

УДК 577.112.7

©Коллектив авторов

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ АГРЕГАЦИИ β -АМИЛОИДА

**С.П. Радько^{1,2*}, С.А. Хмелёва¹, Е.В. Супрун¹, С.А. Козин², Н.В. Бодоев¹,
А.А. Макаров², А.И. Арчаков¹, В.В. Шумянцева¹**

¹Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича,
119121, Москва, ул. Погодинская, 10, тел./факс: (499)245-08-57;
эл. почта: radko@ibmc.msk.ru

²Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта
Российской академии наук, Москва

Болезнь Альцгеймера является наиболее распространённым нейродегенеративным заболеванием. Согласно гипотезе “амилоидного каскада”, ключевым событием патогенеза болезни Альцгеймера является переход β -амилоидного пептида ($A\beta$) из мономерного состояния в агрегированное. Механизм агрегации $A\beta$ интенсивно изучается *in vitro* с использованием синтетических пептидов с помощью физико-химических методов, позволяющих оценивать размер, молекулярную структуру и морфологию образующихся агрегатов. В обзоре рассмотрены как хорошо известные, так и недавно появившиеся физико-химические методы исследования агрегации $A\beta$, включая методы микроскопии, оптические и флуоресцентные методы, метод электронного парамагнитного резонанса, электрохимический и электрофоретический методы, гель-фильтрацию и масс-спектрометрические методы. Обсуждаются достоинства и недостатки методов. Отмечена уникальная возможность одновременно наблюдать как мономеры $A\beta$, так и его олигомеры и крупные агрегаты с помощью методов атомно-силовой микроскопии и флуоресцентной корреляционной спектроскопии, а также высокая чувствительность последнего, позволяющая следить за процессом агрегации в низкоконтентированных растворах $A\beta$. Среди масс-спектрометрических методов выделен метод спектроскопии ионной подвижности/масс-спектрометрии, который, наряду с определением спектра олигомеров $A\beta$, позволяет получать информацию об их структуре. Одновременное использование нескольких методов, позволяющих получить взаимодополняющие данные об агрегатах $A\beta$, является наиболее оптимальным экспериментальным подходом к исследованию процесса агрегации β -амилоидных пептидов *in vitro*.

Ключевые слова: болезнь Альцгеймера, β -амилоид, агрегация, аналитические методы.

DOI: 10.18097/PBMC20156102203

ВВЕДЕНИЕ

Болезнь Альцгеймера (БА) является прогрессирующим нейродегенеративным заболеванием, частота встречаемости которого начинает резко возрастать после достижения возраста 65 лет. Количество пациентов с диагнозом болезни Альцгеймера в мире в настоящее время насчитывает более 44 млн. человек (www.alz.co.uk/research/statistics). В России её распространённость оценивается в 0,75% от всего населения [1], что составляет около 1 млн человек. БА относят к группе заболеваний, известных как “протеинопатии”, в основе патогенеза которых лежат изменения структуры и/или нарушение метаболизма определенных белков или пептидов, приводящие к формированию их патогенных агрегатов с последующим образованием характерных

гистопатологических белковых или пептидных отложений [2]. В рамках ведущей гипотезы развития БА, известной как “амилоидный каскад”, ключевым процессом патогенеза БА является переход β -амилоидного пептида ($A\beta$) из мономерного состояния в агрегированное, что запускает цепь патогенных молекулярных событий [3]. *In vivo* процесс агрегации $A\beta$ заканчивается формированием сенильных бляшек, состоящих из фибрилл $A\beta$. В организме человека $A\beta$ представлен несколькими isoформами, различающимися длиной полипептидной цепи – от 37 до 43 аминокислотных остатков (а.о.) [4]. Из них две isoформы – $A\beta_{40}$ и $A\beta_{42}$, длиной 40 и 42 а.о. и отличающиеся наличием или отсутствием двух C-концевых а.о., являются количественно доминирующими формами $A\beta$ человека. Существует значительное число исследований

* - адресат для переписки

(например, суммированные в [5]), свидетельствующих в пользу того, что изоформа А β 42 и её агрегация играют центральную роль в патогенезе БА.

Хотя агрегация А β рассматривается в рамках гипотезы “амилоидного каскада” как ключевой патогенный процесс, определяющий возникновение и развитие БА [3], детали его протекания *in vivo* остаются неясными. В норме А β играет определённую роль в синаптической пластичности нейронов, лежащей в основе памяти и обучения, и, по-видимому, является нормальным функциональным белком человека [6]. Предполагается, что агрегация А β связана с его неспособностью принять “правильную”, нативную конформацию [7]. Мономеры А β с “неправильной” конформацией формируют небольшие (низкомолекулярные) олигомеры – от димеров до гептамеров. Вероятно, гексамеры А β способны выступать как “парануклеусы” – центры инициации дальнейшей агрегации пептида, и формировать высокомолекулярные олигомеры с молекулярной массой от ~40 кДа до 1 МДа [8]. Форма таких агрегатов может быть различной – как сферической, так и кольцеобразной. Высокомолекулярные олигомеры могут агрегировать с образованием протофибрилл – протяжённых агрегатов диаметром 5 нм и длиной до 200 нм, которые в свою очередь агрегируют с образованием фибрилл [8, 9]. На рисунке 1 схематично представлены стадии агрегации β -амилоидного пептида при переходе от мономерного к фибриллярному состоянию. Олигомеры и протофибриллы А β нейротоксичны и рассматриваются как патогенные агенты, ответственные за дегенерацию синапсов и потерю нейронов при БА [3]. Следует отметить, что подавляющее большинство экспериментальных работ, посвященных агрегации А β , было выполнено в условиях *in vitro*.

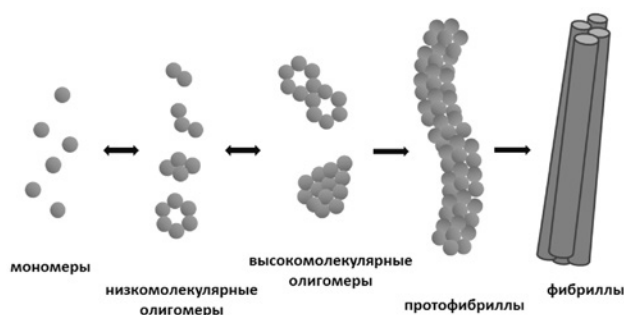


Рисунок 1. Схематическое изображение процесса агрегации β -амилоида.

Как правило, *in vitro* агрегацию А β исследуют, используя синтетические пептиды длиной 40 и 42 а.о. (далее А β (1-40) и А β (1-42)), последовательности которых идентичны природным изоформам А β . Наряду с А β (1-40) и А β (1-42), в исследованиях *in vitro* также широко используется более короткий синтетический пептид, А β (1-16), последовательность которого идентична N-концевому фрагменту 1-16 А β , известному как металл-связывающий домен [10-13]. Однако А β (1-16) используют в основном для изучения деталей взаимодействия А β

с ионами металлов, стараясь при этом минимизировать металл-индуцированную агрегацию пептида [11-13].

Модельные системы, где спонтанная агрегация А β (1-40) и А β (1-42) протекает во времени в условиях водно-солевого раствора с заданными ионной силой, значением pH и температурой, широко используются как для углубления знаний о молекулярных механизмах патогенной агрегации А β , так и для оценки способности различных природных и синтетических соединений ингибировать эту агрегацию, с конечной целью создания мишень-направленных лекарственных средств лечения БА. В обзоре рассмотрены физико-химические методы, как используемые давно, так и появившиеся в последние годы, которые позволяют определять размеры, молекулярную структуру и морфологию агрегатов А β , формирующихся в таких модельных системах на различных стадиях агрегации, отмечены достоинства и недостатки этих методов.

1. МИКРОСКОПИЯ

1.1. Трансмиссионная электронная микроскопия

Трансмиссионная (просвечивающая) электронная микроскопия (ТЭМ) широко используется для изучения формы белковых молекул. Как правило, белок-содержащий раствор наносят на углеродную подложку и после адсорбции молекул на поверхности подложки их контрастируют нанесением электронноплотного вещества, в качестве которого обычно используют соединения тяжелых металлов. Регистрация рассеянных электронов при облучении материала на подложке электронным пучком позволяет реконструировать, с использованием специальных математических методов, изображение молекулярных объектов. Принципиальная оптическая схема ТЭМ показана на рисунке 2.

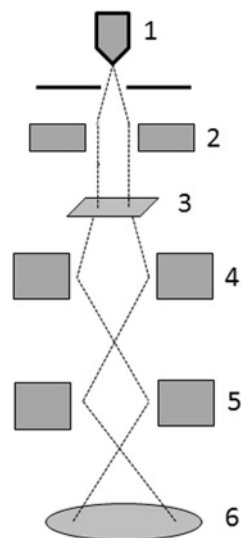


Рисунок 2. Принципиальная схема трансмиссионного электронного микроскопа. 1 - катод (источник электронов); 2 - конденсор; 3 - подложка с исследуемым объектом; 4 - магнитные линзы объектива; 5 - магнитные линзы проектора; 6 - дифракционная картина объекта.

Исследование агрегации Аβ(1-40) и Аβ(1-42) методом ТЭМ показало, что пептиды, наряду с фибриллами, формируют более короткие (длиной менее 200 нм) изогнутые протяженные структуры диаметром 6-8 нм, которые получили название “протофибриллы” [14]. Позднее с помощью ТЭМ в растворах Аβ(1-40) были обнаружены сферические структуры с диаметрами в пределах 9-25 нм, которые с течением времени трансформировались в протофибриллы и позднее в зрелые амилоидные фибриллы с диаметром около 10 нм [15]. Похожие сферические агрегаты диаметром 5-20 нм были обнаружены и в случае Аβ(1-42) [8, 16]. Кроме того, наблюдали кольцообразные структуры приблизительно такого же размера [17]. Было предположено, что сферические агрегаты представляют высокомолекулярные олигомеры Аβ [8, 15, 18]. В настоящее время ТЭМ используется для изучения морфологии высокомолекулярных олигомеров, протофибрилл и фибрилл Аβ, формирующихся при агрегации пептида [19, 20], влияния на неё мутаций, ассоциированных с ранним развитием БА [21], ионов двухвалентных металлов [22], а также различных природных и синтетических соединений, способных ингибировать процесс фибриллогенеза Аβ [23-26]. Недавно с помощью ТЭМ было показано, что широко распространенная обработка растворов Аβ ультразвуком может при определённых условиях привести к ускорению процесса спонтанного формирования фибрилл [27].

В контексте исследований агрегации Аβ, к недостаткам ТЭМ следует отнести то, что данный метод не позволяет надёжно определять низкомолекулярные олигомеры, для его реализации требуется дорогостоящее оборудование и высококвалифицированный обслуживающий персонал. Необходимость применения специальных методов подготовки образцов (таких, как отщипывание молекул образца напылением тяжёлыми металлами) может привести к нежелательным изменениям образца и артефактным результатам [18, 28].

1.2. Атомно-силовая микроскопия

Атомно-силовая микроскопия (АСМ) основана на том, что специальный механический зонд (кантилевер), перемещаясь относительно поверхности подложки (сканирование), отклоняется при взаимодействии с находящимися на ней объектами (например, белковыми молекулами), позволяя как детектировать объекты (молекулы), так и проводить анализ их формы. Как правило, раствор белка наносят на поверхность подложки и, после адсорбции на ней белковых молекул, жидкость удаляют перед АСМ-сканированием. Однако, возможно сканирование поверхности подложки и в присутствии жидкости (*in situ* АСМ) [29], что даёт возможность визуализации белковых молекул в условиях, более близких к физиологическим. Схематическая иллюстрация АСМ-сканирования представлена на рисунке 3.

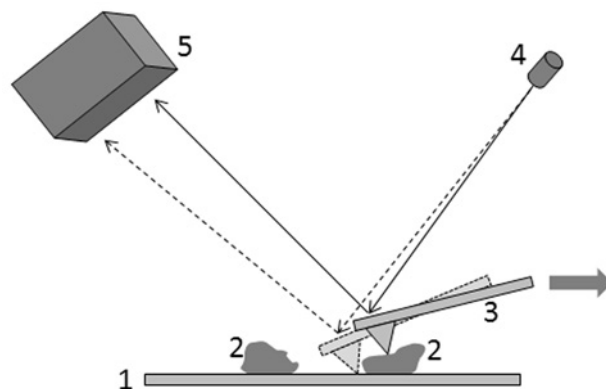


Рисунок 3. Схема работы атомно-силового микроскопа. 1 - подложка; 2 - молекулы образца; 3 - кантилевер; 4 - лазер; 5 - фотодетектор. Стрелкой показано направление движения кантилевера.

АСМ использовали для исследования зависимости ассоциации протофибрилл Аβ(1-40) и Аβ(1-42) и роста длины (элонгации) протофибрилл от концентрации пептида, температуры и ионной силы раствора [30, 31]. При помощи этого метода было продемонстрировано формирование различных типов агрегатов Аβ, таких как фибриллы, протофибриллы, кольцообразные и сферические структуры, при использовании различных протоколов агрегации Аβ в растворе [32]. С помощью АСМ *in situ* была визуализирована динамика фибриллогенеза Аβ(1-42) на гидрофильных и гидрофобных поверхностях: от появления глобулярных агрегатов (олигомеров) пептида до формирования протофибрилл и зрелых фибрилл [33]. Цейтраферная (time-lapse) АСМ, при которой сканирование поверхности происходит через равные промежутки времени, позволила получить изображения медленно протекающего процесса элонгации единичной фибриллы [34]. Высокая разрешающая способность АСМ позволяет различить мономеры и димеры Аβ, а также исследовать последовательность событий, происходящих при переходе мономеров в растворимые олигомеры и протофибриллы [35]. В настоящее время метод АСМ широко используется для исследования влияния ионов двухвалентных металлов [36, 37], различных природных соединений [38, 39] и мутаций, ассоциированных с ранним возникновением БА [40], на агрегацию Аβ.

Как и в случае ТЭМ, к недостаткам АСМ можно отнести дороговизну оборудования (включая необходимость работы в специальных условиях “чистой комнаты”) и наличие высококвалифицированного обслуживающего персонала. Также следует отметить, что *in situ* АСМ требует прикрепления пептидов Аβ и их агрегатов к поверхности подложки, то есть все взаимодействия протекают на поверхности, что может сказываться на характере агрегации Аβ.

1.3. Флуоресцентная микроскопия

Возможность прямого наблюдения за агрегатами Аβ в растворе была продемонстрирована с помощью

флуоресцентной микроскопии, используя флуоресцентно-меченные пептиды [41]. Регистрируя под флуоресцентным микроскопом броуновское движение агрегатов А β (1-42), в составе которых были пептиды, несущие на N-конце флуорофор (HiLyte FluorTM 488), авторы [41] определили гидродинамические радиусы агрегатов и изменение среднего характеристического размера агрегатов во времени. Как и в случае с ТЭМ и АСМ, метод требует использования дорогостоящего оборудования (флуоресцентный микроскоп), а также флуоресцентно-меченных пептидов.

Наряду с флуоресцентными красителями, в качестве флуорофоров было предложено использовать также “квантовые точки”. Квантовая точка (quantum dot, QD) представляет наночастицу, которая является фрагментом кристалла полупроводника (в биологических исследованиях в качестве материала используют, как правило, селенид кадмия) [42]. В силу пространственного ограничения движения электрона в наночастице и близости размера наночастицы к длине волны электрона в заданном материале, электронный спектр QD представлен набором дискретных уровней, разделённых областями запрещённых состояний, и формально соответствует электронному спектру одиночного атома. В сравнении с молекулярными флуорофорами, QD обладают гораздо большим (10-100 раз) квантовым выходом, а также большей фото- и химической стабильностью [42].

В первой работе, где исследовали агрегацию конъюгатов А β (1-40) с QD методом флуоресцентной микроскопии [43], наблюдали появлению более ярких объектов со временем инкубации раствора пептида, что интерпретировалось как образование олигомеров А β . Этот вывод был подтвержден с помощью АСМ. Однако крупные агрегаты, включая фибриллы А β , при этом не формировались [43]. То, что QD могут ингибировать фибрилlogenез, было позднее показано также в работе [44]. Для решения этой проблемы предложено использовать препараты А β с добавлением относительно небольшого количества пептида, конъюгированного с QD. Так, использование конъюгата А β (1-40)-QD, добавленного к раствору А β (1-42) в молярном соотношении 1:10000 или 1:100000, позволило наблюдать агрегацию пептида от начальной фазы нуклеации до образования зрелых фибрилл [43]. Недавно этот подход был адаптирован к формату 1536-луночного микропланшета [45], что может, в перспективе, позволить проведение высокопроизводительного тестирования синтетических и биологических соединений с целью отбора потенциальных ингибиторов агрегации А β . Следует однако отметить, что наличие наночастицы может приводить к селективному включению конъюгата в олигомеры и/или агрегаты, тем самым давая искажённую картину процесса агрегации А β . По крайней мере, известно, что как размер, так и поверхностный заряд QD влияют на процесс фибрилlogenеза А β [46].

2. ОПТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

2.1. Метод кругового дихроизма

Метод кругового дихроизма (КД) основан на измерении разности поглощения лево- и правополяризованного света раствором молекул [47]. Оптическая активность молекул является мерой их хиральности (или, другими словами, мерой их асимметрии) и выражается через величину, известную как “молекулярная эллиптичность”. В случае белков и пептидов, КД в дальней ультрафиолетовой области (от 190 до 240 нм) определяется в основном поглощением амидов карбонильных групп полипептидного остова [47]. При наличии участков вторичной структуры, таких как α -спирали и β -слои, спектр КД имеет характерные особенности, связанные с различиями в электронном окружении амидных групп в этих структурах (рис. 4). При анализе спектра КД, его обычно представляют как сумму компонентов, отвечающих поглощению различных структурных состояний белка или пептида: α -спираль, β -структура или случайный клубок. Суммирование спектров каждой из этих структур производят, подбирая соответствующие коэффициенты таким образом, чтобы было достигнуто наилучшее соответствие измеренному спектру. Подобранные весовые коэффициенты представляют собой ту долю, которая приходится на каждый из типов вторичной структуры [48].

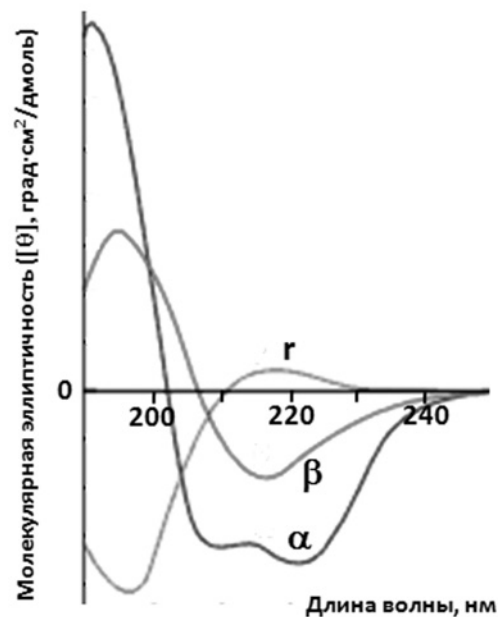


Рисунок 4. Характерные спектры КД для α -спирали (α), β -структуры (β) и случайного клубка (r). Адаптировано из <http://phys.protres.ru/lectures/proteinphysics>.

Впервые метод КД был применён для исследования кинетики фибрилlogenеза *in vitro* в работе [49]. Было показано, что в составе фибрилл А β принимает β -конформацию. Когда А β находится в растворе в мономерном состоянии, его определённые участки могут принимать конформации α -спирали

и β -структуры, однако динамическое равновесие сдвинуто в сторону основной конформации пептида, которая представляет случайный клубок [50]. Переход от состояния случайного клубка к β -конформации приводит к возрастанию абсолютной величины сигнала на длине волны 215 нм в спектре КД [51]. Зависимость абсолютной величины сигнала от времени инкубации раствора А β имеет сигмоидальный характер и состоит из лаг-фазы, фазы экспоненциального роста и плато [49, 51], что соответствует фазам нуклеации (формированию низкомолекулярных олигомеров), агрегации (образование высокомолекулярных олигомеров и протофибрилл) и фазе, где сформировавшиеся фибриллы могут находиться в равновесии или продолжать рост за счёт латеральной агрегации. Определение кинетики агрегации методом КД использовали для оценки способности природных и химических соединений ингибировать агрегацию А β (например, [52, 53]).

Метод КД широко применяется для сравнительного исследования структуры формирующихся агрегатов. Так, используя КД, показано, что протофибриллы, формируемые ковалентными димерами А β (1-40) (за счёт образования дисульфидной связи при замене Ser26 на Cys), характеризуются высоким содержанием пептида в β -конформации, в то время как сам димер не показывал наличия β -структуры [54]. Наличие β -слоев определяли с помощью КД в нейротоксичных олигомерах А β (1-42) с молекулярной массой ~80 кДа (~18-мер), хотя относительное количество пептидов в β -конформации было заметно ниже, чем в фибриллах А β [55]. КД показал наличие β -слоев в сферических агрегатах А β (1-40) размером 8-18 нм и молекулярной массой ~1 МДа; при этом структура димеров и тетрамеров пептида представляла случайный клубок [56]. С другой стороны, использование КД в исследовании димеров, тримеров и тетрамеров А β (1-40), "сшитых" бифункциональными химическими агентами, позволило установить, что относительное содержание пептида в β -конформации составляет 25%-38%-41%-45% в ряду мономер-димер-тример-тетрамер [57]. Исследование методом КД процесса агрегации пептидов А β (1-40) и А β (1-42) позволило также установить, что на определённом этапе агрегации происходит временное увеличение доли α -конформации: относительное содержание α -спиральной конформации возрастало с 3% до ~20% после 4-х дней инкубации пептида А β (1-42) в воде, совпадая по времени с появлением олигомеров пептида [58]. Позднее это позволило выдвинуть гипотезу, что для формирования олигомеров определённый участок на С-конце пептида должен находиться в α -спиральной конформации [50].

2.2. Инфракрасная спектроскопия с преобразованием Фурье

Инфракрасная спектроскопия с преобразованием Фурье (Фурье-ИКС) позволяет получать колебательные спектры различных молекул, в том числе

полипептидов. Как правило, колебательные спектры полипептидов имеют сложную структуру и содержат большое число полос поглощения различной интенсивности. Инфракрасные (ИК) спектры полипептидов в различных конформациях, таких как случайный клубок, α -спираль или β -слои, имеют характерные полосы [59].

Использование метода Фурье-ИКС для исследования агрегации А β основано на том, что положение так называемой амидной полосы поглощения I (соответствует колебаниям группы C=O полипептидного остова) смещается на спектре с 1650-1658 см⁻¹ на 1640-1648 см⁻¹ при переходе от α -спиральной конформации к случайному клубку и на 1620-1640 см⁻¹ – к β -структуре [60]. Возрастание отношения интенсивности полос поглощения на 1626 см⁻¹ и 1645 см⁻¹ (A_{1626}/A_{1645}) было предложено рассматривать как индикатор перехода А β в β -структурную конформацию, характерную для агрегированного пептида [61]. Отношение интенсивности поглощения на других частотах, а именно отношение A_{1695}/A_{1630} , может быть также использовано для исследования кинетики агрегации А β [62].

Хотя метод Фурье-ИКС широко применяется для анализа структуры олигомеров и фибрилл А β [35, 55, 63], он редко используется в исследованиях кинетики агрегации А β в водно-солевых растворах. Одним из существенных недостатков метода Фурье-ИКС в исследованиях агрегации А β является то, что образец, как правило, анализируют в виде плёнки, для чего препараты А β высушивают после нанесения раствора пептида на отражающую поверхность спектрометра. Это может привести к нежелательным изменениям состояния А β в агрегатах и артефактным результатам.

2.3. Светорассеяние

Наиболее простым с технической точки зрения подходом к исследованию агрегации А β является измерение значения оптической плотности растворов А β на длинах волн 400-450 нм. Оптическая плотность в этом диапазоне волн определяется рассеянием света крупными частицами (мутность). Однако метод обладает низкой чувствительностью, и, как считается, позволяет детектировать образование только крупных агрегатов А β [64]. Зависимость мутности раствора пептида от времени инкубации описывается характерной сигмоидальной кривой [65, 66] – с лаг-фазой, фазой роста, за которой следует плато (схематично представлено на рис. 5). В случаях, когда не формируется существенного количества β -структур при агрегации пептида (так, при исследовании металл-индуцированной агрегации А β формируются аморфные агрегаты, не имеющие β -структуры [67]), измерение мутности растворов А β является простой и удобной альтернативой оптическим методам, основанным на определении относительного количества пептида в β -конформации [49, 51, 61, 62].

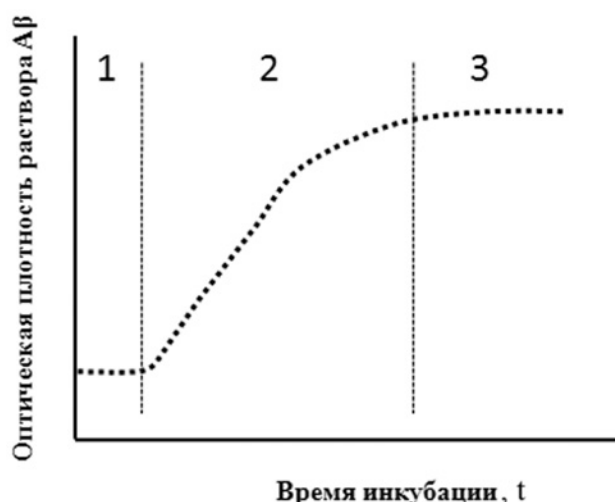


Рисунок 5. Схематическое изображение типичной зависимости оптической плотности раствора $A\beta$ от времени инкубации. 1 - лаг-период (время формирования центров инициации агрегации); 2 - фаза образования и роста агрегатов; 3 - окончание агрегации. Время инкубации может составлять от нескольких часов до нескольких недель в зависимости от условий инкубации. Оптическая плотность раствора измеряется на длинах волн от 400 нм до 450 нм.

Другой метод, известный как многоугловое (лазерное) светорассеяние, основан на измерении интенсивности света, рассеянного под определёнными углами, что позволяет оценить молекулярную массу полимерной молекулы. Применительно к агрегации $A\beta$, метод позволяет определить среднюю молекулярную массу агрегатов пептида и рассчитать “агрегационное число” (отношение молекулярной массы агрегата к молекулярной массе мономера) [68, 69]. Для получения более детальной информации о молекулярной массе агрегатов, многоугловое светорассеяние использовали в комбинации с методами, позволяющими фракционировать гетерогенные по размеру популяции агрегатов $A\beta$, такими как гель-фильтрация [31, 70] и проточное фракционирование в поперечном поле [71].

Ещё одним широко используемым в исследованиях агрегации $A\beta$ методом светорассеяния является метод динамического рассеяния света (ДРС). ДРС позволяет определять коэффициент диффузии дисперсных частиц в жидкости путём анализа корреляционной функции флуктуаций интенсивности рассеянного света. Далее из коэффициента диффузии рассчитывается гидродинамический радиус частиц по формуле Стокса-Эйнштейна, которая связывает размер частицы с коэффициентом диффузии. При этом предполагается, что частицы имеют сферическую форму. Для полидисперсной популяции частиц метод даёт распределение частиц по размеру. Это происходит с помощью компьютерной программы, которая использует заданный математический алгоритм, позволяющий из всех возможных распределений выбрать то, которое наилучшим образом описывает экспериментально определяемую корреляционную функцию [72].

Динамическое рассеяние света широко используется для исследования процесса агрегации $A\beta$. ДРС применяли для мониторинга процесса агрегации во времени [73-75]. Было показано, что кинетика агрегации зависит от концентрации пептида [73, 74]. Исследование методом ДРС процесса формирования агрегатов $A\beta(1-40)$ в слабо-кислых условиях (pH 6) показало, что рост гидродинамического радиуса сферических агрегатов с ~80 до ~200 нм в первые 12 мин инкубации раствора пептида сменяется уменьшением радиуса до ~40 нм к 40-й мин инкубации [76]. Метод также использовали для определения размеров олигомеров $A\beta(1-40)$ и $A\beta(1-42)$, образующихся в одинаковых условиях. Пептиды формировали различающиеся популяции олигомеров: популяция олигомеров $A\beta(1-40)$ состояла из димеров, тримеров и тетрамеров и имела средний характеристический радиус 1-2 нм, в то время как олигомеры $A\beta(1-42)$ были представлены гепта- и гексамерами и имели средний характеристический радиус 6-7 нм [8]. Метод ДРС применяли для тестирования потенциальных ингибиторов агрегации $A\beta$ [77], а также для исследования металл-индуцированной агрегации $A\beta$ [78] и влияния на неё органосиланов [79] и производных пиридина [80]. Ещё одно из приложений метода ДРС – экспериментальный анализ связи размера агрегатов пептида с их нейротоксичностью [81, 82] и с эффективностью их интернализации клетками [83].

Недостатком метода ДРС является его низкая разрешающая способность: для того, чтобы надёжно различить две полидисперсные популяции частицы, необходимо 8-кратное различие их среднего размера [28]. Также, мономеры и олигомеры трудно детектировать в присутствии крупных агрегатов, поскольку вклад последних в светорассеяние будет доминировать. Фракционирование агрегированного $A\beta$ перед ДРС-анализом, например гель-фильтрацией [14] – один из возможных путей решения этой проблемы. Однако гель-фильтрация приводит к существенному понижению концентрации пептида и его агрегатов. Скорее всего, именно низкая концентрация материала в образцах не позволила детектировать методом ДРС стабилизированные ковалентной “сшивкой” низкомолекулярные олигомеры $A\beta$ после их фракционирования гель-фильтрацией [8].

2.4. Спектрофотометрия с использованием красителя Congo Red

Спектрофотометрический метод определения количества агрегированного $A\beta$ основан на использовании красителя Congo Red (CR), связывание которого с фибриллами $A\beta$ приводит к изменению его спектра поглощения [84, 85]. В качестве меры агрегации $A\beta$ принимают количество CR, связанного с фибриллами $A\beta$, которое рассчитывается с помощью эмпирических уравнений, используя значения оптического поглощения раствора красителя в присутствии $A\beta$ на длинах волн 540, 480, 541 и 403 нм [15, 85].

Несмотря на довольно широкое применение в исследованиях агрегации Аβ, спектрофотометрический метод с использованием CR имеет существенный недостаток, состоящий в том, что сам краситель влияет на агрегацию. В нескольких работах было показано, что CR ингибирует агрегацию Аβ [51, 86], вероятно, специфически блокируя формирование высокомолекулярных агрегатов пептида [86]. С другой стороны, в работе [87] показано, что формирование агрегатов Аβ(1-40) с β-структурой ускоряется в присутствии CR. Результаты работ [51, 86, 87] указывают на то, что надо с осторожностью относиться к интерпретации данных по агрегации Аβ, полученных с использованием CR.

3. ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ МЕТОДЫ

3.1. Тиофлавин Т

Флуоресцентный краситель тиофлавин Т (ThT) используется в исследованиях амилоидных фибрилл в течение почти пяти десятилетий [88]. При связывании красителя с фибриллами Аβ *in vitro* происходит сдвиг длины волны максимума спектра возбуждения с 385 нм на 450 нм, при этом максимум спектра испускания сдвигается с 455 нм на 482 нм, что приводит к увеличению интенсивности флуоресценции ThT на 480-485 нм в десятки раз [89]. Молекула ThT состоит из двух ароматических колец, связанных С-С связью [90]. Свободное вращение колец относительно друг друга приводит к тушению флуоресценции (рис. 6). При связывании с фибриллами Аβ происходит фиксация положения колец относительно друг друга и, как следствие, возрастание флуоресценции [90]. ThT стал основой технически простого, недорогого и наиболее широко используемого метода мониторинга процесса образования фибрилл Аβ *in vitro* [91].

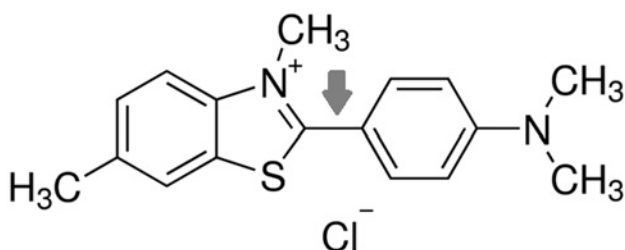


Рисунок 6. Структурная формула тиофлавина Т. Стрелкой указана С-С связь между ароматическими кольцами, способными свободно вращаться относительно друг друга.

Кинетика агрегации Аβ, определяемая с помощью ThT, описывается, как правило, сигмоидальной кривой с лаг-фазой (которая в случае Аβ(1-42) может сопровождаться медленным ростом уровня флуоресценции), фазой быстрого подъема и фазой выхода интенсивности флуоресценции на плато (например, [75, 92]). Такая характерная кривая представлена на рисунке 7. Следует отметить, что фаза подъема в случае флуоресцентного метода с использованием ThT сдвинута на временной оси

в область большего времени инкубации в сравнении с зависимостями, получаемыми методами Фурье-ИКС [93] или КД [75]. Это указывает на основной недостаток метода – он не позволяет надёжно детектировать формирование олигомеров Аβ. Хотя интенсивность флуоресценции и может возрасти в ~1,5 раза в присутствии олигомеров [94], связывание красителя именно с фибриллярным Аβ определяет значительный, в десятки раз, рост интенсивности флуоресценции ThT [95]. Метод также неприменим для мониторинга образования аморфных агрегатов, не содержащих β-структуры [91].

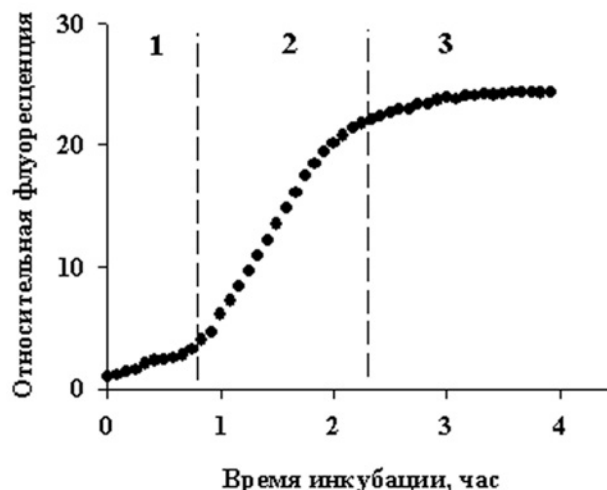


Рисунок 7. Характерная зависимость интенсивности флуоресценции тиофлавина Т от времени агрегации Аβ(1-42). Раствор пептида (10 мкМ) в 20 мМ Tris-HCl/50 мМ NaCl (pH 7,2) инкубировали в присутствии 10 мМ тиофлавина Т при 37°C при постоянном перемешивании. Интенсивность флуоресценции определяли каждые 5 мин на длинах волн возбуждения/испускания = 445/482 нм. Относительную флуоресценцию рассчитывали делением значений интенсивности флуоресценции на её значение в начальный момент агрегации. Измерения проводили на микропланшетном спектрофлуориметре Infinite M200 (“TECAN”, Швейцария). 1 - лаг-фаза; 2 - фаза активного формирования β-структуры; 3 - завершение агрегации пептида.

3.2. Флуоресцентная корреляционная спектроскопия

Метод флуоресцентной корреляционной спектроскопии (ФКС) основан на определении флуктуаций интенсивности флуоресценции, измеряемых с помощью конфокального микроскопа в так называемом “конфокальном объёме” (порядка 10^{-15} л) [96]. Концентрация флуоресцентных частиц (молекул) в этом объёме должна быть такой, что только несколько частиц присутствуют в нём одновременно. Флуктуации числа частиц зависят от скорости диффузии внутрь и из “конфокального объёма” и связаны с размером частиц. При возбуждении флуорофоров частиц лазерным излучением, флуктуации числа частиц регистрируются как флуктуации интенсивности флуоресценции

и получаемая автокорреляционная функция позволяет определить гидродинамический радиус частиц (молекул). Сильной стороной метода является возможность одновременно определять как размер частиц, так и их количество [96].

Метод ФКС обладает очень высокой чувствительностью, что позволяет детектировать движение единичных молекул [96]. Это даёт возможность изучать процесс агрегации $A\beta$ *in vitro* при достаточно низких концентрациях пептида – в условиях, более близких к физиологическим: так, концентрация $A\beta$ в спинномозговой жидкости лежит в области наномолярных концентраций [97]. Агрегацию изучают, добавляя небольшое количество (<1% от общего числа) флуоресцентно-меченных пептидов. В одном из первых исследований использовали меченный родамином на N-конце синтетический пептид $A\beta(1-40)$ в концентрации 10 нМ, в то время как общую концентрацию $A\beta(1-40)$ в растворе варьировали в диапазоне от 1 мкМ до 300 мкМ [98]. Зависимость агрегации $A\beta(1-40)$ от концентрации пептида имела кооперативный характер, показывая резкий рост количества агрегированного пептида через 40 мин инкубации при переходе от концентраций ниже 50 мкМ к концентрациям выше 60 мкМ [98]. Существование “пороговой” концентрации для агрегации $A\beta(1-40)$ было показано методом ФКС также в работе [99]. Однако, значение “пороговой” концентрации составляло ~15 мкМ, что можно объяснить различиями в условиях инкубации растворов пептида в [98] и [99]. При концентрациях пептида выше “пороговой”, кинетика агрегации носила типичный сигмоидальный характер [99].

Одна из сильных сторон метода ФКС – возможность наблюдать в растворе одновременно как мономеры $A\beta$, так и весь спектр формирующихся популяций агрегатов пептида (с характеристическими размерами от ~1 нм до ~1 мкм) [19, 100]. Используя ФКС, было исследовано влияние ионов двухвалентных металлов на формирование низкомолекулярных олигомеров и агрегатов $A\beta$ [99, 101], а также исследованы способности некоторых синтетических соединений блокировать агрегацию $A\beta$ [102, 103].

К недостаткам метода ФКС можно отнести высокую стоимость оборудования, а также использование флуоресцентно-меченных пептидов. Хотя “меченые” пептиды используются в незначительном количестве и не влияют на структуру и цитотоксичность образующихся агрегатов $A\beta$ [19], нельзя исключить возможности селективного включения таких пептидов в различные типы агрегатов $A\beta$ из-за присутствия флуорофора. Известно, что присутствие флуорофора (который, как правило, обладает высокой степенью гидрофобности) может модулировать агрегацию пептида. Так, $A\beta(1-42)$, несущий на N-конце флуоресцентную FAM-группу, формирует агрегаты со структурой, совершенно отличной от структуры агрегатов, которые он образует в отсутствие указанной группы [104].

3.3. Фёрстеровский резонансный перенос энергии

Фёрстеровский резонансный перенос энергии (ФРПЭ) (Förster resonance energy transfer, FRET) представляет процесс, при котором происходит перенос энергии от одного флуорофора (донора) к другому (акцептору) [105]. В результате такого переноса энергии можно наблюдать флуоресценцию акцептора, возбуждая молекулу донора. ФРПЭ происходит только на расстояниях, соизмеримых с размером биомолекул, что позволяет исследовать с помощью этого явления как внутри-, так и межмолекулярные взаимодействия биомолекул, включая их агрегацию [105].

В первой работе, посвящённой возможности мониторинга агрегации $A\beta$ методом ФРПЭ, исследовали агрегацию $A\beta(1-40)$ в растворе, содержащем эквимольные количества конъюгата пептида с химическим соединением, представляющим производное сульфаниловой кислоты (служило акцептором), и конъюгата пептида с остатком триптофана (служил донором) [56]. Было показано, что отношение площади пика флуоресценции акцептора к площади пика флуоресценции донора может служить количественной мерой агрегации $A\beta$ [56]. Недавно был предложен простой флуориметрический метод мониторинга агрегации $A\beta$ с использованием ФРПЭ и пары пептидов, меченных на N-концах флуоресцентными красителями HiLyte Fluor 555 (донор) и HiLyte Fluor 647 (акцептор) [106]. Высокая чувствительность ФРПЭ позволила установить, что при концентрациях $A\beta(1-40)$ в растворе в интервале 0,1-3 мкМ (ниже “пороговой” концентрации процесса фибриллогенеза $A\beta$) пептид формирует стабильные димеры [107]. К недостаткам данного метода, как и в случае с методом ФКС, можно отнести необходимость использовать пептиды, несущие флуорофоры. Использование двух производных красителя куркумина, способных связываться с обладающими β -структурой агрегатами $A\beta$, в качестве донора и акцептора вместо конъюгатов пептида с флуорофорами, было предложено как возможный подход, лишённый этого недостатка [108].

4. ЭЛЕКТРОХИМИЯ

Прямой электрохимический анализ структуры и процесса агрегации белков и пептидов основан на детекции сигнала окисления аминокислотных остатков полипептидной цепи на поверхности электродов, состоящих, как правило, из углеродных материалов [109]. Электрохимическое окисление аминокислотных остатков – это необратимый, pH-зависимый процесс. На сегодняшний день известно шесть аминокислот, обладающих электрохимической активностью (то есть способных электрохимически окисляться) – цистеин, цистин, метионин, гистидин, тирозин (Тур) и триптофан. Для измерения сигнала окисления белков и пептидов используют квадратно-волновую или дифференциальную импульсную вольтамперометрию,

что позволяет снизить влияние фонового тока и увеличить соотношение сигнал/шум. Сигнал окисления белка пропорционален количеству “внешних” электроактивных аминокислот (то есть чьи электроактивные функциональные группы экспонированы на поверхности белковой молекулы) на единицу площади поверхности молекулы [109].

Применение электрохимии для мониторинга агрегации Аβ основано на детекции электрохимического окисления единственного остатка Tyr, находящегося в положении 10 полипептидной цепи Аβ (Tyr-10). Окисление Tyr в Аβ приводит к появлению на вольтамперной кривой пика при потенциале максимума около 0,6-0,7 В (отн. Ag/AgCl). При включении пептидов в агрегат часть остатков Tyr-10 оказывается экранированной от контакта с поверхностью электрода другими аминокислотами – окисляться могут только остатки, находящиеся на поверхности агрегата – что приводит к снижению величины сигнала окисления по мере роста количества и размера агрегатов (иллюстрировано рисунком 8).

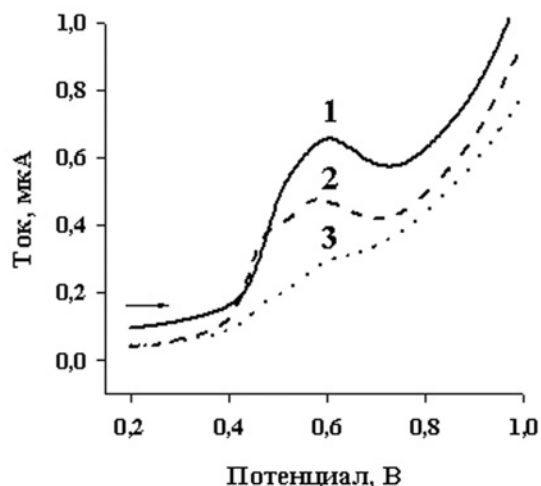


Рисунок 8. Типичные квадратно-волновые вольтамперограммы окисления Аβ(1-42) на печатном графитовом электроде, полученные при слежении за кинетикой агрегации пептида. 1 - сигнал мономерного Аβ(1-42), 2 - через 2 ч агрегации (средний диаметр агрегатов 52 нм), 3 - через 6 ч агрегации (средний диаметр агрегатов 189 нм). Концентрация пептида - 40 мкМ. Агрегация Аβ(1-42) проходила в 10 mM фосфатном буфере (рН 7,2) при 37°C и постоянном перемешивании раствора пептида (95 об./мин). Размер агрегатов определяли методом ДРС.

Впервые возможность электрохимической детекции агрегации Аβ(1-40) и Аβ(1-42) за счёт окисления Tyr-10 была показана в работе [110]. Было установлено, что окисление Аβ сопровождается переносом двух электронов и является диффузионно-контролируемым процессом. На вольтамперной кривой величина пика окисления Аβ уменьшалась со временем инкубации растворов как для Аβ(1-40), так и для Аβ(1-42), причём, в последнем случае значительно быстрее. Связь величины сигнала окисления Tyr-10 с агрегацией Аβ

была подтверждена данными флуоресцентного анализа с ThT и результатами АСМ [110]. Было проведено детальное сопоставление величины сигнала окисления Аβ(1-42) на поверхности пирографитового электрода с последовательным формированием пептидом олигомеров, протофибрилл и фибрилл, подтверждённым методом АСМ [111]. Электрохимический метод, основанный на окислении остатка Tyr-10, был использован для исследования влияния двухвалентных металлов (Zn(II), Cu(II), Fe(II)) на агрегацию Аβ(1-40) [112] и Аβ(1-42) [113], а также воздействия ряда соединений, которые препятствуют образованию β-структуры, на кинетику агрегации Аβ(1-42) [114, 115].

5. ЭЛЕКТРОННЫЙ ПАРАМАГНИТНЫЙ РЕЗОНАНС

Метод электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) основан на явлении резонансного поглощения электромагнитной энергии в сантиметровом или миллиметровом диапазоне длин волн веществами, содержащими парамагнитные центры. Парамагнитными центрами могут быть атомы или молекулы с нечётным числом электронов. Такие центры при необходимости могут быть созданы путём введения в вещество “спиновой метки” – органической молекулы, обладающей неспаренным электроном. Применительно к белковым молекулам, неспаренный электрон спиновой метки даёт возможность получения спектров ЭПР, которые несут информацию о локальной динамике молекулы, а также позволяют измерять расстояния (до 8 нм) в белковой молекуле или между молекулами.

Метод ЭПР был применён для мониторинга процесса агрегации Аβ [116]. В качестве спиновой метки использовали производное метансульфоната, которое присоединяли к остатку цистеина, введённому дополнительно в полипептидную последовательность Аβ(1-40) с N-конца (NH₂-Cys-Аβ(1-40)). Определение методом ЭПР характеристического времени вращательной диффузии спинмеченых пептидов, τ_R , после их совместной инкубации в растворе с избытком немеченного Аβ(1-40), позволило выявить три группы пептидов, характеризующиеся различными значениями τ_R . Применяя ультрафильтрацию, ТЕМ и спектрофотометрию с использованием красителя СКР, авторам [116] удалось соотнести измеряемые времена вращательной диффузии с мономерным и различными агрегатными (олигомерным и фибриллярным) состояниями Аβ(1-40). Аналогичные результаты с использованием метода ЭПР были получены в работе [117]. ЭПР также использовали для определения расстояния между спинмеченными пептидами Аβ(1-40) и их взаимной ориентации при исследовании глобуломеров Аβ(1-42) (агрегатов сферической формы диаметром 7-8 нм) [118]. Недостатком метода ЭПР является необходимость введения спиновой метки в пептиды, что может влиять на их агрегацию или включение в агрегаты Аβ.

6. ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

6.1. Электрофорез в полиакриламидном и агарозном гелях

Электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ-электрофорез) является одним из наиболее распространённых методов анализа белков и пептидов. Чаще всего электрофорез проводят в присутствии ионного детергента, додецилсульфата натрия (SDS, sodium dodecyl sulfate). SDS денатурирует белки, формируя с ними комплексы в весовом соотношении ~1,4 г детергента на 1 г белка. В результате, плотность отрицательного заряда комплекса становится приблизительно одинаковой для различных белков. Это приводит к тому, что скорость электрофоретической миграции комплекса SDS-полипептид в геле зависит только от длины полипептидной цепи, что позволяет разделять белковые молекулы по молекулярной массе.

Простота и доступность SDS-ПААГ-электрофореза определили то, что в течение длительного времени он был наиболее распространённым методом анализа олигомеризации А β [119] и продолжает широко использоваться до настоящего времени ([25, 120]). Образцы для электрофоретического анализа готовят добавлением SDS к растворам агрегатов А β [94]. Материал на геле визуализируют, используя его окраску красителем Кумасси или методом “серебрения” [94, 120], или используя иммуноблоттинг [25, 94]. Как правило, на геле наблюдают дополнительные полосы, соответствующие материалу с большим молекулярным размером по отношению к полосе, представляющей пептид в мономерной форме. Обычно такие полосы имеют “размытый” (диффузный) вид или характеризуются наличием “шлейфа” (или “шмера”, от англ. smear). Их появление интерпретируют как образование пептидных олигомеров в растворе А β [25, 94, 120]. Однако, тот факт, что SDS *per se* может вызывать агрегацию А β [121, 122], привёл к тому, что такая интерпретация сегодня ставится под сомнение [28, 123].

Наряду с ПААГ, SDS-электрофорез можно проводить в агарозном геле. Размер пор в агарозном геле гораздо больше, чем в ПААГ, что позволяет фракционировать крупные агрегаты А β , с молекулярным размером до ~5 МДа [124].

Для решения проблемы SDS-индуцированной агрегации А β , было предложено проводить ПААГ-электрофорез олигомеров после их стабилизации с помощью ковалентного фото-индуцированного “сшивания” [8]. Метод, известный как PICUP (photo-induced cross-linking of unmodified proteins, фотоиндуцированная сшивка немодифицированных белков), основан на использовании комплексного соединения три-(дипиридил)-Ru(II), в котором рутений Ru(II) способен окисляться до Ru(III) под воздействием видимого света в присутствии акцептора электрона. Ru(III) является сильным окислителем, способным захватывать электрон молекулы пептида, создавая высокореакционный пептидный радикал,

который мгновенно вступает во внутри- и межмолекулярные реакции. В результате пептиды, входящие в состав олигомера, оказываются ковалентно связанными [8, 119].

Прогревание агрегатов А β в присутствии SDS в течение нескольких минут при температуре, близкой к 100°C, приводит к полному распаду агрегатов на мономеры в случае А β (1-40), в то время как в случае А β (1-42) может сохраняться небольшое количество олигомеров, в основном три- и тетрамеров [8, 14]. После фотоиндуцированного “сшивания”, наблюдали появление на геле новых полос, соответствующих олигомерам А β – от димеров до пентамеров (преимущественно димеры и тримеры) для А β (1-40) и от димеров до додекамеров (преимущественно пента- и гексамеры) для А β (1-42) [8]. Характерный результат PICUP применительно к раствору А β (1-42) представлен на рисунке 9. Однако спектр формирующихся олигомеров, по результатам PICUP, практически не менялся при 6-часовой инкубации растворов А β , в то время как интенсивность флуоресценции ThT за этот же интервал времени увеличивалась приблизительно 50-кратно [125], что указывает на образование значительного количества фибриллярного А β в растворе пептида. По-видимому, метод PICUP позволяет стабилизировать лишь низкомолекулярные олигомеры, что ограничивает его применение при исследовании высокомолекулярных олигомеров и протофибрилл А β . Тем не менее, метод используется для изучения влияния точечных мутаций, пост-трансляционных модификаций и потенциальных ингибиторов олигомеризации А β на формирование низкомолекулярных олигомеров пептида [125-127].

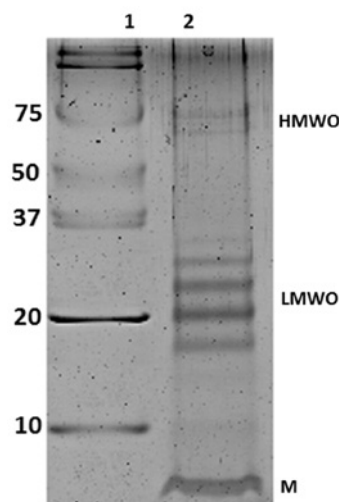


Рисунок 9. Характерный результат PICUP раствора А β (1-42). Концентрация пептида - 50 мкМ. 10 мМ фосфатный буфер, pH 7,2. Соотношение пептид/Ru(II) = 1:1. Условия облучения - 150 Вт, 3 с, 10 см до источника света. Трис-трицин градиентный (10-20%) ПААГ-электрофорез, окраска - Кумасси R-250. 1 - белковые маркеры (слева указана молекулярная масса в кДа); 2 - А β (1-42). Видны мономеры пептида (M) и ковалентно сшитые низкомолекулярные (LMWO) и высокомолекулярные (HMWO) олигомеры.

6.2. Капиллярный электрофорез

Метод, при котором электрофоретическая миграция молекул анализата происходит в тонких капиллярах (внутренний диаметр обычно не превышает 100 мкм) из кварцевого стекла, известен как капиллярный электрофорез (КЭ). Малый диаметр капилляров приводит к тому, что рассеяние джоулевой теплоты, выделяемой в объеме электрофоретического буфера при прохождении тока, происходит исключительно за счёт теплопереноса, то есть в отсутствие тепловой конвекции и вызванного ею перемешивания буфера. Это позволяет проводить электрофорез в растворе, то есть без использования геля.

Анализ агрегации Аβ(1-40) и Аβ(1-42) с помощью КЭ показал, что метод позволяет различать мономерные, олигомерные и фибриллярные формы Аβ, при этом агрегация Аβ(1-40) и Аβ(1-42) характеризовалась существенно разными электрофоретическими профилями [128, 129]. Агрегацию Аβ(1-40) исследовали также с помощью КЭ в полимерных растворах, для чего в электрофоретический буфер добавляли полимер – полиэтиленоксид [130]. Это усиливает влияние размера агрегатов Аβ на их электрофоретическую подвижность (по аналогии с гелем), но не накладывает ограничения на размер анализируемых частиц (как в случае геля, где полимерные цепи химически “сшиты”). Предобработка препаратов Аβ гексафторизопропанолом и/или хроматографическое фракционирование Аβ оказывают значительное влияние на скорость его последующей агрегации [130]. Недавно метод КЭ был применён для анализа агрегации Аβ(1-42) в присутствии потенциальных ингибиторов агрегации пептида [131]. Применительно к анализу олигомеризации Аβ, метод КЭ требует дальнейшей оптимизации условий электрофореза, так как в настоящее время его разрешающая способность не позволяет надёжно дифференцировать низкомолекулярные олигомеры [128].

7. ГЕЛЬ-ФИЛЬТРАЦИЯ

Гель-фильтрация является хроматографическим методом, позволяющим проводить фракционирование биологических макромолекул по размеру за счёт их разной способности проникать в поры неподвижной фазы, состоящей, как правило, из гранул химически “сшитого” агарозного геля. Высокомолекулярные вещества, не входящие в поры, проходят между гранулами и элюируются в так называемом “свободном объёме”. В одной из первых работ, посвящённых фракционированию Аβ методом гель-фильтрации [14], было показано, что при использовании свежеприготовленных растворов Аβ(1-40) и Аβ(1-42) пептиды элюируются как один широкий пик, максимум которого соответствует димерной форме Аβ. Вероятно, он представлен смесью мономеров Аβ, находящихся в динамическом равновесии с низкомолекулярными олигомерами, которые невозможно разделить

гель-фильтрацией в силу сопоставимости их “времени жизни” с продолжительностью процедуры элюции. Инкубация растворов Аβ в течение 48 ч приводила к появлению материала, который элюировался в свободном объёме хроматографической колонки и содержал протофибриллы Аβ [14]. Позднее было показано, что эта фракция может содержать также и высокомолекулярные олигомеры Аβ [9].

8. МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ

Масс-спектрометрия (MS) позволяет определять с высокой точностью отношение массы молекулярного иона к его заряду (m/z) при условии, что ион находится в газообразном состоянии [132]. Появление способов перевода биологических молекул в молекулярные ионы в газообразном состоянии при помощи матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации (matrix-assisted laser desorption/ionization, MALDI) и ионизации электрораспылением (electrospray ionization, ESI) сделало возможным масс-спектрометрическое определение молекулярной массы биомолекул.

Несмотря на то, что MS широко применяется для количественной детекции и идентификации пептидов и является сегодня основным методом протеомики [132], её использование для исследования агрегации Аβ ограничено быстрым снижением чувствительности детекции по мере увеличения молекулярной массы анализируемых биомолекул. Однако изменение количества мономеров и олигомеров в растворе по мере их включения в крупные агрегаты Аβ, определяемое масс-спектрометрическим методом, можно использовать как меру агрегации пептида. Так, снижение количества мономерной формы Аβ(1-42) в растворе было предложено использовать для исследования кинетики его агрегации [133]. При этом относительное количество мономеров Аβ(1-42) определяли методом MALDI-MS по интенсивности пика молекулярного иона Аβ(1-42)-H⁺, используя низкомолекулярный белок, инсулин как внутренний стандарт. В работе [134], используя метод MALDI-MS, удалось детектировать олигомеры Аβ(1-42) до декамера включительно в свежеприготовленном растворе пептида. При инкубации раствора в течении 8 ч наблюдали исчезновение нано- и декамеров, а к 12 ч оставались олигомеры размером менее пентамера, что было интерпретировано как переход высокомолекулярных олигомеров в крупные агрегаты Аβ, которые не детектируются MALDI-MS. Одновременное формирование в растворе фибриллярных агрегатов Аβ(1-42) было показано микроскопическими методами (ТЭМ и АСМ) и флуоресцентным методом с ThT [134]. Другой метод, известный как LILBID-MS (laser-induced liquid bead ion desorption mass-spectrometry), позволил детектировать формирование олигомеров Аβ(1-42) до 20-меров включительно [135]. Метод использует пьезоэлектрический генератор капель (объём капли ~0,1 нл), с помощью которого несколько микролитров

раствора (капля за каплей) подаются в вакуумную камеру, где они последовательно испаряются под действием излучения инфракрасного лазера, а образующиеся молекулярные ионы анализируются времяпролётным масс-спектрометром. Метод позволил исследовать кинетику формирования олигомеров $A\beta(1-42)$ и их включение в фибриллярные агрегаты $A\beta$, образование которых детектировали методами ФКС и ТЭМ [135]. Существенным недостатком как LILBID-MS, так и MALDI-MS является то, что отношение интенсивности пиков, представляющих олигомеры $A\beta$, не отражает их количественное соотношение в растворе пептида, что затрудняет интерпретацию экспериментальных данных.

Ионизация электрораспылением (ESI) является сегодня наиболее распространенным способом получения ионов пептидов в газообразном состоянии. Однако возникновение многозарядных состояний при применении ESI серьезно затрудняет интерпретацию масс-спектров олигомеров $A\beta$ [123]. Эта проблема была решена использованием метода спектрометрии ионной подвижности/масс-спектрометрии (ion mobility mass spectrometry, IM-MS), представляющего комбинацию спектрометрии ионной подвижности с масс-спектрометрией. В IM-MS происходит разделение молекулярных ионов в газовой фазе по размеру и/или конформации перед их анализом в масс-спектрометре. Разделение происходит, когда ионы медленно дрейфуют под действием слабого электрического поля в камере с противотоком инертного газа, сталкиваясь с его молекулами [123]. Определение времени дрейфа данного молекулярного иона позволяет измерить его характеристику, известную как “сечение столкновения” – σ [123, 136]. Сравнение теоретических значений σ , рассчитанных для различных олигомерных форм $A\beta$, с экспериментальными позволяет отнести пик на профиле ионной подвижности к определённому олигомеру $A\beta$ [136].

Как и в случае с MALDI-MS, метод IM-MS позволяет исследовать кинетику агрегации $A\beta$, определяя количество мономерной формы пептида [117]. Дополнительная информация может быть получена из анализа формы пика мономера пептида на профиле ионной подвижности – в случае $A\beta(1-40)$ удалось установить, что пептид может находиться в растворе в двух различных конформациях. Используя IM-MS, было установлено, что только димеры, тетрамеры, гексамеры и додекамеры присутствуют в свежеприготовленных растворах $A\beta(1-42)$ [136]. Анализ профиля ионной подвижности показал, что димеры и тетрамеры $A\beta(1-42)$ могут присутствовать в нескольких конформациях, тогда как гексамеры и додекамеры – только в единственной. Авторы [136] предполагают, что именно способность $A\beta(1-42)$ эффективно формировать гексамеры лежит в основе его большей склонности к агрегации в сравнении с $A\beta(1-40)$ и постулируют, что именно гексамер пептида является “парануклеусом” – структурной единицей, полимеризация которой определяет образование высокомолекулярных агрегатов и протофибрилл (рис. 1). В отличие

от $A\beta(1-42)$, олигомеры $A\beta(1-40)$ представлены всеми формами, но не выше тетрамера [136]. Однако, в другой работе наблюдали формирование непрерывного спектра олигомеров $A\beta(1-40)$ до гексадекамера включительно, причём ряд олигомерных форм может быть представлен не одной, а двумя конформациями, названными “компактной” (“compact”) и “вытянутой” (“extended”) [137]. Авторы [137] отмечают, что использование различных пространственных моделей олигомеров $A\beta$ для расчёта σ может привести к различной интерпретации экспериментальных данных, получаемых методом IM-MS. В работе [138] с помощью IM-MS исследовали влияние времени инкубации раствора $A\beta(1-40)$, ионов металлов ($Zn(II)$, $Cu(II)$) и ряда аминокислотных замен, меняющих кинетику агрегации $A\beta$, на спектр олигомеров $A\beta(1-40)$ и их конформационное состояние. На основании полученных данных авторы пришли к заключению, что олигомеры $A\beta$ с “компактной” конформацией участвуют в агрегационном процессе, который заканчивается формированием фибрилл $A\beta$ (on-pathway oligomers), тогда как с “вытянутой” – в формировании нейротоксичных агрегатов $A\beta$ (off-pathway oligomers) [138]. IM-MS использовался для изучения процесса олигомеризации $A\beta$ в растворах, содержащих одновременно обе изоформы пептида, $A\beta(1-40)$ и $A\beta(1-42)$ [139], а также для исследования олигомеризации пептидов с точечными аминокислотными заменами (D7N, A21G и E22G – мутации, известные как “Tottori”, “Flemish” и “Arctic”, соответственно) [140]. Метод также применяли для оценки влияния химической модификации (Gly25-Ser26 были связаны через эфирную связь) на формирование низкомолекулярных олигомеров $A\beta$ [141] и для оценки влияния ряда органических соединений, являющихся потенциальными ингибиторами агрегации $A\beta$, на олигомеризацию пептида [142].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сегодня существует широкий набор физико-химических методов, позволяющих оценивать размер, молекулярную структуру и морфологию агрегатов, формируемых синтетическими β -амилоидными пептидами *in vitro*. Их использование позволяет изучать как кинетику агрегации, так и структурные характеристики агрегатов, исследовать влияние на процесс агрегации ионов металлов, а также мутаций и пост-трансляционных модификаций $A\beta$. Для проведения фундаментальных исследований механизмов, лежащих в основе патологической агрегации $A\beta$, такие методы как АСМ и ФКС являются наиболее перспективными в силу высокой разрешающей способности первого (что позволяет дифференцировать мономеры и различные олигомеры пептида) и высокой чувствительности второго (что позволяет работать с низкоконтрированными растворами $A\beta$). Оба метода представляют уникальную возможность

одновременно наблюдать как мономеры Аβ, так и его олигомеры и крупные агрегаты. Среди масс-спектрометрических методов наибольший интерес представляет метод ИМ-МС, так как он, наряду с определением спектра олигомеров Аβ, позволяет получать информацию об их структуре. Применительно к оценке способности различных природных и синтетических соединений ингибировать патологическую агрегацию Аβ, с конечной целью создания мишень-направленных лекарственных средств лечения БА, наибольший интерес представляют такие методы как ДРС, электрохимия, капиллярный электрофорез и MALDI-MS, так как на их основе возможно создание автоматизированных аналитических платформ для высокопроизводительного анализа агрегации Аβ. Вне всякого сомнения, одновременное использование нескольких методов, позволяющих получить взаимодополняющие данные об агрегатах Аβ, является наиболее оптимальным экспериментальным подходом к исследованию процесса агрегации β-амилоидных пептидов *in vitro*.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (Соглашение №14.604.21.0074, уникальный идентификатор проекта RFMEFI60414X0074) и ООО "Куб" (Москва).

ЛИТЕРАТУРА

- Белоусов Ю.Б., Зырянов С.К., Белоусов Д.Ю., Бекетов А.С. (2009) Качественная клиническая практика, Спецвыпуск. Болезнь Альцгеймера, 3-28.
- Шелковникова Т.А., Куликова А.А., Цветков Ф.О., Peters O., Бачурин С.О., Бухман В.Л., Нинкина Н.Н. (2012) Молекулярная биология, **46**, 402-415.
- Haass C., Selkoe D.J. (2007) Nat. Rev. Mol. Cell. Biol., **8**, 101-112.
- Vigo-Pelfrey C., Lee D., Keim P., Lieberburg I., Schenk D.B. (1993) J. Neurochem., **61**, 1965-1968.
- Hardy J. (2006) Curr. Alzheimer Res., **3**, 71-73.
- Кудинова Н.В., Кудинов А.Р., Березов Т.Т. (2007) Биомед. химия, **53**, 119-127.
- Мальцев А.В., Гальзитская О.В. (2010) Биомед. химия, **56**, 624-638.
- Bitan G., Kirkitadze M.D., Lomakin A., Vollers S.S., Benedek G.B., Teplow D.B. (2003) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **100**, 330-335.
- Jan A., Hartley D.M., Lashuel H.A. (2010) Nat. Protoc., **5**, 1186-1209.
- Faller P., Hureau C., Berthoumieu O. (2013) Inorg. Chem., **52**, 12193-12206.
- Tsvetkov P.O., Kulikova A.A., Golovin A.V., Tkachev Y.V., Archakov A.I., Kozin S.A., Makarov A.A. (2010) Biophys. J., **99**, L84-86.
- Zirah S., Kozin S.A., Mazur A.K., Blond A., Cheminant M., Segalas-Milazzo I., Debey P., Rebuffat S. (2006) J. Biol. Chem., **281**, 2151-2161.
- Kozin S.A., Zirah S., Rebuffat S., Hoa G.H., Debey P. (2001) Biochem. Biophys. Res. Commun., **285**, 959-964.
- Walsh D.M., Lomakin A., Benedek G.B., Condron M.M., Teplow D.B. (1997) J. Biol. Chem., **272**, 22364-22372.
- Goldsbury C.S., Wirtz S., Muller S.A., Sunderji S., Wicki P., Aebi U., Frey P. (2000) J. Struct. Biol., **130**, 217-231.
- Nybo M., Svehaug S.E., Holm Nielsen E. (1999) Scand. J. Immunol., **49**, 219-223.
- Lashuel H.A., Hartley D.M., Petre B.M., Wall J.S., Simon M.N., Walz T., Lansbury P.T., Jr. (2003) J. Mol. Biol., **332**, 795-808.
- Antzutkin O.N. (2004) Magn. Reson. Chem., **42**, 231-246.
- Matsumura S., Shinoda K., Yamada M., Yokojima S., Inoue M., Ohnishi T., Shimada T., Kikuchi K., Masui D., Hashimoto S. et al. (2011) J. Biol. Chem., **286**, 11555-11562.
- Wu W.H., Liu Q., Sun X., Yu J.S., Zhao D.S., Yu Y.P., Luo J.J., Hu J., Yu Z.W., Zhao Y.F., Li Y.M. (2013) Biochem. Biophys. Res. Commun., **439**, 321-326.
- Poduslo J.F., Howell K.G. (2014) J. Neurosci. Res., **93**, 410-423.
- Jun S., Gillespie J.R., Shin B.K., Saxena S. (2009) Biochemistry, **48**, 10724-10732.
- Feng Y., Yang S.G., Du X.T., Zhang X., Sun X.X., Zhao M., Sun G.Y., Liu R.T. (2009) Biochem. Biophys. Res. Commun., **390**, 1250-1254.
- Flashner E., Raviv U., Friedler A. (2011) Biochem. Biophys. Res. Commun., **407**, 13-17.
- Ushikubo H., Tanimoto Y., Abe K., Asakawa T., Kan T., Akaishi T. (2014) Biol. Pharm. Bull., **37**, 748-754.
- Catto M., Arnesano F., Palazzo G., De Stradis A., Calo V., Losacco M., Purgatorio R., Campagna F. (2014) Arch. Biochem. Biophys., **560**, 73-82.
- Yagi H., Hasegawa K., Yoshimura Y., Goto Y. (2013) Biochim. Biophys. Acta., **1834**, 2480-2485.
- Bruggink K.A., Muller M., Kuiperij H.B., Verbeek M.M. (2012) J. Alzheimers Dis., **28**, 735-758.
- Creasey R.G., Gibson C.T., Voelcker N.H. (2012) Curr. Protein Pept. Sci., **13**, 232-257.
- Harper J.D., Wong S.S., Lieber C.M., Lansbury P.T., Jr. (1999) Biochemistry, **38**, 8972-8980.
- Nichols M.R., Moss M.A., Reed D.K., Lin W.L., Mukhopadhyay R., Hoh J.H., Rosenberry T.L. (2002) Biochemistry, **41**, 6115-6127.
- Chromy B.A., Nowak R.J., Lambert M.P., Viola K.L., Chang L., Velasco P.T., Jones B.W., Fernandez S.J., Lacor P.N., Horowitz P., Finch C.E., Krafft G.A., Klein W.L. (2003) Biochemistry, **42**, 12749-12760.
- Arimon M., Diez-Perez I., Kogan M.J., Durany N., Giralt E., Sanz F., Fernandez-Busquets X. (2005) FASEB J., **19**, 1344-1346.
- Goldsbury C., Aebi U., Frey P. (2001) Trends Mol. Med., **7**, 582.
- Mastrangelo I. A., Ahmed M., Sato T., Liu W., Wang C., Hough P., Smith S.O. (2006) J. Mol. Biol., **358**, 106-119.
- Bin Y., Li X., He Y., Chen S., Xiang J. (2013) Acta. Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai), **45**, 570-577.
- Lv Z., Condron M.M., Teplow D.B., Lyubchenko Y.L. (2013) J. Neuroimmune Pharmacol., **8**, 262-273.
- Wang P., Liao W., Fang J., Liu Q., Yao J., Hu M., Ding K. (2014) Carbohydr. Polym., **110**, 142-147.
- Banerjee R. (2014) Spectrochim. Acta A. Mol. Biomol. Spectrosc., **117**, 798-800.
- Norlin N., Hellberg M., Filippov A., Sousa A.A., Grobner G., Leapman R.D., Almqvist N., Antzutkin O.N. (2012) J. Struct. Biol., **180**, 174-189.
- Vestergaard M., Hamada T., Saito M., Yajima Y., Kudou M., Tamiya E., Takagi M. (2008) Biochem. Biophys. Res. Commun., **377**, 725-728.

42. Medintz I.L., Uyeda H.T., Goldman E.R., Mattoussi H. (2005) *Nat. Mater.*, **4**, 435-446.
43. Tokuraku K., Marquardt M., Ikezu T. (2009) *PLoS One*, **4**, e8492.
44. Thakur G., Micic M., Yang Y., Li W., Movia D., Giordani S., Zhang H., Leblanc R.M. (2011) *Int. J. Alzheimers Dis.*, **2011**, 502386.
45. Ishigaki Y., Tanaka H., Akama H., Ogara T., Uwai K., Tokuraku K. (2013) *PLoS One*, **8**, e72992.
46. Chan H.M., Xiao L., Yeung K.M., Ho S.L., Zhao D., Chan W.H., Li H.W. (2012) *Biomaterials*, **33**, 4443-4450.
47. Greenfield N.J. (2006) *Nat. Protoc.*, **1**, 2876-2890.
48. Barrow C.J., Yasuda A., Kenny P.T., Zagorski M.G. (1992) *J. Mol. Biol.*, **225**, 1075-1093.
49. Tomski S.J., Murphy R.M. (1992) *Arch. Biochem. Biophys.*, **294**, 630-638.
50. Baumketner A., Bernstein S. L., Wyttenbach T., Bitan G., Teplow D.B., Bowers M.T., Shea J.E. (2006) *Protein Sci.*, **15**, 420-428.
51. Bartolini M., Bertucci C., Bolognesi M.L., Cavalli A., Melchiorre C., Andrisano V. (2007) *ChemBiochem.*, **8**, 2152-2161.
52. Du X., Li H., Wang Z., Qiu S., Liu Q., Ni J. (2013) *Metallomics*, **5**, 861-870.
53. Chen Q., Yang L., Zheng C., Zheng W., Zhang J., Zhou Y., Liu J. (2014) *Nanoscale*, **6**, 6886-6897.
54. O'Nuallain B., Freir D.B., Nicoll A.J., Risse E., Ferguson N., Herron C.E., Collinge J., Walsh D.M. (2010) *J. Neurosci.*, **30**, 14411-14419.
55. Stroud J.C., Liu C., Teng P.K., Eisenberg D. (2012) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 7717-7722.
56. Huang T.H., Yang D.S., Plaskos N.P., Go S., Yip C.M., Fraser P.E., Chakrabarty A. (2000) *J. Mol. Biol.*, **297**, 73-87.
57. Ono K., Condrón M.M., Teplow D.B. (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 14745-14750.
58. Kirkitadze M.D., Condrón M.M., Teplow D.B. (2001) *J. Mol. Biol.*, **312**, 1103-1119.
59. Sarver R.W., Jr., Krueger W.C. (1991) *Anal. Biochem.*, **194**, 89-100.
60. Fraser P.E., Nguyen J.T., Surewicz W.K., Kirschner D.A. (1991) *Biophys. J.*, **60**, 1190-1201.
61. Benseny-Cases N., Cocera M., Cladera J. (2007) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **361**, 916-921.
62. Sarroukh R., Cerf E., Derclaye S., Dufrene Y.F., Goormaghtigh E., Ruyschaert J.M., Raussens V. (2011) *Cell. Mol. Life Sci.*, **68**, 1429-1438.
63. Bolognesi B., Cohen S. I., Aran Terol P., Esbjorner E.K., Giorgetti S., Mossuto M.F., Natalello A., Brorsson A.C., Knowles T.P., Dobson C.M., Luheshi L.M. (2014) *ACS Chem. Biol.*, **9**, 378-382.
64. Wood S. J., Maleeff B., Hart T., Wetzel R. (1996) *J. Mol. Biol.*, **256**, 870-877.
65. Evans K.C., Berger E.P., Cho C.G., Weisgraber K.H., Lansbury P.T., Jr. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 763-767.
66. Cook N.P., Marti A.A. (2012) *ACS Chem. Neurosci.*, **3**, 896-899.
67. Zhu L., Han Y., He C., Huang X., Wang Y. (2014) *J. Phys. Chem. B*, **118**, 9298-9305.
68. Thunecke M., Lobbia A., Kosciessa U., Dyrks T., Oakley A.E., Turner J., Saenger W., Georgalis Y. (1998) *J. Pept. Res.*, **52**, 509-517.
69. Picone P., Carrotta R., Montana G., Nobile M.R., San Biagio P.L., Di Carlo M. (2009) *Biophys. J.*, **96**, 4200-4211.
70. Hepler R.W., Grimm K.M., Nahas D.D., Breese R., Dodson E.C., Acton P., Keller P.M., Yeager M., Wang H., Shughrue P., Kinney G., Joyce J.G. (2006) *Biochemistry*, **45**, 15157-15167.
71. Rambaldi D.C., Zattoni A., Reschiglian P., Colombo R., De Lorenzi E. (2009) *Anal. Bioanal. Chem.*, **394**, 2145-2149.
72. Lomakin A., Teplow D.B., Benedek G.B. (2005) *Methods Mol. Biol.*, **299**, 153-174.
73. Lomakin A., Chung D.S., Benedek G.B., Kirschner D.A., Teplow D.B. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 1125-1129.
74. Murphy R.M., Pallitto M.M. (2000) *J. Struct. Biol.*, **130**, 109-122.
75. Campagna F., Catto M., Purgatorio R., Altomare C.D., Carotti A., De Stradis A., Palazzo G. (2011) *Eur. J. Med. Chem.*, **46**, 275-284.
76. Gorman P.M., Yip C.M., Fraser P.E., Chakrabarty A. (2003) *J. Mol. Biol.*, **325**, 743-757.
77. Churches Q.I., Caine J., Cavanagh K., Epa V.C., Waddington L., Tranberg C.E., Meyer A.G., Varghese J.N., Streltsov V., Duggan P. J. (2014) *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **24**, 3108-3112.
78. Bolognin S., Messori L., Drago D., Gabbiani C., Cendron L., Zatta P. (2011) *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, **43**, 877-885.
79. Friedman O.M., Matsudaira P., Reis A.H., Jr., Simister N., Correia I., Kew D., Wei J. Y., Pochapsky T. (2007) *J. Alzheimers Dis.*, **11**, 291-300.
80. Lakatos A., Zsigo E., Hollender D., Nagy N.V., Fulop L., Simon D., Bozso Z., Kiss T. (2010) *Dalton. Trans.*, **39**, 1302-1315.
81. Cizas P., Budvytyte R., Morkuniene R., Moldovan R., Broccio M., Losche M., Niaura G., Valincius G., Borutaite V. (2010) *Arch. Biochem. Biophys.*, **496**, 84-92.
82. Li H., Monien B.H., Lomakin A., Zemel R., Fradinger E.A., Tan M., Spring S.M., Urbanc B., Xie C.W., Benedek G.B., Bitan G. (2010) *Biochemistry*, **49**, 6358-6364.
83. Bateman D.A., Chakrabarty A. (2011) *Int. J. Alzheimers Dis.*, **2011**, 962352.
84. Wood S.J., Wetzel R., Martin J.D., Hurle M.R. (1995) *Biochemistry*, **34**, 724-730.
85. Klunk W.E., Jacob R.F., Mason R.P. (1999) *Anal. Biochem.*, **266**, 66-76.
86. Yang F., Lim G.P., Begum A.N., Ubeda O.J., Simmons M.R., Ambegaokar S.S., Chen P.P., Kayed R., Glabe C.G., Frautschy S.A., Cole G.M. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 5892-5901.
87. Lendel C., Bolognesi B., Wahlstrom A., Dobson C.M., Graslund A. (2010) *Biochemistry*, **49**, 1358-1360.
88. Rogers D.R. (1965) *Am. J. Clin. Pathol.*, **44**, 59-61.
89. LeVine H., 3rd (1993) *Protein Sci.*, **2**, 404-410.
90. Amdursky N., Erez Y., Huppert D. (2012) *Acc. Chem. Res.*, **45**, 1548-1557.
91. Reinke A.A., Gestwicki J.E. (2011) *Chem. Biol. Drug. Des.*, **77**, 399-411.
92. Abelein A., Kaspersen J.D., Nielsen S.B., Jensen G.V., Christiansen G., Pedersen J.S., Danielsson J., Otzen D.E., Graslund A. (2013) *J. Biol. Chem.*, **288**, 23518-23528.
93. Benseny-Cases N., Klementieva O., Cladera J. (2012) *Subcell. Biochem.*, **65**, 53-74.
94. Ryan D.A., Narrow W.C., Federoff H.J., Bowers W.J. (2010) *J. Neurosci. Methods*, **190**, 171-179.
95. Levine H., 3rd (1995) *Neurobiol. Aging*, **16**, 755-764.
96. Ries J., Schwille P. (2012) *Bioessays*, **34**, 361-368.
97. Mehta P.D., Pirttila T., Mehta S.P., Sersen E.A., Aisen P.S., Wisniewski H.M. (2000) *Arch. Neurol.*, **57**, 100-105.

98. Tjernberg L.O., Pramanik A., Bjorling S., Thyberg P., Thyberg J., Nordstedt C., Berndt K.D., Terenius L., Rigler R. (1999) *Chem. Biol.*, **6**, 53-62.
99. Sengupta P., Garai K., Sahoo B., Shi Y., Callaway D.J., Maiti S. (2003) *Biochemistry*, **42**, 10506-10513.
100. Mittag J.J., Milani S., Walsh D.M., Radler J.O., McManus J.J. (2014) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **448**, 195-199.
101. Garai K., Sahoo B., Kaushalya S. K., Desai R., Maiti S. (2007) *Biochemistry*, **46**, 10655-10663.
102. Wiesehan K., Stohr J., Nagel-Steger L., van Groen T., Riesner D., Willbold D. (2008) *Protein Eng. Des. Sel.*, **21**, 241-246.
103. Hochdorffer K., Marz-Berberich J., Nagel-Steger L., Epple M., Meyer-Zaika W., Horn A.H., Sticht H., Sinha S., Bitan G., Schrader T. (2011) *J. Am. Chem. Soc.*, **133**, 4348-4358.
104. Jungbauer L.M., Yu C., Laxton K.J., LaDu M.J. (2009) *J. Mol. Recognit.*, **22**, 403-413.
105. Munishkina L.A., Fink A.L. (2007) *Biochim. Biophys. Acta*, **1768**, 1862-1885.
106. Quinn S.D., Dalgarno P.A., Cameron R.T., Hedley G.J., Hacker C., Lucocq J.M., Baillie G.S., Samuel I.D., Penedo J.C. (2013) *Mol. Biosyst.*, **10**, 34-44.
107. Garzon-Rodriguez W., Sepulveda-Becerra M., Milton S., Glabe C.G. (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 21037-21044.
108. Ran C., Zhao W., Moir R.D., Moore A. (2011) *PLoS One*, **6**, e19362.
109. Suprun E.V., Shumyantseva V.V., Archakov A.I. (2014) *Electrochem. Acta*, **140**, 72-82.
110. Vestergaard M., Kerman K., Saito M., Nagatani N., Takamura Y., Tamiya E. (2005) *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 11892-11893.
111. Lopes P., Xu M., Zhang M., Zhou T., Yang Y., Wang C., Ferapontova E.E. (2014) *Nanoscale*, **6**, 7853-7857.
112. Geng J., Yu H., Ren J., Qu X. (2008) *Electrochem. Com.*, **10**, 1798-1800.
113. Hung V.W.-S., Masoom H., Kerman K. (2012) *J. Electrochem. Chem.*, **681**, 89-95.
114. Veloso A.J., Hung V.W.S., Cheng X.R., Kerman K. (2012) *Electroanalysis*, **24**, 1847-1851.
115. Veloso A.J., Kerman K. (2012) *Bioelectrochemistry*, **84**, 49-52.
116. Sepkhanova I., Drescher M., Meeuwenoord N.J., Limpens R.W., Koning R.I., Filippov D.V., Huber M. (2009) *Appl. Magn. Reson.*, **36**, 209-222.
117. Ionut Iurascu M., Cozma C., Tomczyk N., Rontree J., Desor M., Drescher M., Przybylski M. (2009) *Anal. Bioanal. Chem.*, **395**, 2509-2519.
118. Gu L., Liu C., Guo Z. (2013) *J. Biol. Chem.*, **288**, 18673-18683.
119. Bitan G., Fradinger E.A., Spring S.M., Teplow D.B. (2005) *Amyloid*, **12**, 88-95.
120. Wu H., Zhang F., Williamson N., Jian J., Zhang L., Liang Z., Wang J., An L., Tunnacliffe A., Zheng Y. (2014) *PLoS One*, **9**, e109438.
121. Rangachari V., Moore B.D., Reed D.K., Sonoda L.K., Bridges A.W., Conboy E., Hartigan D., Rosenberry T.L. (2007) *Biochemistry*, **46**, 12451-12462.
122. Sureshbabu N., Kirubakaran R., Jayakumar R. (2009) *Eur. Biophys. J.*, **38**, 355-367.
123. Bernstein S.L., Wyttenbach T., Baumketner A., Shea J.E., Bitan G., Teplow D.B., Bowers M. T. (2005) *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 2075-2084.
124. Bagriantsev S.N., Kushnirov V.V., Liebman S.W. (2006) *Methods Enzymol.*, **412**, 33-48.
125. Ono K., Condron M.M., Teplow D.B. (2010) *J. Biol. Chem.*, **285**, 23186-23197.
126. Sugiki T., Utsunomiya-Tate N. (2013) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **441**, 493-498.
127. Wang J., Varghese M., Ono K., Yamada M., Levine S., Tzavaras N., Gong B., Hurst W.J., Blitzer R.D., Pasinetti G.M. (2014) *J. Alzheimers Dis.*, **41**, 643-650.
128. Sabella S., Quaglia M., Lanni C., Racchi M., Govoni S., Caccialanza G., Calligaro A., Bellotti V., De Lorenzi E. (2004) *Electrophoresis*, **25**, 3186-3194.
129. Picou R.A., Kheterpal I., Wellman A.D., Minnamreddy M., Ku G., Gilman S.D. (2011) *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, **879**, 627-632.
130. Pryor N.E., Moss M.A., Hestekin C.N. (2014) *Electrophoresis*, **35**, 1814-1820.
131. Brogi S., Butini S., Maramai S., Colombo R., Verga L., Lanni C., De Lorenzi E., Lamponi S., Andreassi M., Bartolini M. et al. (2014) *CNS Neurosci. Ther.*, **20**, 624-632.
132. Thelen J.J., Miernyk J.A. (2012) *Biochem. J.*, **444**, 169-181.
133. Zovo K., Helk E., Karafin A., Tougu V., Palumaa P. (2010) *Anal. Chem.*, **82**, 8558-8565.
134. Bartolini M., Naldi M., Fiori J., Valle F., Biscarini F., Nicolau D.V., Andrisano V. (2011) *Anal. Biochem.*, **414**, 215-225.
135. Cernescu M., Stark T., Kalden E., Kurz C., Leuner K., Deller T., Gobel M., Eckert G. P., Brutschy B. (2012) *Anal. Chem.*, **84**, 5276-5284.
136. Bernstein S.L., Dupuis N.F., Lazo N.D., Wyttenbach T., Condron M.M., Bitan G., Teplow D.B., Shea J.E., Ruotolo B.T., Robinson C.V., Bowers M.T. (2009) *Nat. Chem.*, **1**, 326-331.
137. Kloniecki M., Jablonowska A., Poznanski J., Langridge J., Hughes C., Campuzano I., Giles K., Dadlez M. (2011) *J. Mol. Biol.*, **407**, 110-124.
138. Sitkiewicz E., Kloniecki M., Poznanski J., Bal W., Dadlez M. (2014) *J. Mol. Biol.*, **426**, 2871-2885.
139. Murray M.M., Krone M.G., Bernstein S.L., Baumketner A., Condron M.M., Lazo N.D., Teplow D.B., Wyttenbach T., Shea J.E., Bowers M.T. (2009) *J. Phys. Chem. B*, **113**, 6041-6046.
140. Gessel M.M., Bernstein S., Kemper M., Teplow D.B., Bowers M.T. (2012) *ACS Chem. Neurosci.*, **3**, 909-918.
141. Roychaudhuri R., Lomakin A., Bernstein S., Zheng X., Condron M.M., Benedek G.B., Bowers M., Teplow D.B. (2014) *J. Mol. Biol.*, **426**, 2422-2441.
142. Young L.M., Saunders J.C., Mahood R.A., Revill C.H., Foster R.J., Tu L.H., Raleigh D.P., Radford S.E., Ashcroft A.E. (2015) *Nat. Chem.*, **7**, 73-81.

Поступила: 16. 02. 2015.

PHYSICO-CHEMICAL METHODS FOR STUDING β -AMYLOID AGGREGATION

*S.P. Radko^{1,2}, S.A. Khmeleva¹, E.V. Suprun¹, S.A.Kozin², N.V. Bodoev¹, A.A. Makarov²,
A.I. Archakov¹, V.V. Shumyantseva¹*

¹Institute of Biomedical Chemistry,

10 Pogodinskaya str., Moscow 119121, Russia; tel./fax: (495)245-08-57; e-mail: radko@ibmc.msk.ru

²Engelhardt Institute of Molecular Biology, Moscow, Russia

Alzheimer's disease is the most prevalent neurodegenerative pathology. According to the amyloid cascade hypothesis, a key event of the Alzheimer's disease pathogenesis is a transition of the β -amyloid peptide ($A\beta$) from the monomeric form to the aggregated state. The mechanism of $A\beta$ aggregation is intensively studied *in vitro*, by means of synthetic peptides and various physico-chemical methods allowing evaluation of size, molecular structure, and morphology of the formed aggregates. The paper reviews both the well-known and recently introduced physico-chemical methods for analysis of $A\beta$ aggregation, including microscopy, optical and fluorescent methods, method of electron paramagnetic resonance, electrochemical and electrophoretic methods, gel-filtration, and mass spectrometric methods. Merits and drawbacks of the methods are discussed. The unique possibility to simultaneously observe $A\beta$ monomers as well oligomers and large aggregates by means of atomic force microscopy or fluorescence correlation spectroscopy is emphasized. The high detection sensitivity of the latter method, monitoring the aggregation process in $A\beta$ solutions at low peptide concentrations is underlined. Among mass spectrometric methods, the ion mobility mass spectrometry is marked out as a method enabling to obtain information about both the spectrum of $A\beta$ oligomers and their structure. It is pointed out that the use of several methods giving the complementary data about $A\beta$ aggregates is the best experimental approach to studying the process of β -amyloid peptide aggregation *in vitro*.

Key words: Alzheimer's disease, β -amyloid, aggregation, analytical methods.