization, *Analytica Chimica Acta*, **926**, 36–47.
51. Suprun, E.V., Radko, S.P., Khmeleva, S.A., Mitkevich, V.A., Archakov, A.I., Makarov, A.A., Shumyantseva, V.V. (2017) Electrochemical oxidation of amyloid-beta peptide isoforms on carbon screen printed electrodes, *Electrochemistry Communications*, **75**, 33–37.
52. Enache, T.A., Oliveira-Brett, A.M. (2017) Alzheimer's disease amyloid beta peptides *in vitro* electrochemical oxidation, *Bioelectrochemistry*, **114**, 13–23.
53. Enache, T.A., Chiorcea-Paquim, A.M., Oliveira-Brett, A.M. (2018). Amyloid beta peptide VHHQ, KLVFF, and IIGLMVGGVV domains involved in fibrilization: AFM and electrochemical characterization, *Analytical Chemistry*, **90**, 2285–2292.

54. Scuderi, D., Bergès, J., de Oliveira, P., Houée-Levin, C. (2016) Methionine one-electron oxidation: Coherent contributions from radiolysis, IRMPD spectroscopy, DFT calculations and electrochemistry, *Radiation Physics and Chemistry*, **128**, 103–111.
55. Tsvetkov, F.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.
56. Syme, C.D., Nadal, R.C., Rigby, S.E., Viles, J.H. (2004) Copper binding to the amyloid-beta (A β) peptide associated with Alzheimer's disease: folding, coordination geometry, pH dependence, stoichiometry, and affinity of A β -(1–28): insights from a range of complementary spectroscopic techniques, *The Journal of Biological Chemistry*, **279**, 18169–18177.
57. Hassan, Q., Kerman, K. (2019) Electrochemical approaches for the detection of amyloid- β , tau, and α -synuclein, *Current Opinion in Electrochemistry*, **14**, 89–95.
58. Suprun, E.V., Radko, S.P., Farafonova, T.E., Kozin, S.A., Makarov, A.A., Archakov, A.I., Shumyantseva, V.V. (2017) Electrochemical detection of protein post-translational modifications: Phosphorylation and nitration of amyloid-beta (1–16), *Electrochimica Acta*, **258**, 1182–1190.
59. Suprun, E.V., Khmeleva, S.A., Radko, S.P., Archakov, A.I., Shumyantseva, V.V. (2016) Electrochemical Analysis of Amyloid- β Domain 1–16 Isoforms and Their Complexes with Zn(II) Ions, *Electrochimica Acta*, **187**, 677–683.
60. Chiku, M., Horisawa, K., Doi, N., Yanagawa, H., Einaga, Y. (2010) Electrochemical detection of tyrosine derivatives and protein tyrosine kinase activity using boron-doped diamond electrodes, *Biosensors & Bioelectronics*, **26**, 235–240.
61. Kerman, K., Chikae, S., Yamamura, E., Tamiya, M. (2007) Label-free electrochemical detection of the phosphorylated and non-phosphorylated forms of peptides based on tyrosine oxidation, *Electrochemistry Communications*, **9**, 976–980.
62. Cheignon, C., Hureau, C., Collin, F. (2018) Real-time evolution of A β 40 metal-catalyzed oxidation reveals Asp1 as the main target and a dependence on metal binding site, *Inorganica Chimica Acta*, **472**, 111–118.
63. Davies, M.J., Fu, S., Wang, H., Dean, R.T. (1999) Stable markers of oxidant damage to proteins and their application in the study of human disease, *Free Radical Biology and Medicine*, **11–12**, 1151–1163.
64. Clarke, S.G. (2013) Protein methylation at the surface and buried deep: thinking outside the histone box, *Trends in Biochemical Sciences*, **38**, 243–252.
65. Afjehi-Sadat, L., Garcia, B.A. (2013) Comprehending dynamic protein methylation with mass spectrometry, *Current Opinion in Chemical Biology*, **17**, 12–19.
66. Ishikawa, Y., Melville, D.B. (1970) The enzymatic α -N-methylation of histidine, *The Journal of Biological Chemistry*, **245**, 5967–5973.
67. Suprun, E.V. (2019) Protein post-translational modifications – a challenge for bioelectrochemistry, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **116**, 44–60.
68. Suprun, E.V., Karpova, E.V., Radko, S.P., Karyakin, A.A. (2020) Advanced electrochemical detection of amino acids and proteins through flow injection analysis and catalytic oxidation on Prussian Blue, *Electrochimica Acta*, **331**, 135289.
69. Кузнецов, В.В. (1999) Проточно-инжекционный анализ, *Соросовский образовательный журнал*, **11**, 56–60.
70. Suprun, E.V., Daboss, E.V., Pleshakov, V.M., Vokhmyanina, D.V., Radko, S.P., Karyakin, A.A., Kozin, S.A., Makarov, A.A., Mitkevich, V.A. (2022) Application of Prussian Blue modified carbon electrodes for

- amperometric detection of amyloid- β peptides by flow injection analysis, *Electrochimica Acta*, **406**, 139829.
71. Andreescu, S., Vasilescu, A. (2021) Advances in electrochemical detection for probing protein aggregation, *Current Opinion in Electrochemistry*, **30**, 100820.
72. Li, B., Zhang, G., Tahirbegi, I.B., Morten, M.J., Tan, H. (2021) Monitoring amyloid- β 42 conformational change using a spray-printed graphene electrode, *Electrochemistry Communications*, **123**, 106927.
73. Veloso, A.J., Hung, V.W.S., Cheng, X.R., Kerman, K. (2012) Analysis of Amyloid Beta Aggregation Kinetics Using Sym-Triazine β -Sheet Inhibitors, *Electroanalysis*, **24**, 1847–1851.
74. Veloso, A.J., Kerman, K. (2012) Modulation of fibril formation by a β -sheet breaker peptide ligand: An electrochemical approach, *Bioelectrochemistry*, **84**, 49–52.
75. Suprun, E.V., Radko, S.P., Farafonova, T.E., Mitkevich, V.A., Makarov, A.A., Archakov, A.I., Shumyantseva, V.V. (2017) Application of an Electrochemical Method to Evaluation of Amyloid- β Aggregation Inhibitors: Testing the RGKLVFFGR-NH₂ Peptide Antiaggregant, *Electroanalysis*, **29**, 2906–2912.
76. Suprun, E.V., Khmeleva, S.A., Kiseleva, Y.Y., Radko, S.P., Archakov, A.I., Shumyantseva, V.V. (2016) Quantitative Aspects of Electrochemical Detection of Amyloid- β Aggregation, *Electroanalysis*, **28**, 1977–1983.
77. Suprun, E.V., Radko, S.P., Kozin, S.A., Mitkevich, V.A., Makarov, A.A. (2020) Application of electrochemical method to a comparative study of spontaneous aggregation of amyloid- β isoforms, *The Journal of Electroanalytical Chemistry*, **861**, 113938.
78. Barrio M., Borghesani V., Hureau C., Faller P. (2017) Metal-Binding to Amyloid- β Peptide: Coordination, Aggregation, and Reactive Oxygen Species Production. *Biometals in Neurodegenerative Diseases* / Eds. A.R. White, M. Aschner, L.G. Costa, A.I. Bush. N.Y.: Academic Press, 265–281.
78. Faller, P., Hureau, C., Dorlet, P., Hellwig, P., Coppel, Y., Collin, F., Alies, B. (2012) Methods and techniques to study the bioinorganic chemistry of metal-peptide complexes linked to neurodegenerative diseases, *Coordination Chemistry Reviews*, **256**, 2381–2396.
80. 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- β metal-binding domain, *Molecular BioSystems*, **10**, 2590–2596.
81. Miura, T., Suzuki, K., Kohata, N., Takeuchi, H. (2000) Metal Binding Modes of Alzheimer's Amyloid β -Peptide in Insoluble Aggregates and Soluble Complexes, *Biochemistry*, **39**, 7024–7031.
82. Tsvetkov, F.O., Makarov, A.A., Archakov, A.I., Kozin, S.A. (2009) Effect of Isomerization of Aspartate-7 on the Binding of Copper (II) Ion by the β -Amyloid Peptide, *Molecular BioSystems*, **54**, 131–134.
83. Li, S., Kerman, K. (2021). Electrochemical biosensors for biometal-protein interactions in neurodegenerative diseases. *Biosensors & Bioelectronics*, **179**, 113035.
84. Arrigan, D.W.M., Hackett, M.J., Mancera, R.L. (2018) Electrochemistry of proteins at the interface between two immiscible electrolyte solutions, *Current Opinion in Electrochemistry*, **12**, 27–32.
85. Zhou, F., Millhauser, G.L. (2012) The rich electrochemistry and redox reactions of the copper sites in the cellular prion protein, *Coordination Chemistry Reviews*, **256**, 2285–2296.
86. Takehara, K., Ide, Y. (1991) Electrochemistry of copper(II)-peptide

- complexes containing histidine residues, *Inorganica Chimica Acta*, **183**, 195–202.
87. Hung, V.W.S., Masoom, H., Kerman, K. (2012) Label-free electrochemical detection of Amyloid beta aggregation in the presence of iron, copper and zinc, *The Journal of Electroanalytical Chemistry*, **681**, 89–95.
88. Geng, J., Yu, H., Ren, J., Qu, X. (2008) Rapid label-free detection of metal-induced Alzheimer's amyloid β peptide aggregation by electrochemical method, *Electrochemistry Communications*, **10**, 1797–1800.
89. Suprun, E.V., Zaryanov, N.V., Radko, S.P., Kulikova, A.A., Kozin, S.A., Makarov, A.A., Archakov, A.I., Shumyantseva, V.V. (2015) Tyrosine Based Electrochemical Analysis of Amyloid- β Fragment (1–16) Binding to Metal(II) Ions, *Electrochimica Acta*, **179**, 93–99.
90. Suprun, E.V., Radko, S.P., Andreev, E.A., Khmeleva, S.A., Kozin, S.A., Makarov, A.A., Archakov, A.I., Shumyantseva, V.V. (2017) Electrochemical detection of Zn(II)- and Cu(II)-induced amyloid- β aggregation: Quantitative aspects and application to amyloid- β isoforms, *The Journal of Electroanalytical Chemistry*, **791**, 152–158.
91. Zirah, S., Kozin, S.A., Mazur, A.K., Blond, A., Cheminant, M., Ségalas-Milazzo, I., Debey, P., Rebuffat, S. (2006) Structural changes of region 1–16 of the Alzheimer disease amyloid beta-peptide upon zinc binding and *in vitro* aging, *The Journal of Biological Chemistry*, **281**, 2151–2161.
92. Danielsson, J., Pierattelli, R., Banci, L., Graslund, A. (2007) High-resolution NMR studies of the zinc-binding site of the Alzheimer's amyloid beta-peptide, *The FEBS Journal*, **274**, 46–59.
93. Breslow, E., Gurd, F.R.N. (1963) Interaction of cupric and zinc ions with sperm whale metmyoglobin, *The Journal of Biological Chemistry*, **238**, 1332–1342.
94. Masuokal, J., Saltman, P. (1994) Zinc(II) and copper(II) binding to serum albumin. A comparative study of dog, bovine, and human albumin, *The Journal of Biological Chemistry*, **269**, 25557–25561.
95. Syme, C.D., Viles, J.H. (2006) Solution ¹H NMR investigation of Zn²⁺ and Cd²⁺ binding to amyloid-beta peptide (A β) of Alzheimer's disease, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1764**, 246–256.
96. Suprun, E.V., Radko, S.P., Kozin, S.A., Mitkevich, V.A., Makarov, A.A. (2018) Electrochemical detection of Zn(II)-induced amyloid- β aggregation: Insights into aggregation mechanisms, *The Journal of Electroanalytical Chemistry*, **830–831**, 34–42.
97. Giacomazzi, R., Ciofini, I., Rao, L., Amatore, C., Adamo, C. (2014) Copper-amyloid-beta complex may catalyze peroxynitrite production in brain: evidence from molecular modeling, *Physical Chemistry Chemical Physics*, **16**, 10169–10174.
98. Crnich, E., Lullo, R., Tabaka, A., Havens, M.A., Kissel, D.S. (2021) Interactions of copper and copper chelate compounds with the amyloid beta peptide: An investigation into electrochemistry, reactive oxygen species and peptide aggregation, *The Journal of Inorganic Biochemistry*, **222**, 111493.
99. Chan, T., Chow, A.M., Tang, D.W.F., Li, Q., Wang, X., Brown, I.R., Kerman, K. (2010) Interaction of baicalin and copper with α -synuclein: Electrochemical approach to Parkinson's Disease, *The Journal of Electroanalytical Chemistry*, **648**, 151–155.
100. Masarik, M., Stobiecka, A., Kizek, R., Jelen, F., Pechan, Z., Hoyer, W., Jovin, T.M., Subramaniam, V., Paleček, E. (2004) Sensitive Electrochemical Detection of Native and Aggregated α -Synuclein Protein Involved in Parkinson's Disease, *Electroanalysis*, **16**, 1172–1181.