

©Коллектив авторов

## ВЛИЯНИЕ НЕЙРОПРОТЕКТОРА ИЗАТИНА НА КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЕ ФРАГМЕНТОВ БЕТА-АМИЛОИДНОГО ПЕПТИДА С ВНУТРИКЛЕТОЧНЫМИ БЕЛКАМИ

О.А. Бунеева<sup>1</sup>, О.В. Гнеденко<sup>1</sup>, М.В. Медведева<sup>2</sup>, А.С. Иванов<sup>1</sup>, А.Е. Медведев<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н.Ореховича,  
119121, Москва, Погодинская ул. 10; \*эл. почта: professor57@yandex.ru

<sup>2</sup>МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва

Бета-амилоидный пептид (1-42) ( $A\beta_{1-42}$ ) является одним из “ключевых игроков”, вовлечённых в развитие болезни Альцгеймера (AD) и других патологических состояний, обусловленных образованием и накоплением белковых агрегатов в центральной нервной системе. Его связывание с важными внутриклеточными мишенями с последующей их инактивацией, по-видимому, может представлять собой одно из ранних событий, предшествующих формированию внеклеточной патогенной олигомеризации/агрегации  $A\beta_{1-42}$ . Можно ожидать, что диссоциация комплексов  $A\beta_{1-42}$  с белками-мишенями под действием ингибиторов комплексообразования и последующая деградация  $A\beta_{1-42}$  будет не только защищать критически важные внутриклеточные мишени, но также препятствовать накоплению  $A\beta_{1-42}$  внутри клеток. Целью данной работы было исследование влияния нейропротектора изатина (100 мкМ) на взаимодействие известных  $A\beta$ -связывающих белков – глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (ГАФД) и пируваткиназы – с  $A\beta_{1-42}$  и его фрагментами ( $A\beta_{1-28}$ ,  $A\beta_{12-28}$ ,  $A\beta_{25-35}$ ). Иммуобилизованные на чипе оптического биосенсора Biacore  $A\beta_{1-42}$  и его фрагменты ( $A\beta_{1-28}$ ,  $A\beta_{12-28}$ ,  $A\beta_{25-35}$ ) взаимодействовали с ГАФД и пируваткиназой. Наиболее низкие и примерно равные значения  $K_d$  были получены для комплексов этих ферментов с  $A\beta_{1-42}$  и  $A\beta_{25-35}$ . В присутствии 100 мкМ изатина существенное увеличение  $K_d$  в 5 и более раз отмечено для комплексов ГАФД со всеми исследованными  $A\beta$  пептидами за исключением  $A\beta_{1-28}$ . В отличие от ГАФД, изатин способствовал диссоциации комплексов пируваткиназы только с полноразмерным  $A\beta_{1-42}$  (вызывая увеличение  $K_d$  более чем в тридцать раз) и в меньшей степени с  $A\beta_{25-35}$  и  $A\beta_{1-28}$  (увеличение  $K_d$  примерно на один порядок). При этом значения  $K_d$  для комплексов пируваткиназы и ГАФД со всеми исследованными  $A\beta$  пептидами в присутствии 100 мкМ изатина находились в более узком диапазоне ( $10^{-7}$  М –  $10^{-6}$  М), чем в отсутствие этого нейропротектора ( $10^{-8}$  М –  $10^{-6}$  М). Полученные данные свидетельствуют о существовании принципиальной возможности (фармакологической) защиты важных внутриклеточных мишеней от действия как  $A\beta_{1-42}$ , так и его агрессивных укороченных пептидов ( $A\beta_{25-35}$ ).

**Ключевые слова:** бета-амилоидные пептиды  $A\beta_{1-42}$ ,  $A\beta_{1-28}$ ,  $A\beta_{12-28}$ ,  $A\beta_{25-35}$ ; белки, связывающиеся с бета-амилоидным пептидом; изатин; поверхностный плазмонный резонанс; оптический биосенсор Biacore

DOI: 10.18097/PBMC20186405423

### ВВЕДЕНИЕ

Бета-амилоидный пептид (1-42) ( $A\beta_{1-42}$ ) является одним из “ключевых игроков”, вовлечённых в развитие болезни Альцгеймера (AD) и других патологических состояний, обусловленных образованием и накоплением белковых агрегатов в центральной нервной системе [1-3].

Образуясь в результате протеолитического процессинга трансмембранного белка-предшественника амилоида (APP),  $A\beta$  может накапливаться внутри нейронов [4-7]. Связывание  $A\beta$  с важными внутриклеточными мишенями с последующей их инактивацией приводит к созданию условий, способствующих развитию окислительного стресса и, наконец, гибели клеток [8, 9]. Последнее, по-видимому, может представлять собой одно из ранних событий, предшествующих формированию внеклеточной патогенной олигомеризации/агрегации  $A\beta$ , описанной в литературе. С другой стороны, комплексообразование  $A\beta_{1-42}$  с различными клеточными мишенями может способствовать поддержанию его мономерного состояния, как это имело место, например, при взаимодействии  $A\beta_{1-42}$  с  $Na^+$ ,  $K^+$ -АТФазой [10]. В этом случае можно ожидать,

что диссоциация комплексов  $A\beta_{1-42}$  с белками-мишенями под действием ингибиторов комплексообразования и последующая деградация  $A\beta_{1-42}$  будет защищать критически важные внутриклеточные мишени, а также препятствовать накоплению  $A\beta_{1-42}$  внутри клеток и образованию амилоидных агрегатов.

Ранее в ходе протеомного профилирования препаратов мозга интактных крыс и мышей, проведенного с использованием  $A\beta_{1-42}$  в качестве аффинного лиганда, было идентифицировано более 80 индивидуальных белков. В присутствии нейропротектора изатина [11, 12] число белков, специфически связывающихся с этим лигандом, значительно уменьшалось [13]. Прямой эффект изатина на комплексообразование  $A\beta_{1-42}$  с высокоочищенными препаратами белков, обнаруженных в ходе протеомного профилирования, был подтвержден при помощи биосенсорного анализа [14] с использованием оптических SPR-биосенсоров Biacore 3000 и Biacore X100. Все исследованные белки образовывали молекулярные комплексы с иммобилизованным  $A\beta_{1-42}$ , а значения  $K_d$  этих комплексов варьировали в довольно широких пределах от  $5 \cdot 10^{-8}$  М до  $5 \cdot 10^{-6}$  М [13, 15]. Окислительная модификация исследованных белков оказывала разнонаправленное влияние

\* - адресат для переписки

на прочность комплексов с А $\beta$ <sub>1-42</sub>; при этом изатин повышал диссоциацию комплексов А $\beta$ <sub>1-42</sub> с рядом интактных (пероксиредоксин, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа) и/или подвергнутых окислительной модификации (пероксиредоксин, пируваткиназа) модельных белков [15].

Целью данной работы было исследование влияния изатина на взаимодействие А $\beta$ -связывающих белков – глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (ГАФД) и пируваткиназы – с А $\beta$ <sub>1-42</sub> и его фрагментами (А $\beta$ <sub>1-28</sub>, А $\beta$ <sub>12-28</sub>, А $\beta$ <sub>25-35</sub>).

## МЕТОДИКА

В работе использовали электрофоретически гомогенные ГАФД и пируваткиназу (уд. акт. 124 мкмоль/мин на 1 мг белка и 232 мкмоль/мин на 1 мг белка, соответственно), выделенные из скелетных мышц кролика [16], бета-амилоидный пептид (1-42) человека (А $\beta$ <sub>1-42</sub>) и его фрагменты, включающие остатки 1-28 (А $\beta$ <sub>1-28</sub>), 12-28 (А $\beta$ <sub>12-28</sub>), 25-35 (А $\beta$ <sub>25-35</sub>) (“Sigma-Aldrich”, США).

НBS-буфер (150 мМ NaCl, 3 мМ ЭДТА, 0,005% детергента P20, 10 мМ HEPES (pH 7,4)); 10 мМ ацетатный буфер (pH 4,0); набор реагентов для ковалентной иммобилизации белков за первичные аминогруппы (1-этил-3-(3-диметиламинопропил)-карбодиимид-HCl (EDC), N-гидроксисукцинимид (NHS), 1 М этаноламин-HCl (pH 8,5)) были получены от “GE Healthcare” (США).

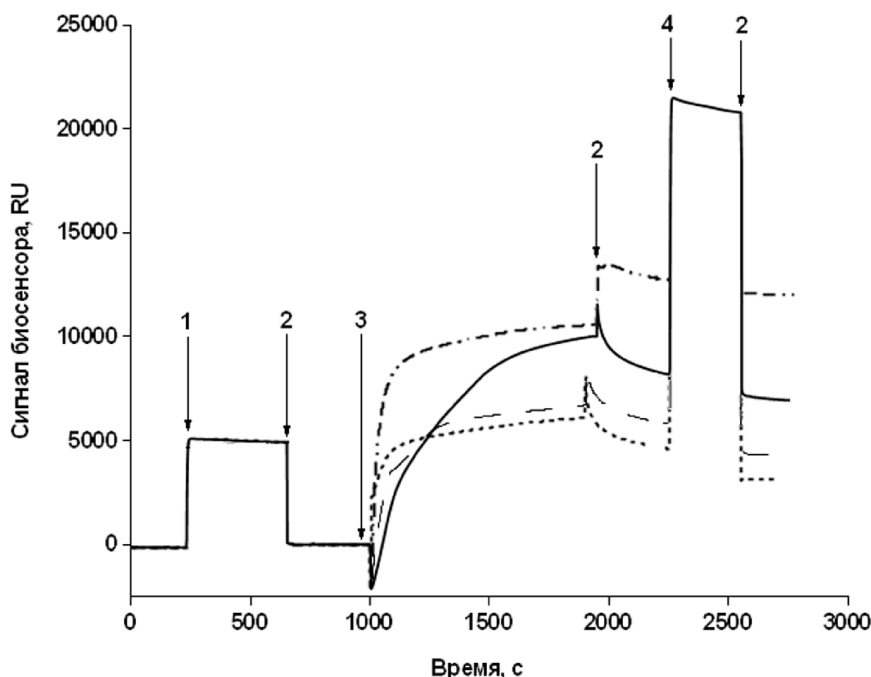
Взаимодействие исследуемых белков с иммобилизованным бета-амилоидным пептидом проводили, используя оптические SPR-биосенсоры Biacore T200 и Biacore X100 и программное

обеспечение Biacore Control (“GE Healthcare”). Все измерения выполнены при 25°C с использованием стандартных оптических чипов CM5 (“GE Healthcare”), покрытых слоем карбоксиметилированного декстрана. Молекулярные взаимодействия регистрировали в виде сенсограмм, представляющих зависимость сигнала биосенсора (в резонансных единицах, RU) от времени.

Иммобилизацию А $\beta$ <sub>1-42</sub> и его фрагментов (А $\beta$ <sub>1-28</sub>, А $\beta$ <sub>12-28</sub>, А $\beta$ <sub>25-35</sub>) выполняли в соответствии с разработанным протоколом [17] (рис. 1). Карбоксильные группы чипа активировали смесью 0,2 М EDC/0,05 М NHS в течение 7 мин при скорости потока 5 мкл/мин. Далее инжестировали растворы А $\beta$ <sub>1-42</sub> (100 мкг/мл), А $\beta$ <sub>1-28</sub>, А $\beta$ <sub>12-28</sub> и А $\beta$ <sub>25-35</sub> (200 мкг/мл) в 10 мМ ацетатном буфере, pH 4,0 в течение 15 мин при скорости потока 5 мкл/мин. Непрореагировавшие карбоксильные группы блокировали инъекцией 1 М этаноламин-HCl (pH 8,5) в течение 3 мин при скорости потока 5 мкл/мин.

Взаимодействие белков с иммобилизованным А $\beta$ <sub>1-42</sub> и его фрагментами (А $\beta$ <sub>1-28</sub>, А $\beta$ <sub>12-28</sub>, А $\beta$ <sub>25-35</sub>) исследовали в течение 5 мин при скорости потока 10 мкл/мин. Перед повторным использованием поверхность чипа регенерировали промыванием 1 М NaCl в 50 мМ фосфатном буфере (pH 7,4) в течение 0,5 мин при скорости потока 50 мкл/мин. Для минимизации возможного образования олигомеров/агрегатов иммобилизованных А $\beta$  пептидов оптические чипы использовали в экспериментах в течение 24 ч.

Полученные сенсограммы анализировали с помощью программы BIAevaluation Version 4.1 (“GE Healthcare”).



**Рисунок 1.** Иммобилизация А $\beta$ <sub>1-42</sub> и его фрагментов на поверхности оптического чипа CM5. Стрелками указаны следующие инъекции: 1 – EDC/NHS; 2 – HBS; 3 – А $\beta$ <sub>1-42</sub> и его фрагменты (100 мкг/мл) в 10 мМ ацетатном буфере, pH 4,0; 4 – 1 М этаноламин-HCl. Время пропускания раствора этаноламина (4) не превышало 5 мин. Линии обозначают: — А $\beta$ <sub>1-42</sub>; - - - А $\beta$ <sub>1-28</sub>; - · - · А $\beta$ <sub>12-28</sub>; · · · · А $\beta$ <sub>25-35</sub>.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

В соответствии с нашими предыдущими данными, инъекция растворов ГАФД и пируваткиназы через канал оптического биосенсора с иммобилизованным  $A\beta_{1-42}$  приводила к появлению четкого сигнала прибора, который зависел от концентрации добавленного белка (рис. 2, 3). Рассчитанные значения равновесной константы диссоциации ( $K_d$ ) (в районе  $1 \cdot 10^{-7}$  М для ГАФД и  $4 \cdot 10^{-8}$  М для пируваткиназы, см. таблицу) хорошо согласуются с результатами ранее проведенных исследований [13, 15].

Иммобилизованные на чипе оптического биосенсора укороченные фрагменты  $A\beta$  ( $A\beta_{1-28}$ ,  $A\beta_{12-28}$ ,  $A\beta_{25-35}$ ) взаимодействовали с ГАФД и пируваткиназой. Однако значения  $K_d$ , полученных для комплексов этих белков с исследованными фрагментами, существенно варьировали. В случае ГАФД значения  $K_d$  возрастали в следующем порядке  $K_d$ : ( $A\beta_{1-28}$ ) >  $K_d$  ( $A\beta_{12-28}$ ) >  $K_d$  ( $A\beta_{1-42}$ )  $\approx$   $K_d$  ( $A\beta_{25-35}$ ) (таблица). В случае пируваткиназы комплекс с  $A\beta_{25-35}$  также характеризовался самым низким значением  $K_d$ ,

которое увеличивалось в несколько ином порядке:  $K_d$  ( $A\beta_{12-28}$ ) >  $K_d$  ( $A\beta_{1-28}$ ) >  $K_d$  ( $A\beta_{1-42}$ )  $\approx$   $K_d$  ( $A\beta_{25-35}$ ). В присутствии 100 мкМ концентрации изатина существенное увеличение  $K_d$  в 5 и более раз отмечено для комплексов ГАФД со всеми исследованными  $A\beta$  пептидами, за исключением  $A\beta_{1-28}$ . В отличие от ГАФД, изатин способствовал диссоциации комплексов пируваткиназы только с полноразмерным  $A\beta_{1-42}$  (вызывая увеличение  $K_d$  более, чем в тридцать раз) и в меньшей степени с  $A\beta_{25-35}$  и  $A\beta_{1-28}$  (увеличение  $K_d$  примерно на один порядок). При этом значения  $K_d$  для комплексов пируваткиназы и ГАФД со всеми исследованными  $A\beta$  пептидами в присутствии 100 мкМ изатина находились в более узком диапазоне ( $10^{-7}$  М –  $10^{-6}$  М), чем в отсутствие этого нейротропика ( $10^{-8}$  М –  $10^{-6}$  М).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Изатин – эндогенный окисленный индол (индол-2,3-дион), обнаруженный в мозге, периферических тканях и биологических жидкостях

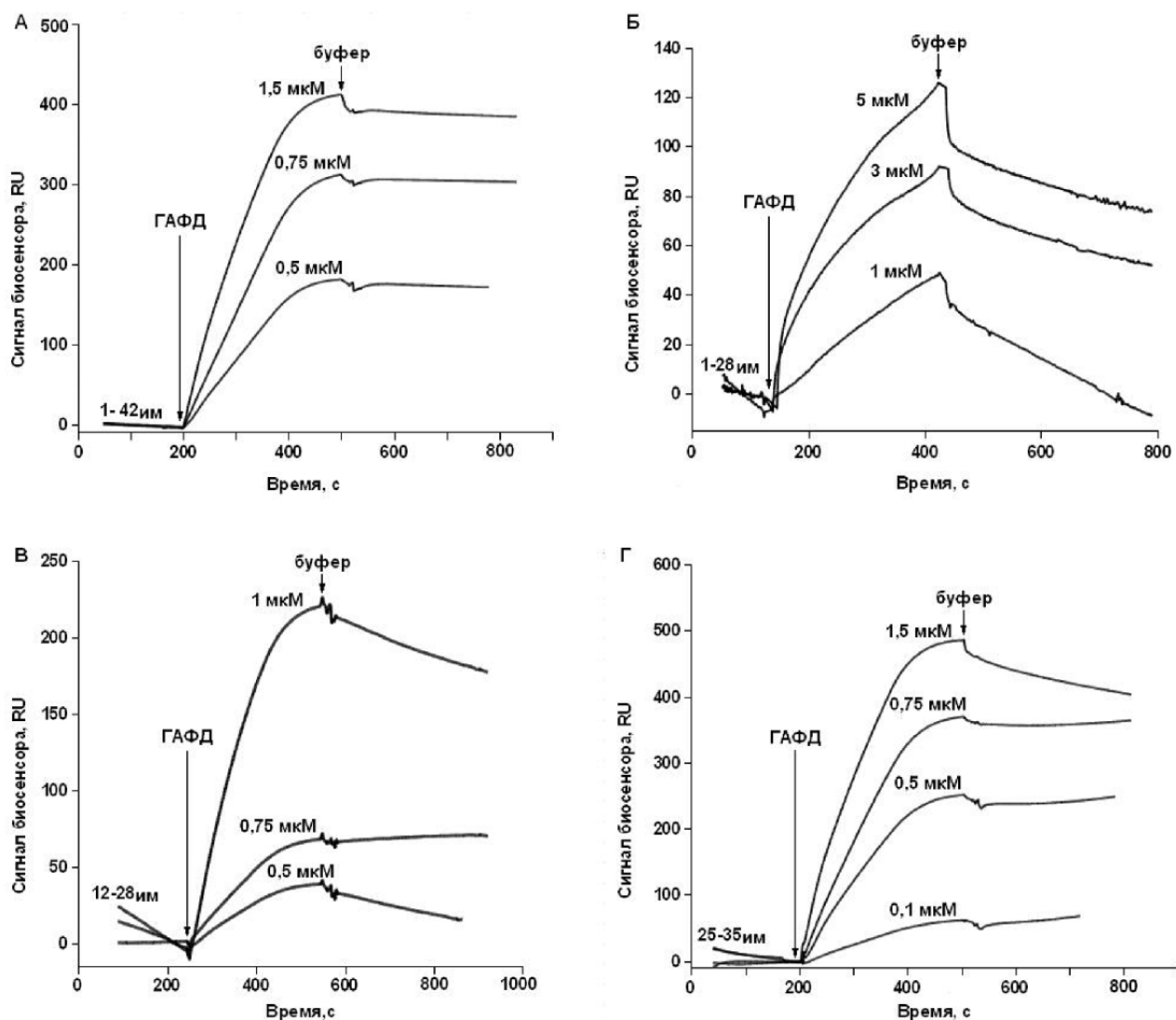


Рисунок 2. Типичные сенсограммы, полученные при инъекции растворов ГАФД через канал оптического биосенсора ViaSense с иммобилизованным  $A\beta_{1-42}$  (А) и его фрагментами  $A\beta_{1-28}$  (Б),  $A\beta_{12-28}$  (В) и  $A\beta_{25-35}$  (Г).

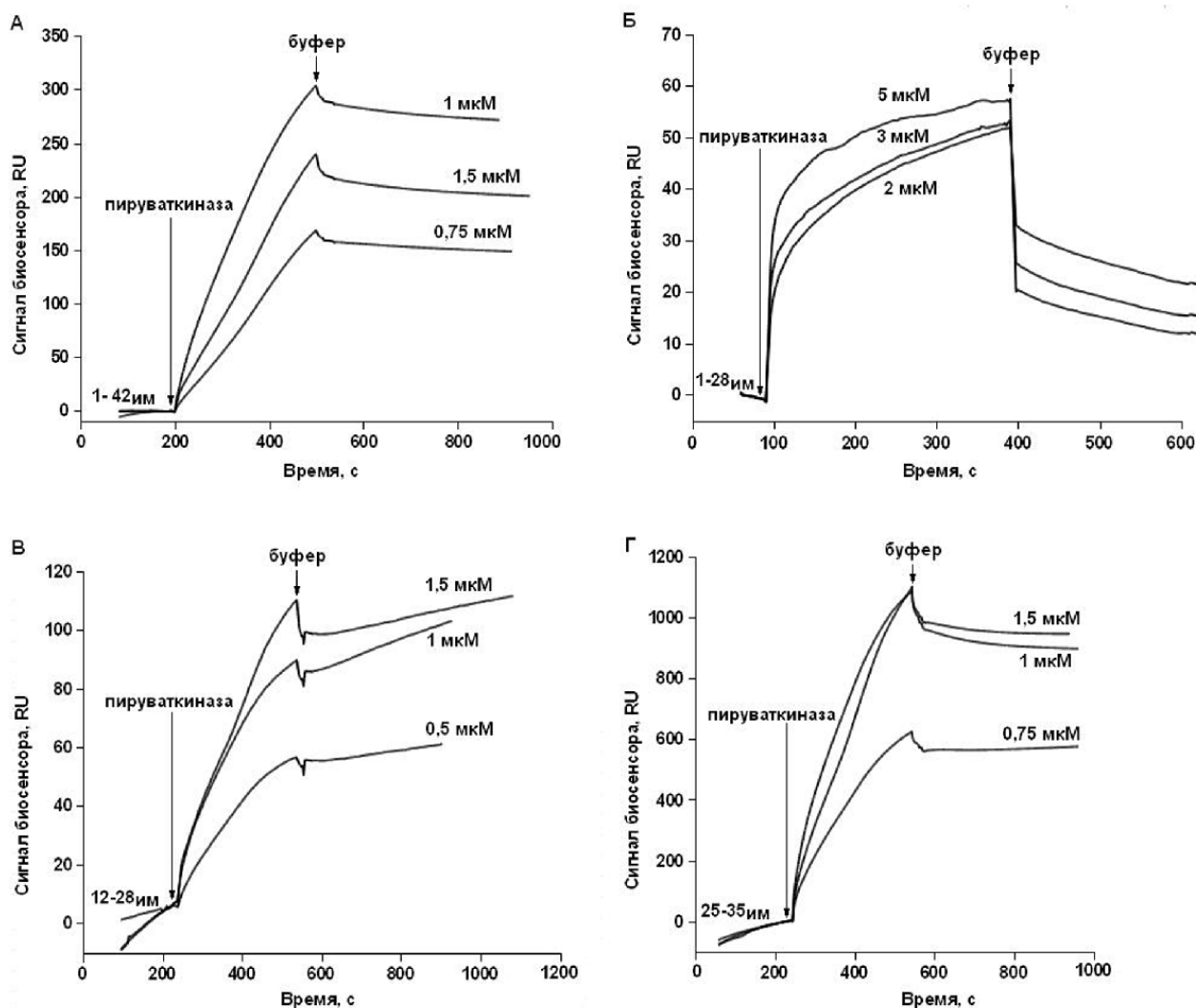
## ВЛИЯНИЕ ИЗАТИНА НА СВЯЗЫВАНИЕ БЕЛКОВ С ФРАГМЕНТАМИ А $\beta$

животных и человека [11, 12]. Свои биологические эффекты изатин реализует, взаимодействуя с многочисленными изатин-связывающими белками, локализованными в различных компартментах клетки [12]. К их числу относятся и белки, взаимодействующие с А $\beta$ <sub>1-42</sub> [13]. С учётом известных данных о накоплении внутри нейронов А $\beta$ <sub>1-42</sub>, который может образовывать комплексы с критически важными клеточными белками, способствуя нарушению метаболизма, диссоциация таких комплексов, очевидно, будет оказывать защитный эффект [13]. С другой стороны, свободный А $\beta$  становится мишенью для ряда внутриклеточных протеаз, препятствующих отложению амилоидных агрегатов [18]. В связи с этим представляло интерес сравнить взаимодействие полноразмерного А $\beta$ <sub>1-42</sub> и его укороченных фрагментов с известными А $\beta$ -связывающими белками (ГАФД, пируваткиназа) и влияние изатина на это взаимодействие.

Полученные в настоящем исследовании результаты свидетельствуют о том, что и ГАФД, и пируваткиназа проявляют более высокое сродство к полноразмерному А $\beta$ <sub>1-42</sub> и его фрагменту А $\beta$ <sub>25-35</sub>,

чем к двум другим исследованным фрагментам: А $\beta$ <sub>12-28</sub> и особенно А $\beta$ <sub>1-28</sub>. При этом изатин более эффективно действовал именно на комплексы ГАФД и пируваткиназы с А $\beta$ , характеризующиеся более высоким сродством, и не оказывал никакого эффекта на взаимодействие ГАФД с А $\beta$ <sub>1-28</sub>.

С учётом известных данных о нейротоксических свойствах именно А $\beta$ <sub>25-35</sub>, обнаруженного в нейронах пациентов с болезнью Альцгеймера [19], наши данные об эффективном снижении взаимодействия А $\beta$ <sub>25-35</sub> с некоторыми А $\beta$ -связывающими белками (ГАФД, пируваткиназа) под действием нейропротектора изатина свидетельствуют о существовании принципиальной возможности (фармакологической) защиты важных внутриклеточных мишеней от действия как А $\beta$ <sub>1-42</sub>, так и его агрессивных укороченных пептидов (А $\beta$ <sub>25-35</sub>). Последнее особенно важно в связи с тем, что именно с использованием иммобилизованного А $\beta$ <sub>25-35</sub> в качестве аффинного лиганда общее число А $\beta$ -связывающих белков мозга (n=48) было сопоставимо с числом белков, связывающихся с А $\beta$ <sub>1-42</sub> (n=72), но не с А $\beta$ <sub>12-28</sub> (n=10) (Копылов, Бунеева, Медведев, готовится к печати).



**Рисунок 3.** Типичные сенсограммы, полученные при инъекции растворов пируваткиназы через канал оптического биосенсора Biacore с иммобилизованным А $\beta$ <sub>1-42</sub> (А) и его фрагментами А $\beta$ <sub>1-28</sub> (Б), А $\beta$ <sub>12-28</sub> (В) и А $\beta$ <sub>25-35</sub> (Г).

Таблица. Взаимодействие глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (ГАФД) и пируваткиназы (ПК) с полноразмерным Аβ<sub>1-42</sub> и его фрагментами и влияние 100 мкМ изатина на этот процесс

Имобили- зованный пептид	Аналит	Без изатина			В присутствии +100 мкМ изатина		
		ka, M <sup>-1</sup> ·с <sup>-1</sup>	kd, с <sup>-1</sup>	Kd, M	ka, M <sup>-1</sup> ·с <sup>-1</sup>	kd, с <sup>-1</sup>	Kd, M
Аβ <sub>1-42</sub>	ГАФД	(3,5±0,1)·10 <sup>3</sup>	(3,2±0,1)·10 <sup>-4</sup>	9,17·10 <sup>-8</sup>	(2,02±0,08)·10 <sup>3</sup>	(1,03±0,01)·10 <sup>-3</sup>	5,08·10 <sup>-7</sup>
	ПК	(4,01±0,08)·10 <sup>3</sup>	(1,75±0,04)·10 <sup>-4</sup>	4,36·10 <sup>-8</sup>	(0,30±0,01)·10 <sup>3</sup>	(4,29±0,07)·10 <sup>-4</sup>	1,42·10 <sup>-6</sup>
Аβ <sub>1-28</sub>	ГАФД	(1,97±0,07)·10 <sup>3</sup>	(2,88±0,1)·10 <sup>-3</sup>	1,46·10 <sup>-6</sup>	(2,26±0,15)·10 <sup>3</sup>	(3,22±0,04)·10 <sup>-3</sup>	1,42·10 <sup>-6</sup>
	ПК	(2,20±0,02)·10 <sup>4</sup>	(2,93±0,06)·10 <sup>-3</sup>	1,33·10 <sup>-7</sup>	(2,66±0,12)·10 <sup>3</sup>	(5,30±0,08)·10 <sup>-3</sup>	1,99·10 <sup>-6</sup>
Аβ <sub>12-28</sub>	ГАФД	(4,35±0,2)·10 <sup>3</sup>	(6,7±0,1)·10 <sup>-4</sup>	1,55·10 <sup>-7</sup>	(1,44±0,09)·10 <sup>3</sup>	(2,9±0,09)·10 <sup>-3</sup>	2,01·10 <sup>-6</sup>
	ПК	(1,32±0,07)·10 <sup>3</sup>	(8,1±0,5)·10 <sup>-4</sup>	6,08·10 <sup>-7</sup>	(1,78±0,08)·10 <sup>3</sup>	(1,23±0,08)·10 <sup>-3</sup>	6,88·10 <sup>-7</sup>
Аβ <sub>25-35</sub>	ГАФД	(4,5±0,1)·10 <sup>3</sup>	(3,2±0,1)·10 <sup>-4</sup>	7,07·10 <sup>-8</sup>	(1,52±0,08)·10 <sup>3</sup>	(1,01±0,1)·10 <sup>-3</sup>	6,65·10 <sup>-7</sup>
	ПК	(6,67±0,04)·10 <sup>3</sup>	(9,6±0,3)·10 <sup>-5</sup>	1,44·10 <sup>-8</sup>	(1,74±0,04)·10 <sup>3</sup>	(1,85±0,03)·10 <sup>-4</sup>	1,06·10 <sup>-7</sup>

## БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013-2020 годы и частично поддержана грантом РФФИ 18-015-00042.

## ЛИТЕРАТУРА

- Hardy J., Selkoe D.J. (2002) Science **297**, 353-356.
- Masters C.L., Selkoe D.J. (2012) Cold Spring Harb. Perspect. Med., **2**(6), a006262.
- Musiek E.S., Holtzman D.M. (2015) Nat. Neurosci., **18**, 800-806.
- LaFerla F.M., Green K.N., Oddo S. (2007) Nat. Rev. Neurosci., **8**, 499-509.
- Kumar S., Wirths O., Theil S., Gerth J., Bayer T.A., Walter J. (2013) Acta Neuropathol., **125**, 699-709.
- Wirths O., Multhaup G., Czech C., Blanchard V., Moussaoui S., Tremp G., Pradier L., Beyreuther K., Bayer T.A. (2001) Neurosci. Lett., **306**, 116-120.
- Reddy P.H., Beal M.F. (2008) Trends. Mol. Med., **14**, 45-53.
- Habib L., Lee M.T.C., Yang J. (2010) J. Biol. Chem., **285**, 38933-38943.
- Yao J., Du H., Yan S., Fang F., Wang C., Lue L.F., Guo L., Chen D., Stern D.M., Gunn Moore F.J., Xi Chen J., Arancio O., Yan S.S. (2011) J. Neurosci., **31**, 2313-2320.
- Petrushanko I.Y., Mitkevich V.A., Anashkina A.A., Adzhubei A.A., Burnysheva K.M., Lakunina V.A., Kamanina Y.V., Dergousova E.A., Lopina O.D., Ogunshola O.O., Bogdanova A.Y., Makarov A.A. (2016) Sci. Rep., **6**, 27738.
- Medvedev A.E., Buneeva O.A., Glover V. (2007) Biol. Targets Ther., **1**, 151-162.
- Medvedev A., Buneeva O., Gnedenko O., Ershov P., Ivanov A. (2018) Biofactors, **44**(2), 95-108.
- Medvedev A.E., Buneeva O.A., Kopylov A.T., Gnedenko O.V., Medvedeva M.V., Kozin S.A., Ivanov A.S., Zgoda V.G., Makarov A.A. (2015) Int. J. Mol. Sci., **16**, 476-495.
- Florinskaya A., Ershov P., Mezentsev Y., Kaluzhskiy L., Yablokov E., Medvedev A., Ivanov A. (2018) Sensors (Basel), **18**(5), pii: E1616.
- Бунеева О.А., Гнеденко О.В., Медведева М.В., Иванов А.С., Медведев А.Е. (2016) Биомед. химия, **62**, 720-724. DOI: 10.18097/PBMC20166206720
- Scopes R.K., Stoter A. (1982) Methods Enzymol., **90** Pt E, 479-490.
- Medvedev A., Buneeva O., Kopylov A., Gnedenko O., Ivanov A., Zgoda V., Makarov A.A. (2015) Methods Mol. Biol., **1295**, 465-477.
- Rogberg M., Furlund C.B., Moe M.K., Fladby T. (2014) Biochimie, **105**, 216-220.
- Millucci L., Ghezzi L., Bernardini G., Santucci A. (2010) Curr. Protein Peptide Sci., **11**, 54-67.

Поступила: 02. 07. 2018.  
Принята к печати: 15. 09. 2018.

THE EFFECT OF THE NEUROPROTECTOR ISATIN ON COMPLEX FORMATION  
OF BETA-AMYLOID PEPTIDE FRAGMENTS WITH SOME INTRACELLULAR PROTEINS

*O.A. Buneeva<sup>1</sup>, O.V. Gnedenko<sup>1</sup>, M.V. Medvedeva<sup>2</sup>, A.S. Ivanov<sup>1</sup>, A.E. Medvedev<sup>1\*</sup>*

<sup>1</sup>Institute of Biomedical Chemistry,  
10 Pogodinskaya str., Moscow, 119121 Russia; \*e-mail: professor57@yandex.ru

<sup>2</sup>Moscow State University, Moscow, Russia

Amyloid-β peptide (1-42) (Aβ<sub>1-42</sub>) is a key player in the development and progression of Alzheimer's disease (AD) and related pathologies, determined by formation of protein aggregates in the central nervous system. Aβ<sub>1-42</sub> binding to crucial intracellular targets (and their subsequent inactivation) obviously represents one of the earliest events preceding extracellular pathogenic oligomerization/aggregation of Aβ<sub>1-42</sub>. It is reasonable to expect that dissociation of the Aβ<sub>1-42</sub> complexes with intracellular proteins by means of inhibitors followed by subsequent degradation of Aβ<sub>1-42</sub> would not only protect critically important proteins but also prevent intracellular accumulation of Aβ<sub>1-42</sub>. The aim of this study was to investigate the effect of the neuroprotector isatin (100 μM) on interaction of known Aβ-binding proteins, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and pyruvate kinase, with Aβ<sub>1-42</sub> and its fragments (Aβ<sub>1-28</sub>, Aβ<sub>12-28</sub>, Aβ<sub>25-35</sub>). Aβ<sub>1-42</sub> and its fragments (Aβ<sub>1-28</sub>, Aβ<sub>12-28</sub>, Aβ<sub>25-35</sub>) immobilized on the Biacore optical biosensor chip interacted with GAPDH and pyruvate kinase. The lowest and basically equal  $K_d$  values were determined for GAPDH and pyruvate kinase complexes with immobilized Aβ<sub>1-42</sub> and Aβ<sub>25-35</sub>. The presence of 100 μM isatin caused a significant (more than fivefold) increase in the  $K_d$  values for GAPDH complexes with all Aβ peptides except Aβ<sub>1-28</sub>. In contrast to GAPDH isatin increased dissociation of pyruvate kinase complexes only with Aβ<sub>1-42</sub> (causing a 30-fold increase in  $K_d$ ) and to a lesser extent with Aβ<sub>12-28</sub> and Aβ<sub>25-35</sub> (a 10-fold increase in  $K_d$ ). It should be noted that in the presence of isatin the  $K_d$  values for GAPDH and pyruvate kinase complexes with all Aβ studied were in a narrower concentration range (10<sup>-7</sup> M – 10<sup>-6</sup> M) than in the absence of this neuroprotector (10<sup>-8</sup> M – 10<sup>-6</sup> M). Data obtained suggest existence of principal possibility of (pharmacological) protection of crucial intracellular targets against both Aβ<sub>1-42</sub>, and its aggressive truncated peptides (Aβ<sub>25-35</sub>).

**Key words:** beta-amyloid peptides Aβ<sub>1-42</sub>, Aβ<sub>1-28</sub>, Aβ<sub>12-28</sub>, Aβ<sub>25-35</sub>; amyloid-beta binding proteins; isatin; surface plasmon resonance; optical biosensor Biacore