



## БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЙ ФРАГМЕНТ РЕЦЕПТОРА КОНЕЧНЫХ ПРОДУКТОВ ГЛИКИРОВАНИЯ (RAGE) СПОСОБЕН ИНГИБИРОВАТЬ ОЛИГОМЕРИЗАЦИЮ БЕТА-АМИЛОИДА

© 2022 г. Т. Д. Волкова<sup>\*, #</sup>, А. В. Аветисян<sup>\*\*</sup>, Д. О. Короев<sup>\*</sup>, А. В. Камынина<sup>\*, \*\*\*</sup>, С. М. Баласанянц<sup>\*\*\*\*</sup>, Р. А. Симонян<sup>\*\*</sup>, О. М. Вольпина<sup>\*</sup>

<sup>\*</sup>ФГБУН “Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова” РАН, Россия, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

<sup>\*\*</sup>Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119992 Москва, Ленинские горы, 1, стр. 40

<sup>\*\*\*</sup>Центр исследований молекулярных механизмов старения и возрастных заболеваний, Московский физико-технический институт (Национальный исследовательский университет), Россия, 141701 Долгопрудный, Институтский пер., 9

<sup>\*\*\*\*</sup>Department of Biological Sciences, University of Illinois at Chicago, 900 South Ashland Avenue, MBRB 4168, Chicago, Illinois, 60607 USA

Поступила в редакцию 18.10.2021 г.

После доработки 09.12.2021 г.

Принята к публикации 11.12.2021 г.

Ранее обнаружено, что синтетический фрагмент (60–76) внеклеточного домена рецептора конечных продуктов гликирования (RAGE) оказывает защитное действие на животных и клеточных моделях болезни Альцгеймера. Было высказано предположение, что этот эффект обусловлен взаимодействием пептида с бета-амилоидом (A $\beta$ ), одним из лигандов RAGE, путем ингибирования образования токсичных олигомеров A $\beta$ . Цель настоящего исследования – изучить с помощью методов физической химии способность пептида (60–76) предотвращать олигомеризацию A $\beta$ 40 в растворе в сравнении с укороченным пептидом (65–76), не способствующим сохранению памяти мышей. Динамику образования фибрилл A $\beta$ 40 в присутствии пептидов оценивали с помощью тиофлавина T, относительные размеры олигомеров определяли методом динамического светорассеяния, связывание пептидов с A $\beta$ 40 исследовали флуоресцентным титрованием. С помощью двух методов было показано, что пептид (60–76) RAGE способен значительно (более чем на 90%) подавлять образование олигомеров и фибрилл A $\beta$ 40, в отличие от пептида (65–76). Кроме того, показано, что протективная активность и способность пептидов ингибировать олигомеризацию A $\beta$ 40 не коррелируют с их связыванием с мономерным/тетрамерным A $\beta$ 40. Нами получено *in vitro* подтверждение гипотезы о том, что протективная активность синтетического фрагмента (60–76) RAGE связана с его способностью ингибировать олигомеризацию A $\beta$ .

**Ключевые слова:** рецептор конечных продуктов гликирования, синтетические пептиды, болезнь Альцгеймера, бета-амилоид, олигомеризация, динамическое светорассеяние, тиофлавин T

DOI: 10.31857/S0132342322040194

### ВВЕДЕНИЕ

Известно, что процесс олигомеризации и образования фибрилл бета-амилоида (A $\beta$ ), происходящий в мозге человека при болезни Альцгеймера (БА), играет решающую роль в развитии нейродегенерации. Фибриллы образуют отложе-

ния вместе с тау-белком [1–5], в то время как растворимые олигомеры, которые не достигли размера фибрилл, связаны с нейротоксичностью A $\beta$  [6–8], что было показано *in vitro* [9–16] и *in vivo* [15]. Отметим, что олигомеризация и образование фибрилл – результаты патологического накопления A $\beta$  в головном мозге. Один из путей транспорта A $\beta$  из кровотока в мозг опосредуется рецептором конечных продуктов гликирования (RAGE) [17]. RAGE локализуется на мембранах эндотелия, а также на мембранах нейронов, астроцитов и микроглии [18–21]. При развитии БА наблюдается сверхэкспрессия этого рецептора, что приводит к

Сокращения: A $\beta$  – бета-амилоид; БА – болезнь Альцгеймера; БЭ-мышцы – мышцы, подвергнутые операции обонятельной бульбэктомии; P1 – пептид (60–76); P2 – укороченный пептид (65–76); RAGE – рецептор конечных продуктов гликирования; ThT – тиофлавин T.

<sup>#</sup> Автор для связи: (тел.: +7 (495) 336-57-77; эл. почта: tdvol@mx.ibch.ru).

чрезмерному накоплению А $\beta$  в головном мозге [18, 20, 22, 23]. А $\beta$  – один из лигандов RAGE, активирующих патогенные сигнальные каскады в микроглии [24, 25], которые стимулируют общие негативные эффекты, такие как неконтролируемое воспаление, дисфункция митохондрий, окислительный стресс и повреждение нейронов [18, 26, 27]. Таким образом, RAGE способен опосредовать нейротоксический эффект А $\beta$ , проявляющийся в ускорении развития когнитивных нарушений и патологических изменений в нейронах [28]. RAGE связывает все формы А $\beta$ : мономерные, олигомерные и фибриллярные; кроме того, с помощью набора антител к RAGE было показано, что различные формы А $\beta$ , в зависимости от уровня его олигомеризации, связываются с разными участками рецептора. В частности, фибриллы А $\beta$  связываются с доменом C2, а растворимые олигомеры – с доменом V [29].

Ранее нами было показано, что синтетический фрагмент (60–76) V-домена RAGE при интраназальном введении проявляет терапевтический эффект на животных моделях БА, предотвращая нарушение пространственной памяти у бульбэктомированных (БЭ) и трансгенных мышей 5xFAD – моделях БА, в которых мыши проявляют поведенческие, биохимические и морфологические признаки заболевания [30, 31]. Введение пептида также предотвращает как накопление А $\beta$  в головном мозге, так и патологические изменения в нейронах [32]. Способность пептида (60–76) предотвращать токсические эффекты А $\beta$  в смешанной первичной культуре нейронов и астроцитов также была продемонстрирована ранее [33]. Показана специфическая активация RAGE пептидом (60–76), которая приводит к высвобождению глутамата преимущественно из астроцитов [34]. Косвенные данные, указывающие на возможность взаимодействия пептида с А $\beta$ , были получены после интраназального введения флуоресцентно меченного аналога мышам 5xFAD. В результате наблюдалась совместная локализация пептида с амилоидными бляшками в срезах мозга [32]. Обнаружена также способность пептида связывать А $\beta$  в растворе [33, 35]. Принимая во внимание все полученные данные, мы предположи-

ли, что механизм защитной активности пептида может осуществляться через его взаимодействие с А $\beta$  путем ингибирования образования токсичных олигомеров.

Цель данной работы состояла в изучении двумя физико-химическими методами – динамического светорассеяния (ДСР) и анализа связывания с флуоресцентным красителем тиофлавином Т – способности синтетического пептида (60–76) RAGE, обладающего защитной активностью, предотвращать олигомеризацию А $\beta$  в растворе.

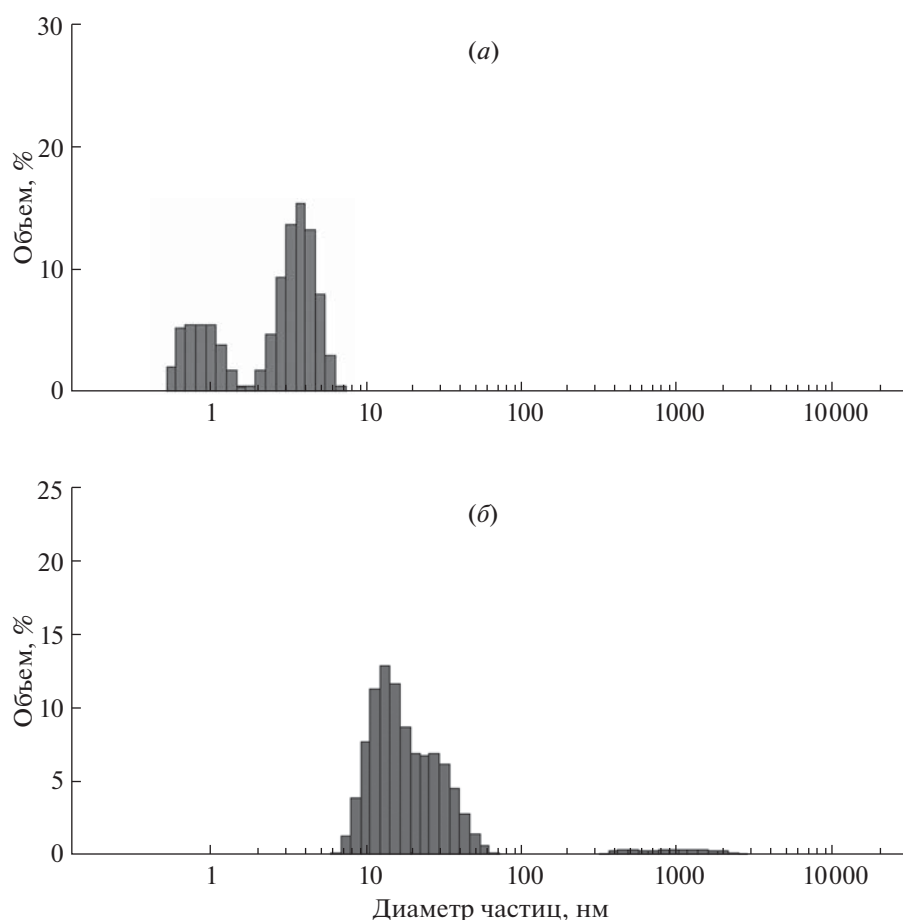
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В табл. 1 приведена последовательность пептида (60–76) (P1) и выбранного для сравнения его укороченного фрагмента (65–76) (P2), который не проявлял активности на животной модели БА [32, 36]. В исследованиях мы использовали А $\beta$ 40 – одну из двух основных аллоформ А $\beta$ , присутствующих в амилоидных бляшках [37, 38]. Растворимость А $\beta$ 40 намного выше, а скорость олигомеризации – ниже, чем у изоформы А $\beta$ 42, что позволяет работать с водными растворами точной концентрации и дает время для манипуляций на лабораторных приборах [39]. Размер частиц в растворе А $\beta$ 40 после его агрегации и влияние пептидов P1 и P2 на эту агрегацию изучали с помощью динамического светорассеяния (ДСР). Одновременно с этим способность пептидов ингибировать образование протофибрилл и фибрилл А $\beta$ 40 в растворе анализировали по изменению флуоресценции тиофлавина Т. Кроме того, способность пептидов P1 и P2 напрямую связываться с А $\beta$ 40 изучали с помощью флуоресцентного титрования.

**Определение размеров олигомеров А $\beta$ 40 в растворах методом динамического светорассеяния.** Для изучения влияния фрагментов RAGE на олигомеризацию А $\beta$ 40 использовали метод динамического светорассеяния. Вначале определяли размеры молекул А $\beta$ 40 в исходных растворах, приготовленных по различным методикам. На рис. 1а показано распределение частиц по размерам в растворе дезагрегированного А $\beta$ 40, на рис. 1б –

**Таблица 1.** Результаты ингибирования олигомеризации А $\beta$ 40 фрагментами RAGE и их способность предотвращать нарушение пространственной памяти бульбэктомированных мышей в модели болезни Альцгеймера

Обозначение	Фрагмент	Аминокислотная последовательность	Ингибирование олигомеризации А $\beta$ 40		Связывание с А $\beta$ 40 (флуоресцентное титрование)	Защита памяти БЭ-мышей [13]
			ДСР	ТнТ		
P1	60–76	AWKVLSPQGGPWDSVA	+	+	+	+
P2	65–76	SPQGGPWDSVA	–	±	+	–



**Рис. 1.** Распределение размеров олигомеров исходного раствора Аβ40, измеренное методом ДРС: (а) – дезагрегированный Аβ40; (б) – неагрегированный Аβ40.

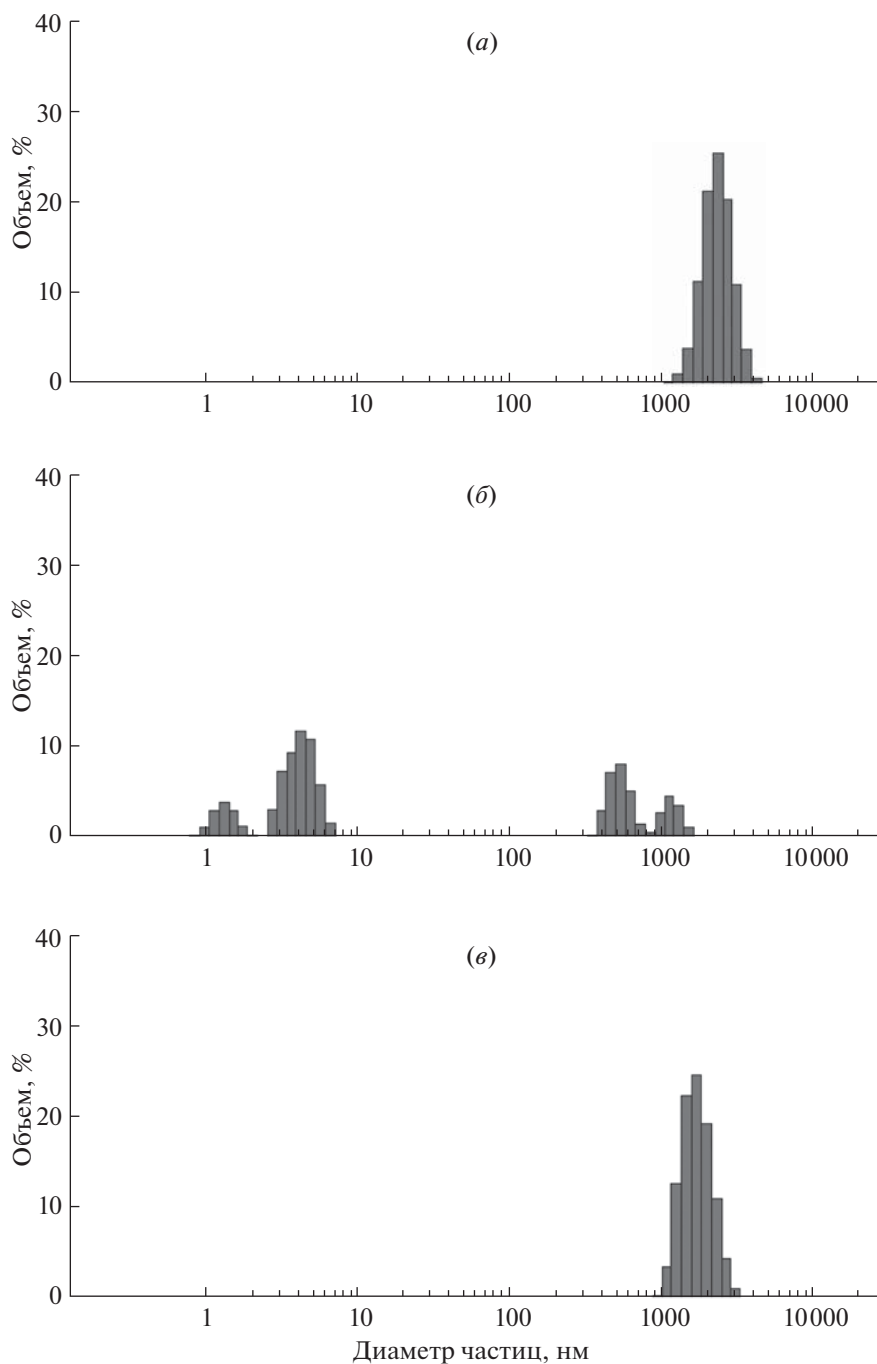
для Аβ40, растворенного в воде без предварительной дезагрегации.

В растворе дезагрегированного Аβ40 можно видеть два пула частиц (рис. 1а). Первый включает мелкие частицы со средним гидродинамическим диаметром 0.9 нм, что соответствует диаметру мономеров. Второй пул содержит частицы со средним диаметром 3.8 нм, которые представляют собой димеры, тримеры и тетрамеры Аβ40 [40]. В растворе Аβ40, не подвергавшегося дезагрегации, не обнаружено мелких частиц, что означает отсутствие мономеров, димеров, тримеров и тетрамеров. Вместо этого обнаружен пул с широким спектром частиц размером 8–80 нм (рис. 1б), а кроме того, есть немного крупных частиц диаметром 200–2000 нм, которые представляют собой высокоолигомеризованные молекулы. Для всех дальнейших исследований был использован дезагрегированный Аβ40 (рис. 1а).

Далее раствор дезагрегированного Аβ40 с пептидами или без них подвергали агрегации, т.е. инкубировали в условиях, способствующих агрегации, а затем методом динамического светорассе-

яния определяли размер всех молекул Аβ40 в смеси (рис. 2).

Анализ распределения частиц по размерам подтвердил, что олигомеризация Аβ40 прошла. В растворе Аβ40 без пептидов имелся только один пул агрегатов со средним значением гидродинамического диаметра 2500 нм (рис. 2а). После инкубации Аβ40 в присутствии пептида Р1 распределение частиц по размерам в растворе резко изменилось. На рис. 2б можно увидеть два пула мелких частиц, подобных тем, которые представлены на рис. 1а. Это означает, что в смеси осталось большое количество мелких частиц диаметром 1–6 нм. Кроме того, есть два небольших пула более крупных агрегатов со средним диаметром 500 и 1100 нм, которые, тем не менее, намного меньше, чем в случае “чистого” Аβ40. После инкубации Аβ40 в присутствии пептида Р2 распределение частиц в растворе было аналогично тому, которое наблюдалось для Аβ40 без пептида. На графике представлен только один пул очень крупных агрегатов со средним диаметром 1500 нм, что немного ниже, чем в случае чистого Аβ40, но зна-



**Рис. 2.** Распределение размеров олигомеров Аβ40 после 40-часовой инкубации, измеренное методом ДРС: (а) – только Аβ40; (б) – Аβ40 с P1; (в) – Аβ40 с P2.

чительно выше, чем в смеси Аβ40 с P1 (рис. 2в). Мелких частиц в растворе не осталось. Таким образом, методом динамического светорассеяния доказано, что P1 значительно ингибирует олигомеризацию Аβ40 и предотвращает образование крупных агрегатов, в то время как P2 практически не может влиять на процесс олигомеризации Аβ40.

**Изучение фибриллогенеза Аβ40 в присутствии фрагментов RAGE по изменению флуоресценции тиофлавина Т.** Следующей задачей исследования было выяснение способности пептидов RAGE влиять на образование фибрилл Аβ40 – крупных олигомеров вытянутой структуры, входящих в состав амилоидных бляшек в мозге больных БА. Для этого динамику олигомеризации Аβ40 в присутствии двух пептидов изучали методом флуо-

ресцентной спектрофотометрии с использованием красителя тиофлавина Т (ThT), который позволяет детектировать образование  $\beta$ -структуры, специфичной для протофибрилл и фибрилл А $\beta$ . Перед добавлением буфера А $\beta$ 40 дезагрегировали так же, как и в других исследованиях, так что содержание олигомеров в начале эксперимента было на самом низком уровне. Ранее мы показали, что синтетический А $\beta$ 40, используемый в этом эксперименте, способен образовывать характерные  $\beta$ -складчатые фибриллы бета-амилоида в водных растворах [41].

Данные флуоресценции, полученные для А $\beta$ 40 в присутствии Р1 или Р2, сравнивали с данными для А $\beta$ 40 в отсутствие пептидов (рис. 3). Экспериментальные данные демонстрируют типичную кривую агрегации амилоида с 10-часовой лаг-фазой, в которой не происходит изменения флуоресценции (фаза нуклеации). За ней следует 6-часовая фаза элонгации, в которой образование амилоидных протофибрилл и фибрилл проявляется увеличением флуоресценции ThT. Явное существование лаг-фазы означает отсутствие амилоидных фибрилл в наших начальных препаратах. Во время фазы элонгации флуоресценция ThT увеличивалась в 15 раз в растворе чистого А $\beta$ 40. В присутствии Р1 флуоресценция ThT увеличивалась менее чем в 2 раза, следовательно, данный пептид ингибировал процесс образования фибрилл А $\beta$ 40 более чем на 90%. В присутствии Р2 флуоресценция ThT также была ниже, чем в отсутствие пептидов, но заметно выше, чем в присутствии Р1. Пептид Р2 подавлял образование протофибрилл и фибрилл А $\beta$ 40 только на 50%.

Влияние пептидов на олигомеризацию А $\beta$ 40, изученное методом ДРС, показало, что Р1, который обладает защитной активностью на живот-

ных и клеточных моделях БА, значительно ингибирует процесс олигомеризации А $\beta$ 40 в растворе, в то время как неактивный укороченный фрагмент (65–76) (Р2) практически не оказывает такого действия. Одновременно в исследовании с помощью ThT было показано, что Р1 ингибирует образование фибрилл А $\beta$ 40 более чем на 90%. Эффект Р2 был намного меньше. Следует отметить, что с помощью флуоресценции ThT можно выявить только  $\beta$ -структуры фибрилл, в отличие от анализа методом ДРС, который позволяет идентифицировать весь спектр олигомеров. Следовательно, только метод ДРС отражает объективное различие в способности Р1 и Р2 ингибировать процесс олигомеризации А $\beta$ .

**Флуоресцентное титрование фрагментов RAGE с помощью А $\beta$ 40.** Для того чтобы найти объяснение различного влияния пептидов Р1 и Р2 на олигомеризацию А $\beta$ 40, мы решили исследовать прямую способность их связывания с А $\beta$ . Для этого проводили флуоресцентное титрование обоих пептидов при помощи А $\beta$ 40. Входящий в состав пептидов триптофан изменяет свою флуоресценцию в момент связывания пептида с лигандом, поэтому его удобно использовать как источник флуоресценции при титровании [42]. Это позволило избежать введения флуоресцентной метки и таким образом сохранить нативные свойства пептидов. Концентрация Р1, который содержит два остатка Тгр, составляла 0.5 мкМ, а концентрация Р2, имеющего только один остаток Тгр, – 2 мкМ для усиления сигнала. Раствор А $\beta$ 40, как и в предыдущих экспериментах, предварительно готовили в условиях, минимизирующих содержание олигомеров в растворе. Начальная концентрация А $\beta$ 40 составляла 200 нМ. Данные экспериментов по флуоресценции были представлены в виде графика отношения  $1/\Delta F$  по сравнению с  $1/[S]$ , где  $[S]$  – концентрация А $\beta$ 40 в кювете,  $\Delta F$  – разница между измерениями интенсивности в отсутствие А $\beta$ 40 и в присутствии А $\beta$ 40 с определенной концентрацией (рис. 4).

Были вычислены константы диссоциации: для Р1  $K_d = 1.41 \pm 0.29$  мкМ (рис. 4а), для Р2  $K_d = 0.51 \pm 0.08$  мкМ (рис. 4б). Результаты флуоресцентного титрования в настоящем исследовании показали, что оба пептида образуют комплексы с А $\beta$ 40, причем, как следует из рассчитанных  $K_d$ , Р2 образует с А $\beta$ 40 даже более стабильный комплекс, чем Р1. Очевидно, что метод флуоресцентного титрования не может объяснить различную способность пептидов ингибировать олигомеризацию А $\beta$ . Интересно, что в работе Камунина et al. [33] по результатам флуоресцентного титрования Р2 не связывался с А $\beta$ 40, тогда как  $K_d$  для Р1 была практически идентична значению, полученному в настоящем исследовании. Вероятно, это связано с тем, что А $\beta$ 40 не подвергался дезагрегации в рабо-

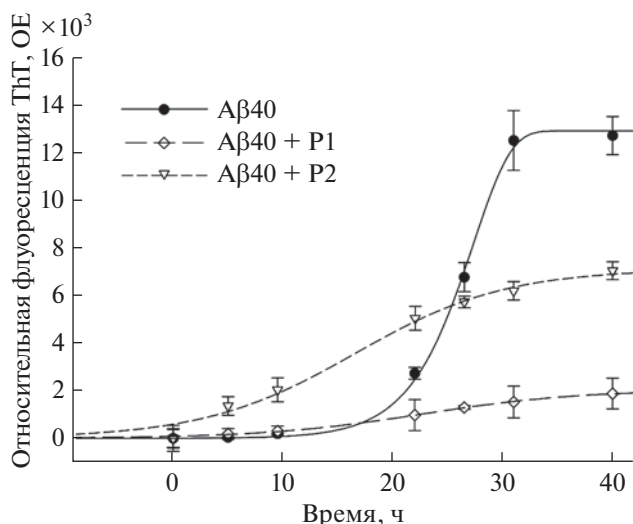
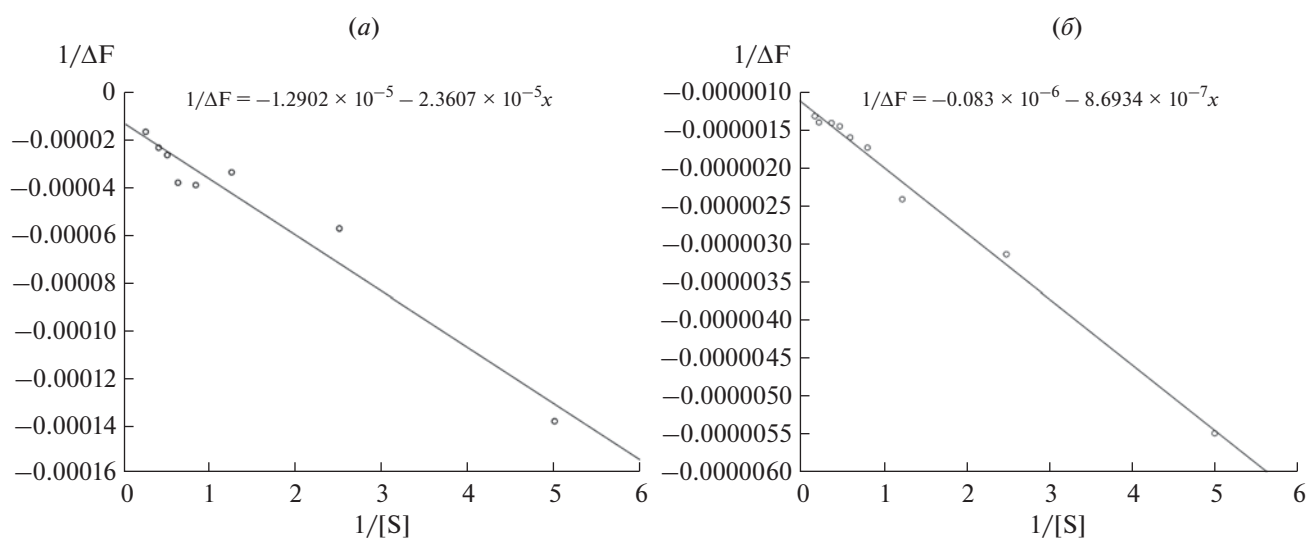


Рис. 3. Кинетика образования фибрилл А $\beta$ 40.



**Рис. 4.** Флуоресцентное титрование пептидов с помощью Аβ40: (а) – Р1 в концентрации 0.5 мкМ; (б) Р2 в концентрации 2 мкМ. Кривые изменения интенсивности флуоресценции триптофана  $1/[\Delta F]$  в зависимости от концентрации  $1/[S]$  Аβ40 при измерении на длине волны 520 нм. Показаны результаты одного из пяти независимых экспериментов.

те Камупина et al. [33]. Возможно, Р2 образует комплексы только с мономерами-тетрамерами Аβ40, но не может связываться с олигомерами. В то же время Р1 способен связываться с любой формой Аβ40. Эти результаты демонстрируют, что связывания пептида с мономерами-тетрамерами Аβ40 недостаточно для ингибирования образования крупных олигомеров и фибрилл. Вероятно, для подавления олигомеризации требуется также связывание пептида с малыми и средними олигомерами.

Все результаты, полученные в данной работе, объединены в табл. 1.

В последнем столбце табл. 1 представлены ранее полученные данные тестирования пространственной памяти у мышей, подвергнутых обонятельной бульбэктомии (БЭ) после интраназального введения Р1 или Р2 [32]. Из табл. 1 видно, что защитную активность проявляет только Р1, который способен ингибировать процесс олигомеризации Аβ, что показано двумя методами – по изменению флуоресценции ThТ и с помощью ДРС. В то же время способность пептидов Р1 и Р2 ингибировать олигомеризацию Аβ не коррелирует с их связыванием с мономерным/тетрамерным Аβ40.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Синтез пептидов.** Фрагменты RAGE человека (Q15109, UniProtKB/SwissProt) и Аβ40 человека (P05067.3, UniProtKB/Swiss-Prot) были синтезированы твердофазным методом на полимере Ванга с использованием Fmoc/But-схемы и очищены с помощью ВЭЖХ, как описано ранее [32, 41]. Гомогенность пептидов составляла >95%.

**Дезагрегация бета-амилоида (1–40).** Лиофилизированный синтетический Аβ40 растворяли в 1,1,1,3,3,3-гексафторпропан-2-оле (HFIP) (99%; Sigma-Aldrich, США) в концентрации 1 мг/мл и разделяли на аликвоты. HFIP выпаривали в потоке газообразного аргона, пептидную пленку растворяли в DMSO (Sigma-Aldrich, США) до конечной концентрации 20 мг/мл. Этот раствор энергично встряхивали и выдерживали при  $-20^{\circ}\text{C}$  в течение 12 ч перед добавлением буфера.

**Формирование олигомеров и фибрилл Аβ40.** К 250 мкг Аβ40 в 12.5 мкл DMSO добавляли 1850 мкл буфера (20 мМ Tris-HCl, 100 мМ NaCl, pH 7.4) и сразу же встряхивали в течение 30 с. Для приготовления смеси Аβ40 и одного из фрагментов RAGE 200 мкг Р1 либо 140 мкг Р2 растворяли в 1850 мкл буфера и добавляли к 250 мкг Аβ40 в DMSO, после чего встряхивали в течение 30 с. Образцы перемешивали при  $37^{\circ}\text{C}$  в течение 40 ч.

**Динамическое светорассеяние.** Измерения динамического рассеяния света (ДРС) проводили на анализаторе Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd, Великобритания) с использованием лазерного источника с  $\lambda = 633$  нм и детекции при угле рассеяния  $173^{\circ}$ . Образцы получали из дезагрегированного Аβ40 или дезагрегированного Аβ40, инкубированного в условиях образования олигомеров и фибрилл с пептидами или без них. В кювету ДРС перенесли 100 мкл полученного раствора на 20 мин. Данные рассеяния света были проанализированы для оценки распределения частиц по размерам и их усредненного по  $z$  гидродинамического диаметра ( $d_h$ ) с применением уравнения Стокса–Эйнштейна, предполагающего сферическую форму частиц.

**Анализ фибриллогенеза A $\beta$ 40 с использованием тиофлавина Т.** Образование фибрилл A $\beta$ 40 отслеживали по связыванию тиофлавина Т [43] с помощью флуоресцентного планшетного ридера Clariostar Plus (BMG LABTECH, Германия). Раствор A $\beta$ 40 или A $\beta$ 40 в смеси с одним из пептидов объемом 75 мкл отбирали в указанное время и смешивали с 25 мкл 50 мкМ раствора ThT в лунках планшета из черного полистирола (SPL) для обнаружения флуоресценции тиофлавина Т. Конечная концентрация A $\beta$ 40 составляла 25 мкМ, пептидов – 50 мкМ, ThT – 12.5 мкМ. Флуоресценцию образцов измеряли при  $\lambda_{\text{возб}} = 450$  нм,  $\lambda_{\text{исп}} = 486$  нм. В каждый момент времени из каждого раствора отбирали по четыре аликвоты, затем их добавляли в лунки планшета и измеряли флуоресценцию ThT в каждой лунке не менее четырех раз на разной высоте. Вычитали фоновую флуоресценцию буфера. В каждой точке рассчитывали среднее значение и стандартную ошибку среднего (SEM).

**Флуоресцентное титрование.** Флуоресцентное титрование синтетических пептидов проводили, как описано ранее [33]. Концентрация пептида P1 составляла 0.5 мкМ, пептида P2 – 2 мкМ. К ним добавляли дезагрегированный A $\beta$ 40, предварительно растворенный в DMSO, в увеличивающихся концентрациях: 200, 400, 800, 1200, 1600, 2000, 2500, 3000, 4000 и 5000 нМ. Максимум интенсивности флуоресценции обнаружен при 355 нм. В программе Statistica 10 (StatSoft, США) набор интенсивностей был представлен на графике с координатами  $1/[S]$  относительно  $1/\Delta F$  [42]. Для каждого пептида проводили три независимых измерения константы диссоциации ( $K_d$ ). Значения  $K_d$  представляли, как среднее  $\pm$  стандартная ошибка среднего.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В проведенных исследованиях выявлено, что биологически активный синтетический фрагмент (60–76) RAGE оказывает влияние на процесс олигомеризации A $\beta$ . Методами динамического светорассеяния и анализа флуоресценции тиофлавина Т показано, что пептид (60–76), оказывающий протективное действие на пространственную память мышей в экспериментальных моделях болезни Альцгеймера, значительно подавляет образование олигомеров и фибрилл A $\beta$ 40. Неактивный укороченный фрагмент (65–76) этого пептида такой способностью не обладает. В то же время ингибирование олигомеризации A $\beta$  пептидами (60–76) и (65–76) и их защитная активность не коррелируют со связыванием пептидов с мономерным/тетрамерным A $\beta$ 40.

Таким образом, нами получено подтверждение гипотезы о том, что протективная активность синтетического пептида (60–76) RAGE связана с

его способностью ингибировать образование токсичных олигомеров A $\beta$ . Выявлен один из возможных механизмов реализации протективного действия пептида (60–76), перспективного для разработки терапии болезни Альцгеймера.

### ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 19-04-00624).

### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей и использованием животных в качестве объектов.

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Glener G.G., Wong C.W.* // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1984. V. 120. P. 885–890. [https://doi.org/10.1016/s0006-291x\(84\)80190-4](https://doi.org/10.1016/s0006-291x(84)80190-4)
2. *Hardy J.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1997. V. 94. P. 2095–2097. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.6.2095>
3. *Hardy J.A., Higgins G.A.* // Science. 1992. V. 256. P. 184–185. <https://doi.org/10.1126/science.1566067>
4. *Masters C.L., Simms G., Weinman N.A., Multhaup G., Mcdonald B.L., Beyreuther K.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1985. V. 82. P. 4245–4249. <https://doi.org/10.1073/pnas.82.12.4245>
5. *Selkoe D.J.* // J. Neuropathol. Exp. Neurol. 1994. V. 53. P. 438–447. <https://doi.org/10.1097/00005072-199409000-00003>
6. *Gandy S., Simon A.J., Steele J.W., Lublin A.L., Lah J.J., Walker L.C., Levey A.I., Krafft G.A., Levy E., Checler F., Glabe C., Bilker W.B., Abel T., Schmeidler J., Ehrlich M.E.* // Ann. Neurol. 2010. V. 68. P. 220–230. <https://doi.org/10.1002/ana.22052>
7. *Kayed R., Lasagna-Reeves C.A.* // Alzheimer's Disease: Advances for a New Century. 2013. V. 3. P. 67–78. <https://doi.org/10.3233/978-1-61499-154-0-67>
8. *Klein W.L., Krafft G.A., Finch C.E.* // Trends Neurosci. 2001. V. 24. P. 219–224. [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(00\)01749-5](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(00)01749-5)
9. *Harper J.D., Wong S.S., Lieber C.M., Lansbury P.T.* // Chem. Biol. 1997. V. 4. P. 119–125. [https://doi.org/10.1016/S1074-5521\(97\)90255-6](https://doi.org/10.1016/S1074-5521(97)90255-6)
10. *Hartley D.M., Walsh D.M., Ye C.P.P., Diehl T., Vasquez S., Vassilev P.M., Teplow D.B., Selkoe D.J.* // J. Neurosci. 1999. V. 19. P. 8876–8884. <https://doi.org/10.1523/Jneurosci.19-20-08876.1999>
11. *Lambert M.P., Barlow A.K., Chromy B.A., Edwards C., Freed R., Liosatos M., Morgan T.E., Rozovsky I., Trommer B., Viola K.L., Wals P., Zhang C., Finch C.E.,*

- Krafft G.A., Klein W.L. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1998. V. 95. P. 6448–6453.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.95.11.6448>
12. Nilsberth C., Westlind-Danielsson A., Eckman C.B., Condrón M.M., Axelman K., Forsell C., Sten C., Luthman J., Teplow D.B., Younkin S.G., Naslund J., Lannfelt L. // Nat. Neurosci. 2001. V. 4. P. 887–893.  
<https://doi.org/10.1038/Nn0901-887>
  13. Oda T., Wals P., Osterburg H.H., Johnson S.A., Pasinetti G.M., Morgan T.E., Rozovsky I., Stine W.B., Snyder S.W., Holzman T.F., Krafft G.A., Finch C.E. // Exp. Neurol. 1995. V. 136. P. 22–31.  
<https://doi.org/10.1006/exnr.1995.1080>
  14. Walsh D.M., Hartley D.M., Kusumoto Y., Fezoui Y., Condrón M.M., Lomakin A., Benedek G.B., Selkoe D.J., Teplow D.B. // J. Biol. Chem. 1999. V. 274. P. 25945–25952.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.274.36.25945>
  15. Walsh D.M., Klyubin I., Fadeeva J.V., Cullen W.K., Anwyl R., Wolfe M.S., Rowan M.J., Selkoe D.J. // Nature. 2002. V. 416. P. 535–539.  
<https://doi.org/10.1038/416535a>
  16. Walsh D.M., Lomakin A., Benedek G.B., Condrón M.M., Teplow D.B. // J. Biol. Chem. 1997. V. 272. P. 22364–22372.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.272.35.22364>
  17. Banks W.A. // Immunotherapy. 2010. V. 2. P. 1–3.  
<https://doi.org/10.2217/Imt.09.72>
  18. Lue L.F., Walker D.G., Brachova L., Beach T.G., Rogers J., Schmidt A.M., Stern D.M., Du Yan S. // Exp. Neurol. 2001. V. 171. P. 29–45.  
<https://doi.org/10.1006/exnr.2001.7732>
  19. Miller M.C., Tavares R., Johanson C.E., Hovanesian V., Donahue J.E., Gonzalez L., Silverberg G.D., Stopa E.G. // Brain Res. 2008. V. 1230. P. 273–280.  
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2008.06.124>
  20. Yan S.D., Chen X., Fu J., Chen M., Zhu H.J., Roher A., Slattery T., Zhao L., Nagashima M., Morser J., Migheli A., Nawroth P., Stern D., Schmidt A.M. // Nature. 1996. V. 382. P. 685–691.  
<https://doi.org/10.1038/382685a0>
  21. Yan S.D., Zhu H.J., Fu J., Yan S.F., Roher A., Tourtelotte W.W., Rajavashisth T., Chen X., Godman G.C., Stern D., Schmidt A.M. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1997. V. 94. P. 5296–5301.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.94.10.5296>
  22. Leclerc E., Fritz G., Vetter S.W., Heizmann C.W. // Biochim. Biophys. Acta. 2009. V. 1793. P. 993–1007.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2008.11.016>
  23. Walker D., Lue L.F., Paul G., Patel A., Sabbagh M.N. // Expert Opin. Investig. Drugs. 2015. V. 24. P. 393–399.  
<https://doi.org/10.1517/13543784.2015.1001490>
  24. Cai Z.Y., Liu N.N., Wang C.L., Qin B.Y., Zhou Y.J., Xiao M., Chang L.Y., Yan L.J., Zhao B. // Cell. Mol. Neurobiol. 2016. V. 36. P. 483–495.  
<https://doi.org/10.1007/s10571-015-0233-3>
  25. Pugazhenti S., Qin L.M., Reddy P.H. // Biochim. Biophys. Acta. 2017. V. 1863. P. 1037–1045.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2016.04.017>
  26. Fang F., Lue L.F., Yan S.Q., Xu H.W., Luddy J.S., Chen D., Walker D.G., Stern D.M., Yan S.F., Schmidt A.M., Chen J.X., Yan S.S. // FASEB J. 2010. V. 24. P. 1043–1055.  
<https://doi.org/10.1096/fj.09-139634>
  27. Mao Y.X., Cai W.J., Sun X.Y., Dai P.P., Li X.M., Wang Q., Huang X.L., He B., Wang P.P., Wu G., Ma J.F., Huang S.B. // Cell Death Dis. 2018. V. 9. P. 674.  
<https://doi.org/10.1038/S41419-018-0718-3>
  28. Deane R., Singh I., Sagare A.P., Bell R.D., Ross N.T., LaRue B., Love R., Perry S., Paquette N., Deane R.J., Thiagarajan M., Zarcone T., Fritz G., Friedman A.E., Miller B.L., Zlokovic B.V. // J. Clin. Invest. 2012. V. 122. P. 1377–1392.  
<https://doi.org/10.1172/JCI58642>
  29. Sturchler E., Galichet A., Weibel M., Leclerc E., Heizmann C.W. // J. Neurosci. 2008. V. 28. P. 5149–5158.  
<https://doi.org/10.1523/Jneurosci.4878-07.2008>
  30. Koroëv D.O., Volpina O.M., Volkova T.D., Kamynina A.V., Samokhin A.N., Filatova M.P., Bobkova N.V. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2019. V. 45. P. 361–365.  
<https://doi.org/10.1134/S1068162019050054>
  31. Volpina O.M., Koroëv D.O., Volkova T.D., Kamynina A.V., Filatova M.P., Zaporozhskaya Y.V., Samokhin A.N., Aleksandrova I.Y., Bobkova N.V. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2015. V. 41. P. 638–644.  
<https://doi.org/10.1134/s1068162015060187>
  32. Volpina O.M., Samokhin A.N., Koroëv D.O., Nesterova I.V., Volkova T.D., Medvinskaya N.I., Nekrasov P.V., Tartarnikova O.G., Kamynina A.V., Balasanyants S.M., Voronina T.A., Kulikov A.M., Bobkova N.V. // J. Alzheimer's Dis. 2018. V. 61. P. 1061–1076.  
<https://doi.org/10.3233/jad-170483>
  33. Kamynina A.V., Esteras N., Koroëv D.O., Bobkova N.V., Balasanyants S.M., Simonyan R.A., Avetisyan A.V., Abramov A.Y., Volpina O.M. // Front. Neurosci. 2018. V. 12. P. 681.  
<https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00681>
  34. Kamynina A., Esteras N., Koroëv D.O., Angelova P.R., Volpina O.M., Abramov A.Y. // J. Cell. Physiol. 2021. V. 236. P. 6496–6506.  
<https://doi.org/10.1002/jcp.30324>
  35. Avetisyan A., Balasanyants S., Simonyan R., Koroëv D., Kamynina A., Zinovkin R., Bobkova N., Volpina O. // Neurochem. Int. 2020. V. 140. P. 104799.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuint.2020.104799>
  36. Koroëv D.O., Volpina O.M., Volkova T.D., Kamynina A.V., Filatova M.P., Balasanyants S.M., Samokhin A.N., Bobkova N.V. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2017. V. 43. P. 150–154.  
<https://doi.org/10.1134/s1068162017020066>
  37. Gravina S.A., Ho L.B., Eckman C.B., Long K.E., Orvos L., Younkin L.H., Suzuki N., Younkin S.G. // J. Biol. Chem. 1995. V. 270. P. 7013–7016.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.270.13.7013>
  38. Iwatsubo T., Odaka A., Suzuki N., Mizusawa H., Nukina N., Ihara Y. // Neuron. 1994. V. 13. P. 45–53.  
[https://doi.org/10.1016/0896-6273\(94\)90458-8](https://doi.org/10.1016/0896-6273(94)90458-8)
  39. Olivero G., Grilli M., Chen J.Y., Preda S., Mura E., Govoni S., Marchi M. // Front. Aging Neurosci. 2014. V. 6. P. 166.  
<https://doi.org/10.3389/Fnagi.2014.00166>
  40. Bitan G., Kirkitadze M.D., Lomakin A., Vollers S.S., Benedek G.B., Teplow D.B. // Proc. Natl. Acad. Sci.



- USA. 2003. V. 100. P. 330–335.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.222681699>
41. Volkova T.D., Koroev D.O., Kamynina A.V., Filatova M.P., Avetisyan A.V., Volpina O.M. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2020. V. 46. P. 217–222.  
<https://doi.org/10.1134/s1068162020020181>
42. Huang Y.K., Chou R.H., Yu C. // J. Biol. Chem. 2016. V. 291. P. 14300–14310.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M116.722215>
43. Levine H. // Protein Sci. 1993. V. 2. P. 404–410.  
<https://doi.org/10.1002/pro.5560020312>

## Protective Fragment of the Receptor for Advanced Glycation End Products Is Able to Inhibit Amyloid Beta Oligomerization

T. D. Volkova<sup>\*,#</sup>, A. V. Avetisyan<sup>\*\*</sup>, D. O. Koroev<sup>\*</sup>, A. V. Kamynina<sup>\*,\*\*\*</sup>, S. M. Balasanyants<sup>\*\*\*\*</sup>, R. A. Simonyan<sup>\*\*</sup>, and O. M. Volpina<sup>\*</sup>

<sup>#</sup>Phone: +7 (495) 336-57-77; e-mail: tdvol@mx.ibch.ru

<sup>\*</sup>Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

<sup>\*\*</sup>Belozersky Research Institute of Physico-Chemical Biology MSU, ul. Leninskie Gory 1/40, Moscow, 119991 Russia

<sup>\*\*\*</sup>Research Center for Molecular Mechanisms of Aging and Age Related Diseases, Moscow Institute of Physics and Technology, Institutskiy per. 9, Dolgoprudny, 141701 Russia

<sup>\*\*\*\*</sup>Department of Biological Sciences, University of Illinois at Chicago, 900 South Ashland Avenue, MBRB 4168, Chicago, Illinois, 60607 USA

It was found earlier that a synthetic fragment (60–76) of the extracellular domain of the receptor for advanced glycation end products (RAGE) has a protective effect in animal and cellular models of Alzheimer's disease. It has been suggested this effect is due to the interaction of the peptide with amyloid beta ( $A\beta$ ), one of the RAGE ligands, by inhibiting the formation of toxic  $A\beta$  oligomers. The aim of this study was to investigate, using physical chemistry methods, the ability of the (60–76) peptide to prevent  $A\beta$ 40 oligomerization in solution in comparison with a non-protective truncated peptide (65–76). The dynamics of the  $A\beta$ 40 fibril formation in the presence of peptides was evaluated using thioflavin-T, the relative sizes of oligomers were determined by dynamic light scattering, the binding of peptides to  $A\beta$ 40 was investigated by fluorescence titration. Using two methods, it has been shown that the protective peptide of the (60–76) RAGE sequence is able to significantly (by more than 90%) suppress the formation of  $A\beta$ 40 oligomers and fibrils, in contrast to the non-protective peptide (65–76). In addition, the ability of peptides to inhibit  $A\beta$ 40 oligomerization and their protective activity do not correlate with their binding to monomeric/tetrameric  $A\beta$ 40. Thus, we obtained *in vitro* confirmation of the hypothesis that the protective activity of the (60–76) RAGE synthetic fragment is related to its ability to inhibit  $A\beta$  oligomerization.

*Keywords:* receptor for advanced glycation end products, synthetic peptides, Alzheimer's disease, amyloid beta, oligomerization