

## ВЛИЯНИЕ ДИПОЛЬНЫХ МОДИФИКАТОРОВ НА КАНАЛООБРАЗУЮЩУЮ АКТИВНОСТЬ АМИЛОИДНЫХ И АМИЛОИДОПОДОБНЫХ ПЕПТИДОВ В ЛИПИДНЫХ БИСЛОЯХ

© С. С. Ефимова,<sup>1,\*</sup> В. В. Захаров,<sup>2,3</sup> О. С. Остроумова<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург,

<sup>2</sup> Петербургский институт ядерной физики

им. Б. П. Константинова НИЦ «Курчатовский институт», Гатчина,

и <sup>3</sup> Санкт-Петербургский государственный политехнический университет;

\* электронный адрес: ssefimova@mail.ru

В работе исследован равновесный трансмембранный ток, индуцированный амилоидными и амилоидоподобными пептидами в модельных мембранах. Показано, что введение в мембраноомывающие растворы дипольного модификатора флоретина приводит к росту мультиканальной активности таких пептидов, как фрагмент 25—35 β-амилоидного пептида, фрагмент 25—35 β-амилоидного пептида с аминокислотной заменой в положении 35, фрагмент 106—126 прионного белка человека, а также амилоидоподобных пептидов туг-BASP1 (1—13), туг-BASP1 (1—19) и GAP-43 (1—40). Установлено, что эффект флоретина не является результатом изменения дипольного потенциала мембраны при адсорбции этого модификатора. Использование набора различных фрагментов β-амилоидного пептида, пресенилина, прионного белка и нейрональных белков BASP1 и GAP-43 и их фрагментов позволило заключить, что равновесный пептидиндуцированный трансмембранный ток при добавке флоретина обусловлен электростатическим взаимодействием между положительно заряженным каналобразующим агентом и отрицательно заряженным дипольным модификатором. Результаты, полученные с помощью электронной микроскопии, свидетельствуют в пользу того, что в результате взаимодействия с флоретином увеличивается степень олигомеризации пептида.

Ключевые слова: бислойные липидные мембраны, амилоидогенные пептиды, дипольные модификаторы, дипольный потенциал мембран.

Принятые сокращения: АβП — β-амилоидный пептид, АβП(1—42) и АβП(25—35) — фрагменты 1—42 и 25—35 АβП, АβП(25—35)-[Gly<sup>35</sup>] — фрагмент 25—35 АβП с аминокислотной заменой Met35Gly, АβП(25—35)-[Ala<sup>28</sup>] — то же с заменой Lys28Ala, ПС-1 — пресенилин-1-N, ПС-2 — пресенилин-2-N, прион (106—126) — фрагмент 106—126 прионного белка человека, ДОФЭ — 1,2-диолеил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламин, ДОФС — 1,2-диолеил-*sn*-глицеро-3-фосфосерин, ДОФХ — 1,2-диолеил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин, ФИФ<sub>2</sub> — L-α-фосфатидилинозитол-4,5-бифосфат.

Нейродегенеративные заболевания — группа в основном медленно прогрессирующих, наследственных или приобретенных заболеваний нервной системы. Общим для этих заболеваний является прогрессирующая гибель нервных клеток. Среди данной группы заболеваний выделяют такие группы, как таупатия (например, болезнь Альцгеймера), синуклеопатия (например, болезнь Паркинсона), тринуклеотидные заболевания (например, хорея Хантингтона), прионные заболевания (например, болезнь Крейтцфельда-Якоба), заболевания мотонейрона (например, боковой амиотрофический склероз).

Болезнь Альцгеймера — нейродегенеративное заболевание, характеризующееся накоплением в тканях мозга бляшек и нейрофибриллярных клубков. Основным компонентом сенильных бляшек β-амилоидный пептид (АβП) — продукт протеолиза белка-предшественника амилоида,

трансмембранного гликопротеина, функции которого пока не выяснены. Ранние формы болезни Альцгеймера связаны с мутациями в белке-предшественнике. Большое количество современных данных свидетельствует в пользу того, что болезнь Альцгеймера представляет собой системное заболевание (Gibson, Huang, 2002). Действительно, амилоидные пептиды в значительных количествах накапливаются в сосудах мозга, вызывая повреждение эндотелия капилляров, уменьшают скорость кровотока и снабжение мозга глюкозой и кислородом (Aliev et al., 2003). Клинический диагноз болезни Альцгеймера ставится в результате анализа аутопсийного материала по наличию в тканях мозга сенильных бляшек, содержащих нерастворимые АβП, и нейрофибриллярных клубков, состоящих из гиперфосфорилированного τ-белка (Haass, Selkoe, 2007). Способов прижизненной диагностики, тем

более до начала развития заболевания, в настоящий момент не существует, хотя АβП и τ-белок обсуждаются в качестве потенциальных маркеров болезни Альцгеймера.

Комплексный статистический анализ показывает, что скопления фрагмента АβП среднего размера в нейронах приводит к гибели нервных клеток, образуя поры в их мембранах, а более мелкие агрегаты и длинные фибриллы АβП, по-видимому, выполняют защитную функцию для нейронов (Prangko et al., 2012). Основными и наиболее изученными представителями АβП являются фрагменты 1—42, 1—40 и 25—35 с мол. массами около 4.5, 4.0 и 1.0 кДа соответственно. Показано, что эти амилоидные пептиды формируют ионные каналы в модельных бислоиных липидных мембранах (Arispe et al., 1993a, 1993b, 1996; Mirzabekov et al., 1994; Hirakura et al., 1999). Показано, что фрагмент 1—40 АβП в модельных липидных мембранах формирует потенциалнезависимые ионные каналы преимущественно катионной селективности (Arispe et al., 1993b). Проводимость каналов варьирует в диапазоне от 50 до 4000 пСм (Arispe et al., 1993a). Другие авторы продемонстрировали аналогичные каналобразующие свойства фрагмента 1—42 АβП (Hirakura et al., 1999; Demigo et al., 2011). С помощью методов молекулярной динамики была создана модель канала, образованного фрагментом 1—42 АβП, и показано, что подсостояния проводимости канала образованы за счет изменения степени олигомеризации мономеров амилоидного пептида в канале (Durell et al., 1994). Кроме того, показано, что в бислоиных липидных мембранах фрагмент 25—35 АβП формирует потенциалзависимые ионные каналы катионной селективности (Mirzabekov et al., 1994).

Пресенилины (ПС) — это белки с мол. массой 50 кДа, содержащие 9 трансмембранных доменов (Laudon et al., 2005; Spasic et al., 2006). Согласно данным из литературы, пресенилин-1 и пресенилин-2 функционируют как гамма-секретаза, т. е. обладают протеазной активностью, которая необходима для образования нейротоксичных АβП из белка-предшественника (De Strooper et al., 1998; Wolfe et al., 1999; Nelson et al., 2007). У некоторых пациентов с болезнью Альцгеймера отмечают мутации в ПС-1 и ПС-2, в результате чего усиливается синтез АβП. С помощью анализа шума показано, что среднее значение тока, протекающего через ионные каналы, образованные ПС-1 и ПС-2, в среднем равно 40 и 30 фА соответственно (Nelson et al., 2007).

Прионы — это низкомолекулярные белки с мол. массой 27—30 кДа, которые выделены в особый класс инфекционных агентов, вызывающих тяжелые заболевания центральной нервной системы у человека и ряда животных. В настоящее время к прионным болезням относятся такие болезни, как болезнь Крейтцфельда—Якоба, синдром Герстманна—Штреуселера—Шейнкера, смертельная семейная бессонница и заболевание «куру». В липидных бислоях фрагмент 106—126 прионного белка образует катион-селективные ионные каналы многоуровневой проводимости от 20 до 60 пСм (Lin et al., 1997).

Известно, что нейрональные белки BASP1 (NAP-22 и CAP-23) и GAP-43 (neuromodulin), которые не ассоциированы ни с одной из нейродегенеративных патологий, образуют олигомеры, которые по своим физико-химическим свойствам сходны с олигомерами, формируемыми амилоидогенными белками и пептидами (Zakharov, Mosevitsky, 2010). BASP1 и GAP-43 — кислые белки с мол. массой 23—25 кДа и высоким содержанием заряженных аминокислотных остатков локализованы на внутренней

поверхности плазматической мембраны аксонных окончаний. По своим физико-химическим, биохимическим и функциональным характеристикам белки BASP1 и GAP-43 очень похожи, хотя их аминокислотные последовательности не имеют гомологии. Они известны как маркеры развития, регенерации и синаптической пластичности нервной системы (Oestreich et al., 1997; Frey et al., 2000; Mosevitsky, 2005). В развивающейся нервной системе BASP1 и GAP-43 локализованы на плазматической мембране конусов роста аксонов, а в зрелых нейронах — на пресинаптической мембране. В зрелом мозге белки участвуют в контроле освобождения нейромедиатора и процессах синаптической пластичности. Остроумова с соавторами (Ostroumova et al., 2011) показали, что в отличие от GAP-43 олигомеры BASP1 в плоских липидных бислоях формируют потенциалнезависимые катион-селективные ионные каналы. Фрагменты myr-BASP1 (1—13) и myr-BASP1 (1—19), содержащие на N-конце остаток миристиновой кислоты, а также фрагмент GAP-43 (1—40) содержат участки, определяющие агрегационные свойства этих белков, и образуют *in vitro* амилоидоподобные олигомеры и фибриллы (Витюк и др., 2013).

В ряде работ с успехом продемонстрировано, что дипольные модификаторы мембран (флавоноиды и некоторые биологические красители) могут быть использованы в качестве инструментов для изучения молекулярных механизмов формирования и функционирования ионных каналов, образованных различными токсинами и антимикробными агентами (Sun, Garlid, 1992; Rokitskaya et al., 2002; Hwang et al., 2003; Luchian, Mereuta, 2006; Ostroumova et al., 2007a, 2007b, 2010, 2011a, 2011b, 2012a, 2012b, 2014; Asandei et al., 2008; Mereuta et al., 2008, 2011; Apetrei et al., 2009; Lundbaek et al., 2010; Efimova et al., 2014).

В настоящей работе дипольные модификаторы использовали в качестве инструментов для исследования каналобразующей активности амилоидогенных (фрагментов АβП, пресенилинов и прионного белка) и амилоидоподобных пептидов (нейрональных белков BASP1 и GAP-43 и их фрагментов) и выяснения молекулярных механизмов их формирования и функционирования.

## Материал и методика

В работе использовали следующие реактивы: 1,2-диолеил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (ДОФХ), 1,2-диолеил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламин (ДОФЭ), 1,2-диолеил-*sn*-глицеро-3-фосфосерин (ДОФС), L-α-фосфатидилинозитол-4,5-бифосфат (ФИФ<sub>2</sub>) и холестерин (Avanti Polar Lipids, США); флоретин, флоридин, генистеин, кверцетин, 2',4',6'-тригидрокси-ацетофенон моногидрат (ТГАФ), тиофлавин Т, наоактин, КС1, НЕРЕС, МЕС, пентан, этанол, хлороформ и гексадекан (Sigma, США); RH237 и RH421 (Molecular Probes, США); фрагменты АβП 1—42, 25—35, фрагмент 25—35 с аминокислотной заменой в положении 35 (АβП(25—35)-[Gly<sup>35</sup>]) или 28 (АβП(25—35)-[Ala<sup>28</sup>]), пресенилин-1-N (ПС-1) и фрагмент 106—126 прионного белка человека (прион (106—126)) (Sigma, США). Белки BASP1, GAP-43 и GAP-43-3 были выделены из мозга коровы, как описано ранее (Zakharov, Mosevitsky, 2010). Пептиды myr-BASP1 (1—13), myr-BASP1 (1—19) и GAP-43 (1—40) были от фирмы GenicBio Limited (КНР).

Формирование липидных бислоиных мембран и измерение их электрических пара-

метров. Формирование мембран проводили по методу Монталла и Мюллера (Montall, Mueller, 1972) путем сведения конденсированных липидных монослоев на отверстии в тефлоновой пленке, разделяющей экспериментальную камеру на два (*цис*- и *транс*-) отделения. Объем каждого отделения составлял 1.5 мл, толщина тефлоновой пленки — 10 мкм, диаметр отверстия — около 50 мкм. Перед началом процесса формирования бислоев отверстие в тефлоновой пленке обрабатывали раствором гексадекана. Монослой формировали на границе вода—воздух из раствора липида в пентане (1 или 2 мг/мл). Для формирования монослоев использовали липидные смеси ДОФС/ДОФЭ в эквимолярном соотношении и ДОФХ/холестерин/ФИФ<sub>2</sub> в молярном соотношении 62/33/5. Измерение каналообразующей активности амилоидогенных пептидов проводили при одинаковом ионном составе водных растворов электролита (0.1 М KCl), pH растворов 7.4 или 4.0 поддерживали буферной смесью 5 мМ HEPES или MES соответственно.

Каналообразующие пептиды добавляли к водной фазе *цис*-отделения камеры из водного раствора до конечных концентраций в диапазоне 10—400 мкМ. Флавоноиды (флоретин, флорицин, генистеин, кверцетин и ТГАФ) вводили в оба отделения камеры из миллимолярных растворов в этаноле до конечной концентрации в околосмембранных растворах 20 мкМ, стироловые красители (RH237 и RH421) — до концентрации 5 мкМ, а маркер амилоидных фибрилл тиофлавин Т — до концентрации 10 мкМ. Электрофизиологические измерения проводили при комнатной температуре.

Измерения и оцифровку трансмембранных токов проводили в режиме фиксации потенциала с помощью Axopatch 200B и Digidata 1440A (Axon Instruments, США). Обработку записей трансмембранных токов осуществляли с использованием программного пакета Clampfit 9.0 (Axon Instruments, США). Использовали 8-полярный фильтр Бесселя (Model 9002, Frequency Devices, США) и частоту фильтрации 1 кГц. Статистический анализ полученных данных проводили при помощи программы Origin 8.0 (OriginLab, США). Среднее отношение ( $I_{\infty}/I_{\infty}^0$ ) равновесного интегрального трансмембранного тока, индуцированного каналообразующим пептидом в присутствии ( $I_{\infty}$ ) и в отсутствие дипольного модификатора ( $I_{\infty}^0$ ), определяли как среднее арифметическое значение и его стандартное отклонение при измерении  $I_{\infty}/I_{\infty}^0$  от 3 до 9 бислоев.

Определение изменения дипольного потенциала мембран ( $\Delta\phi_d$ ). При измерении  $\Delta\phi_d$  мембраны формировали в 0.1 М растворах KCl при pH 7.4 (5 мМ HEPES). Ионофор нонактин из раствора в этаноле добавляли к водной фазе обоих отделений камеры до конечной концентрации  $10^{-7}$ — $10^{-6}$  М. Флавоноиды вводили в оба отделения камеры из миллимолярных растворов в этаноле до конечной концентрации в диапазоне от 2.5 до 100.0 мкМ. Тиофлавин Т вводили в оба отделения камеры из миллимолярных растворов в этаноле до конечной концентрации в диапазоне от 1 до 100 мкМ. Конечная концентрация этанола в камере не превышала 0.1 %. В такой концентрации растворитель не нарушает целостности и стабильности липидных бислоев. В отсутствие ионофоров используемые модификаторы в указанных концентрациях не влияют на проводимость липидных бислоев.

Проводимость мембраны ( $G$ ) определяли как отношение среднего тока, протекающего через бислоюную липидную мембрану ( $I$ ), к трансмембранному потенциалу

( $V$ ), равному 50 мВ. Изменение дипольного потенциала при введении в мембраноомывающие растворы флавоноидов определяли по формуле

$$\frac{G_m}{G_m^0} = \exp\left(\frac{F\Delta\phi_d}{RT}\right), \quad (1)$$

где  $G_m^0$  и  $G_m$  — значения равновесной  $K^+$ -проводимости бислоя, обусловленной нонактином, до и после введения флавоноида;  $F$  — число Фарадея (96 485 Кл/моль);  $R$  — универсальная газовая постоянная (8.31 Дж/(моль · К));  $T$  — термодинамическая температура (294 К) (Andersen et al., 1976).

Средние величины изменения дипольного потенциала мембран определяли как средние арифметические значения  $\Delta\phi_d$  и их стандартные отклонения для каждой из экспериментальных систем при измерении от 3 до 7 бислоев.

Электронную микроскопию применяли для определения влияния дипольных модификаторов на степень олигомеризации амилоидов и амилоидоподобных пептидов. Препараты готовили на медных сетках (200 меш), покрытых формвар-углеродной пленкой (EMS, США) и обработанных в тлеющем разряде. Сетку помещали на каплю (15 мкл) раствора пептида с концентрацией 300—500 мкМ в 10 мМ Na-фосфатном буфере, pH 7.3, в отсутствие или в присутствии флоретина и оставляли на 2 ч при 37 °С. После этого сетку промывали водой 3 раза по 20 с и окрашивали 1%-ным уранил-ацетатом (Serva, Германия) в течение 1 мин. Образцы исследовали на просвечивающем электронном микроскопе JEM-2100 (JEOL, Япония).

## Результаты и обсуждение

Введение фрагмента 25—35 АβП в раствор *цис*-отделения экспериментальной камеры и последующее приложение трансмембранной разности потенциалов ( $V$ ) приводят к росту трансмембранной проводимости, обусловленной образованием ионных каналов. Пример записи флуктуаций трансмембранного тока, протекающего через модифицированную АβП(25—35) мембрану ДОФС/ДОФЭ, приведен на рис. 1. На рисунке видно, что при фиксированном значении трансмембранного потенциала наблюдаются ионные каналы различной проводимости. Принято считать, что многоуровневая проводимость амилоидных каналов обусловлена различной степенью олигомеризации АβП при формировании ионпроводящих пор (Arispe et al., 1993a, 1993b, 1996a, 1996b; Mirzabekov et al., 1994). Число подуровней проводимости амилоидных каналов в условиях эксперимента неконтролируемо, что не позволяет проанализировать влияние дипольных модификаторов на свойства одиночных амилоидных каналов. Поэтому нами были проведены исследования влияния дипольных модификаторов только на равновесный интегральный трансмембранный ток, индуцированный АβП(25—35).

Установлено, что добавка флоретина в мембраноомывающие растворы до концентрации 20 мкМ вызывает существенное увеличение равновесного трансмембранного тока ( $I_{\infty}$ ), индуцированного фрагментом АβП(25—35) в бислоях ДОФС/ДОФЭ (рис. 2, а). При этом влияния других флавоноидов (флорицина, генистеина, кверцетина и ТГАФ) на  $I_{\infty}$  не установлено. Введение стиролового

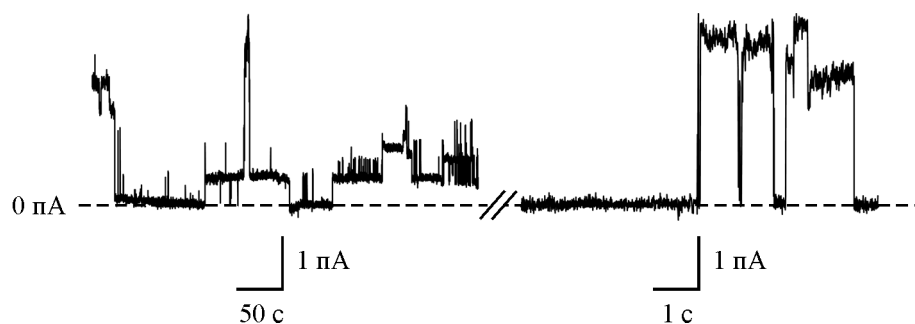


Рис. 1. Записи флуктуаций трансмембранного тока, индуцированного фрагментом АβП (25—25).

Здесь и на рис. 2: мембраны сформированы из эквимольной смеси ДОФС/ДОФЭ и омываются раствором 0.1 М КСl (рН 7.4). Трансмембранное напряжение равно 50 мВ.

красителя RH421 до концентрации 5 мкМ в растворы практически не изменяет  $I_{\infty}$  (рис. 2, б). Другой стириловый краситель — RH237 — и маркер амилоидных фибрилл тиофлавин Т мультисканальную активность АβП(25—35) в этих мембранах тоже не модифицируют. Среднее отношение равновесного трансмембранного тока, индуцированного АβП(25—35), после и до введения различных модификаторов ( $I_{\infty}/I_{\infty}^0$ ) при трансмембранном напряжении 50 мВ резюмировано в табл. 1.

Учитывая литературные сведения о том, что флавоноиды уменьшают дипольный потенциал дифитаноил-фосфохолиновых (ДФФХ) мембран (Efimova, Ostroumova, 2012), можно предположить, что наблюдаемые изменения каналобразующей активности АβП(25—35) при введении флоретина обусловлены варьированием дипольного потенциала мембран ДОФС/ДОФЭ. В табл. 1 также представлены величины изменения дипольного потенциала бислоев ДОФС/ДОФЭ в присутствии в мембраноомывающих растворах других тестируемых дипольных модификаторов. Так, введение в мембраноомывающие растворы флоретина приводит к уменьшению дипольного потенциала мембран на 90 мВ (Efimova et al., 2014), а кверцетина, флоридина и генистеина — на 50, 40 и 30 мВ соответственно. При этом ТГАФ и тиофлавин Т практически не изменяют величину  $\phi_d$  мембран ДОФС/ДОФЭ (среднее значение  $\Delta\phi_d = 0 \pm 5$  мВ). Добавка в околосмембранные растворы стириловых красителей серии RH приводит к существенному росту дипольного потенциала от-

рицательно заряженных фосфолипидных мембран. Сравнение величин, приведенных в табл. 1, указывает на отсутствие корреляции между влиянием дипольных модификаторов на равновесный трансмембранный ток, индуцированный АβП(25—35), и дипольный потенциал мембран.

При оценке скачка потенциала на границе раздела фаз следует учитывать возможный вклад в диполь-дипольные взаимодействия не только дипольных модификаторов, но и каналобразующего агента. Литературные данные указывают на то, что некоторые амилоидогенные пептиды влияют на величину дипольного потенциала мембран (Sonkina et al., 2010). Нами проанализировано влияние фрагмента АβП(25—35) на  $\phi_d$  и установлено, что этот пептид в концентрации 65 мкМ не изменяет дипольного потенциала отрицательно заряженных фосфолипидных мембран ( $\Delta\phi_d = 0.6 \pm 0.3$  мВ).

Согласно данным литературы, дипольные модификаторы мембран помимо дипольного потенциала бислоя способны влиять на каналобразующую активность антимикробных агентов посредством локального изменения спонтанной кривизны липидного монослоя в области липидного устья пептид-липидных пор (Hwang et al., 2003; Arpetrei et al., 2009). Показано, что увеличение времени жизни и равновесного числа грамицидиновых каналов является результатом встраивания молекул генистеина в область характеризующегося положительной спонтанной кривизной липидного устья грамицидиновой поры (Hwang et al., 2003). Стириловый краситель RH421 влия-

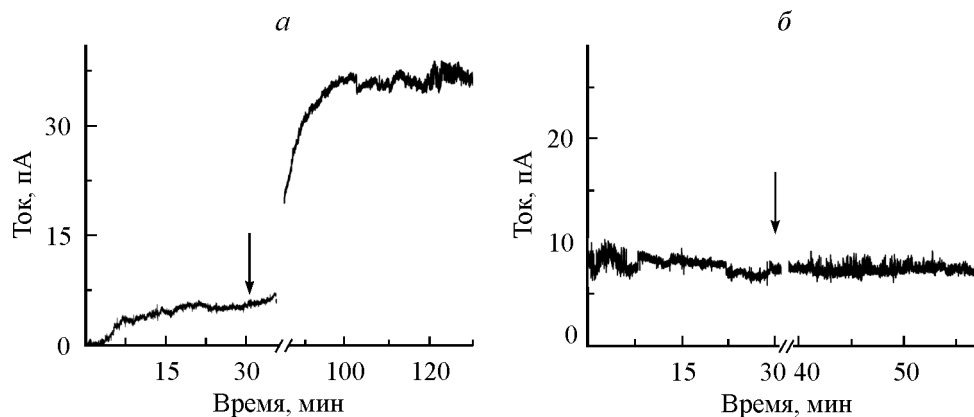
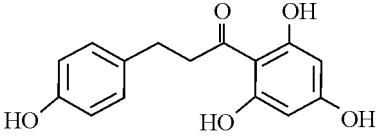
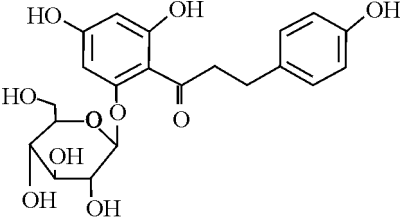
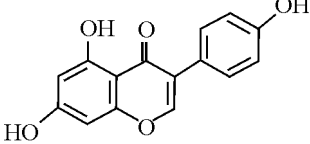
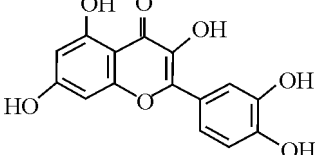
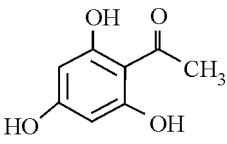
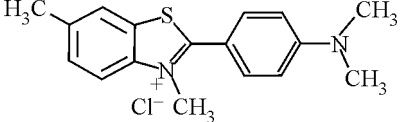
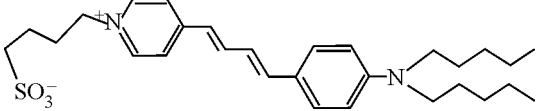
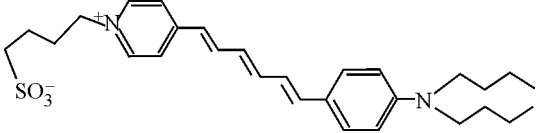


Рис. 2. Влияние дипольных модификаторов флоретина (а) и RH421 (б) на равновесный интегральный трансмембранный ток, индуцированный фрагментом АβП (25—25).

Моменты введения в мембраноомывающие растворы 20 мкМ флоретина и 5 мкМ RH421 указаны стрелками.

Таблица 1

Отношение равновесного трансмембранного тока, индуцированного фрагментом АβП(25—35), в отрицательно заряженных бислоях после и до введения различных дипольных модификаторов ( $I_{\infty}/I_{\infty}^0$ ) и изменение дипольного потенциала мембран, вызванное адсорбцией дипольмодифицирующих агентов

Дипольный модификатор и его концентрация, мкМ	Формула	$I_{\infty}/I_{\infty}^0$	$\Delta\varphi_d$ , мВ
Флоретин, 20		$9.7 \pm 2.8$	$-90 \pm 10^a$
Флоризин, 20		$1.1 \pm 0.1$	$-40 \pm 5$
Генистеин, 20		$1.1 \pm 0.1$	$-30 \pm 4$
Кверцетин, 20		$1.0 \pm 0.2$	$-50 \pm 7$
ТГАФ, 20		$1.1 \pm 0.1$	$-4 \pm 1$
Тиофлавин Т, 10		$1.2 \pm 0.1$	$0 \pm 5$
RH421, 5		$1.0 \pm 0.1$	$60 \pm 10^a$
RH237, 5		$1.2 \pm 0.1$	$100 \pm 5^a$

Примечание. Мембраны сформированы из эквимольной смеси ДОФС/ДОФЭ и омываются 0.1 М КСl (рН 7.4). <sup>a</sup> Взято из: Efimova et al., 2014.

Таблица 2

Отношение равновесного трансмембранного тока, индуцированного амилоидогенным пептидом, в бислоях после и до введения 20 мкМ флоретина ( $I_{\infty}/I_{\infty}^0$ )

Каналообразующий агент	Аминокислотная последовательность	Суммарный заряд молекулы	$I_{\infty}/I_{\infty}^0$
АβП(25—35) <sup>а</sup>	GSNKGAIIGLM	+1	9.7 ± 2.8
АβП(25—35)-[Gly <sup>35</sup> ] <sup>а</sup>	GSNKGAIIGLG	+1	6.1 ± 2.4
АβП(25—35)-[Ala <sup>28</sup> ] <sup>а</sup>	GSNAGAIIGLM	0	1.3 ± 0.2
АβП(1—42) <sup>а</sup>	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA	0	1.6 ± 0.8
ПС-1 <sup>а</sup>	QMSEDNHLSTVRSQNDNR	0	1.0 ± 0.1
Прион (106—126) <sup>а</sup>	KTNMKHMAGAAAAGAVVGGGLG	+3	4.9 ± 3.2
myr-BASP1(1—13) <sup>б</sup>	myr-GGKLSKSKKKGYNV	+5	4.2 ± 3.2
myr-BASP1(1—19) <sup>б</sup>	myr-GGKLSKSKKKGYNVNDEKAK	+5	14.0 ± 7.8
GAP-43(1—40) <sup>б</sup>	MLCCMRRTKQVEKNDDQKIEQDGIKPEDKANKAATKIQA	+1	6.3 ± 3.9
GAP-43-3 <sup>б</sup>	SFRGHITRKKLK...EEREADQEHNA	-21	1.3 ± 0.1
BASP1 <sup>б</sup>	myr-GGKLSKSKKKG...SDQTVAVKE	-22	1.1 ± 0.1

Примечание. Мембраны сформированы из смеси ДОФС/ДОФЭ в соотношении 50/50 (<sup>а</sup>) или смеси ДОФХ/холестерин/ФИФ<sub>2</sub> в молярном соотношении 62/33/5 (<sup>б</sup>) и омываются 0.1 М KCl (pH 7.4).

ет на спонтанную кривизну ДФФХ-монослоя благодаря электростатическому расталкиванию сульфатных групп (Apetrei et al., 2009). Изменение механических свойств мембраны при введении красителя сказывается на каналобразующей активности аламетицина. Поскольку генистеин и RH421 не оказывают влияния на равновесный ток, индуцированный АβП(25—35), можно допустить, что каналобразующая активность этого пептида не зависит от спонтанной кривизны липидного монослоя.

Учитывая, что молекула АβП(25—35) несет положительный заряд, можно предположить, что наблюдаемое изменение каналобразующей активности пептида при адсорбции флоретина является результатом его электростатического взаимодействия с отрицательно заряженной формой дипольного модификатора. Можно думать, что компенсация положительного заряда должна способствовать увеличению степени олигомеризации амилоидного пептида, а, следовательно, его каналобразующей активности. Для проверки этого предположения был проведен скрининг амилоидных и амилоидоподобных пептидов и белков с различным суммарным зарядом молекул. В табл. 2 суммированы полученные результаты. Как видно из данных табл. 2, амилоидные пептиды АβП(25—35)-[Gly<sup>35</sup>] и фрагмент прионного белка (106—126), а также фрагменты амилоидоподобных белков BASP1 (myr-BASP1 (1—13) и myr-BASP1 (1—19)) и GAP-43 (GAP-43 (1—40)) аналогично АβП(25—35) имеют суммарный положительный заряд молекул. Молекулы АβП(1—42), АβП(25—35)-[Ala<sup>28</sup>] и ПС-1 не заряжены, а белок BASP1 и длинный фрагмент GAP-43—3 характеризуются отрицательным зарядом молекул. Из данных табл. 2 также видно, что, как и в случае фрагмента АβП(25—35), флоретин увеличивает каналобразующую активность только положительно заряженных пептидов. При этом добавка 20 мкМ флоретина в мембраноомывающие растворы практически не влияет на  $I_{\infty}$ , индуцированный нейтральными и отрицательно заряженными белками и пептидами.

Значение  $pK_a$  для молекулы флоретина равно 7.3 (Le-Fevre, Marshall, 1959; Jennings, Solomon, 1976). При нейтральных значениях pH мембраноомывающего раствора молекулы флоретина сосуществуют в двух формах —

нейтральной и отрицательно заряженной. Стириловые красители в указанных условиях являются цвиттер-ионами. Для того чтобы установить роль электростатического взаимодействия между флоретином и амилоидным пептидом, были проведены эксперименты при низком значении pH 4.0. В этих условиях доля заряженных молекул флоретина составляет менее 1 %, т. е. практически все молекулы флоретина находятся в нейтральной форме. Измерение равновесного трансмембранного тока, индуцированного АβП(25—35) при pH 4.0, показали, что добавка флоретина существенно не влияет на мультиканальную активность фрагмента (среднее значение  $I_{\infty}/I_{\infty}^0$  равно  $1.8 \pm 0.8$ ). Сравнение полученных в кислой и нейтральной средах результатов свидетельствует в пользу выдвинутого ранее предположения об электростатическом взаимодействии отрицательно заряженных молекул флоретина и положительно заряженных амилоидогенных пептидов, что в свою очередь приводит к росту каналобразующей активности пептида. По всей вероятности, это происходит за счет увеличения степени его олигомеризации.

В подтверждение последнего с помощью метода электронной микроскопии показано, что флоретин влияет на степень и характер агрегации амилоидогенных пептидов в водном растворе. Фрагменты АβП(25—35) и myr-BASP1 (1—13) образуют сеть из длинных фибрилл при инкубации в 10 мМ Na-фосфатном буфере (pH 7.3) в течение 2 ч при 37 °C (рис. 3, панели а, б в левом столбце). Добавление эквимольного по отношению к пептиду количества флоретина блокирует образование длинных фибрилл, вместо которых наблюдается небольшое количество коротких фибриллярных агрегатов (рис. 3, панели а, б в среднем и правом столбцах). В отсутствие флоретина пептиды myr-BASP1 (1—19) и GAP-43 (1—40) не образуют агрегатов, регистрируемых с помощью электронной микроскопии (рис. 3, панели в, г в левом столбце). Добавление флоретина к пептиду myr-BASP1 (1—19) приводит к образованию олигомеров и фибрилл (рис. 3, панель в, средний и правый столбцы). Пептид GAP-43 (1—40) в присутствии флоретина образует гетерогенные по размеру олигомеры (рис. 3, панель г, средний и правый столбцы).

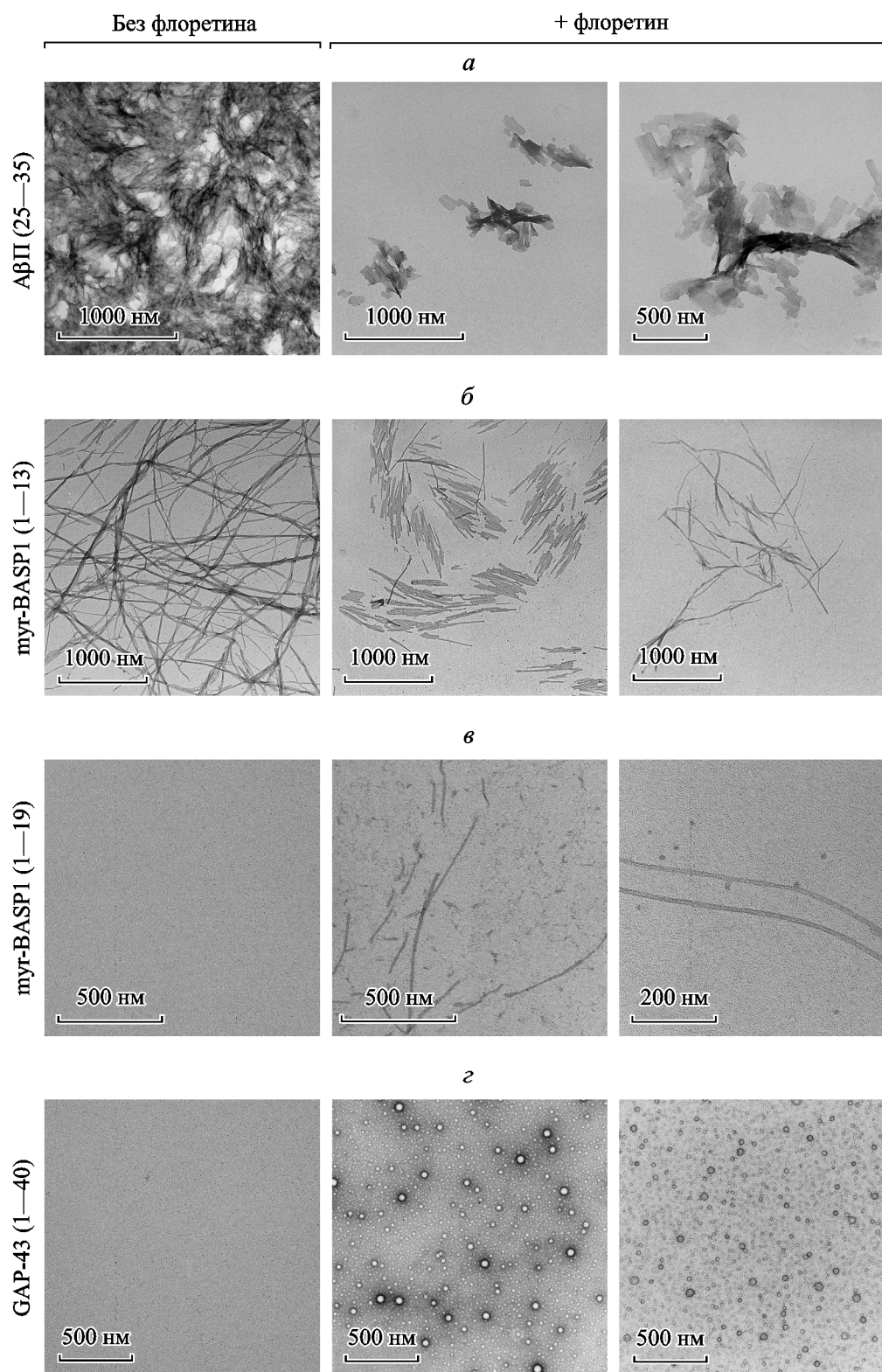


Рис. 3. Электронные микрофотографии агрегатов, образуемых пептидами АβП (25—25) (*a*), муг-BASP1 (1—13) (*б*), муг-BASP1 (1—19) (*в*) и GAP-43 (1—40) (*г*) в отсутствие флоретина (*левый столбец*) и в присутствии эквимольного количества флоретина (*средний и правый столбцы*).

*Панели а и б в среднем и правом столбцах демонстрируют образование коротких фибриллярных агрегатов; панель в в среднем столбце показывает формирование олигомеров; панель в в правом столбце представляет образование фибрилл; панель г в среднем и правом столбцах изображает гетерогенные по размеру олигомеры.*

Поскольку все исследованные флавоноиды имеют близкие значения  $pK_a$  — от 7.3 до 7.7 (LeFevre, Marshall, 1959; Jennings, Solomon, 1976; Salter et al., 1978; Reyes et al., 1983) и, следовательно, практически одинаковую долю заряженных молекул при pH 7.4, но только флоретин модифицирует каналобразующие свойства положительно заряженных амилоидогенных пептидов, можно предположить, что при связывании его с каналобразующими молекулами важное значение кроме электростатического взаимодействия имеет уникальная конформация молекулы флоретина. Полученные результаты свидетельствуют о новом механизме влияния флоретина на каналобразующую активность амилоидных и амилоидоподобных пептидов, заключающемся в непосредственном влиянии на агрегационную способность пептидов.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 14-04-31738), программы президента РФ (НШ-1721.2014.4), Российского научного фонда (проект 14-14-00565) и программы Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

### Список литературы

- Vitiuk O. S., Gilyano N. Y., Zakharov V. V. 2013. BASP1 — белок аксонных окончаний, образующий амилоидоподобные олигомеры. Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. 99 (8) : 984—992. (Vitiuk O. S., Gilyano N. Y., Zakharov V. V. 2013. Amyloid-like oligomers of presynaptic protein BASP1. Ros. Fiziol. Zhurn. Im. I. M. Sechenova. 99 (8) : 984—992.)
- Aliev G., Smith M. A., Obrenovich M. E., de la Torre J. C., Perry G. 2003. Role of vascular hypoperfusion-induced oxidative stress and mitochondria failure in the pathogenesis of Alzheimer disease. Neurotox. Res. 5 : 491—504.
- Andersen O. S., Finkelstein A., Katz I., Cass A. 1976. Effect of phloretin on the permeability of thin lipid membranes. J. Gen. Physiol. 67 : 749—771.
- Apetrei A., Mereuta L., Luchian T. 2009. The RH 421 styryl dye induced, pore model-dependent modulation of antimicrobial peptides activity in reconstituted planar membranes. Biochim. biophys. acta. 1790 : 809—816.
- Arispe N., Pollard H. B., Rojas E. 1993a. Giant multilevel cation channels formed by Alzheimer disease amyloid beta-protein [A beta P-(1-40)] in bilayer membranes. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 90 : 10 573—10 577.
- Arispe N., Pollard H. B., Rojas E. 1996. Zn<sup>2+</sup> interaction with Alzheimer amyloid beta protein calcium channels. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 93 : 1710—1715.
- Arispe N., Rojas E., Pollard H. B. 1993b. Alzheimer disease amyloid beta protein forms calcium channels in bilayer membranes: blockade by tromethamine and aluminum. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 90 : 567—571.
- Asandei A., Mereuta L., Luchian T. 2008. Influence of membrane potentials upon reversible protonation of acidic residues from the OmpF eyelet. Biophys. Chem. 135 : 32—40.
- Demuro A., Smith M., Parker I. 2011. Single-channel Ca(2+) imaging implicates Aβ1-42 amyloid pores in Alzheimer's disease pathology. J. Cell Biol. 195 : 515—524.
- De Strooper B., Saftig P., Craessaerts K., Vanderstichele H., Guhde G., Annaert W., Von Figura K., Van Leuven F. 1998. Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein. Nature. 391 : 387—390.
- Durell S. R., Guy H. R., Arispe N., Rojas E., Pollard H. B. 1994. Theoretical models of the ion channel structure of amyloid beta-protein. Biophys. J. 67 : 2137—2145.
- Efimova S. S., Ostroumova O. S. 2012. Effect of dipole modifiers on the magnitude of the dipole potential of sterol-containing bilayers. Langmuir. 28 : 9908—9914.
- Efimova S. S., Schagina L. V., Ostroumova O. S. 2014. Channel forming activity of cecropins in lipid bilayers. Effect of agents modifying the membrane dipole potential. Langmuir. 30 (26) : 7884—7892.
- Frey D., Laux T., Xu L., Schneider C., Caroni P. 2000. Shared and unique roles of CAP23 and GAP43 in actin regulation, neurite outgrowth, and anatomical plasticity. J. Cell Biol. 149 : 1443—1454.
- Gibson G. E., Huang H. M. 2002. Oxidative processes in the brain and non-neuronal tissues as biomarkers of Alzheimer's disease. Front Biosci. 7 : 1007—1015.
- Haass C., Selkoe D. J. 2007. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 8 : 101—112.
- Hirakura Y., Lin M. C., Kagan B. L. 1999. Alzheimer amyloid abeta1-42 channels: effects of solvent, pH, and Congo Red. J. Neurosci. Res. 57 : 458—466.
- Hwang T. C., Koeppe R. E., Andersen O. S. 2003. Genistein can modulate channel function by a phosphorylation-independent mechanism: importance of hydrophobic mismatch and bilayer mechanics. Biochemistry. 42 : 13 646—13 658.
- Jennings M. L., Solomon A. K. 1976. Interaction between phloretin and the red blood cell membrane. J. Gen. Physiol. 67 (4) : 381—397.
- Laudon H., Hansson E. M., Melén K., Bergman A., Farmery M. R., Winblad B., Lendahl U., von Heijne G., Näslund J. 2005. A nine-transmembrane domain topology for presenilin 1. J. Biol. Chem. 280 : 35 352—35 360.
- LeFevre P. G., Marshall J. K. 1959. The attachment of phloretin and analogues to human erythrocytes in connection with inhibition of sugar transport. J. Biol. Chem. 234 : 3022—3026.
- Lin M. C., Mirzabekov T., Kagan B. L. 1997. Channel formation by a neurotoxic prion protein fragment. J. Biol. Chem. 272 : 44—47.
- Luchian T., Mereuta L. 2006. Phlorizin- and 6-ketocholestanol-mediated antagonistic modulation of alamethicin activity in phospholipid planar membranes. Langmuir. 22 : 8452—8457.
- Lundbaek J. A., Koeppe R. E., Andersen O. S. 2010. Amphiphile regulation of ion channel function by changes in the bilayer spring constant. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 107 : 15 427—15 430.
- Mereuta L., Asandei A., Luchian T. 2011. Meet me on the other side: trans-bilayer modulation of a model voltage-gated ion channel activity by membrane electrostatics asymmetry. PLoS ONE. 6 : e25276.
- Mereuta L., Luchian T., Park Y., Hahn K. S. 2008. Single-molecule investigation of the interactions between reconstituted planar lipid membranes and an analogue of the HP(2-20) antimicrobial peptide. Biochem. Biophys. Res. Commun. 373 : 467—472.
- Mirzabekov T., Lin M. C., Yuan W. L., Marshall P. J., Carman M., Tomaselli K., Lieberburg I., Kagan B. L. 1994. Channel formation in planar lipid bilayers by a neurotoxic fragment of the beta-amyloid peptide. Biochem. Biophys. Res. Commun. 202 : 1142—1148.
- Montal M., Muller P. 1972. Formation of bimolecular membranes from lipid monolayers and study of their electrical properties. PNAS USA. 65 : 3561—3566.
- Mosevitsky M. I. 2005. Nerve ending «signal» proteins GAP-43, MARCKS, and BASP1. 245 : 245—325.
- Nelson O., Tu H., Lei T., Bentahir M., de Strooper B., Bezprozvanny I. 2007. Familial Alzheimer disease-linked mutations specifically disrupt Ca<sup>2+</sup> leak function of presenilin 1. J. Clin. Invest. 117 : 1230—1239.
- Oestreich A. B., De Graan P. N., Gispen W. H., Verhaagen J., Schrama L. H. 1997. B-50, the growth associated protein-43: modulation of cell morphology and communication in the nervous system. Prog. Neurobiol. 53 : 627—686.
- Ostroumova O. S., Efimova S. S., Chulkov E. G., Schagina L. V. 2012a. The interaction of dipole modifiers with polyene-sterol complexes. PLoS ONE. 7 : e45135.
- Ostroumova O. S., Efimova S. S., Mikhailova E. V., Schagina L. V. 2014. The interaction of dipole modifiers with amphotericin-ergosterol complexes. Effects of phospholipid and sphingolipid membrane composition. Eur. Biophys. J. 43 : 207—215.



- Ostroumova O. S., Efimova S. S., Schagina L. V. 2011a.* 5- and 4'-hydroxylated flavonoids affect voltage gating of single alpha-hemolysin pore. *Biochim. biophys. acta. Biomembr.* 1808 : 2051—2058.
- Ostroumova O. S., Efimova S. S., Schagina L. V. 2012b.* Probing amphotericin B single channel activity by membrane dipole modifiers. *PLoS ONE.* 7 : e30261.
- Ostroumova O. S., Gurnev P. A., Schagina L. V., Bezrukov S. M. 2007a.* Asymmetry of syringomycin E channel studied by polymer partitioning. *FEBS Lett.* 581 : 804—808.
- Ostroumova O. S., Kaulin Y. A., Gurnev A. P., Schagina L. V. 2007b.* Effect of agents modifying the membrane dipole potential on properties of syringomycin E channels. *Langmuir.* 23 : 6889—6892.
- Ostroumova O. S., Malev V. V., Ilin M. G., Schagina L. V. 2010.* Surfactin activity depends on the membrane dipole potential. *Langmuir.* 26 : 15 092—15 097.
- Ostroumova O. S., Schagina L. V., Mosevitsky M. I., Zakharov V. V. 2011b.* Ion channel activity of brain abundant protein brain acid-soluble protein-1 in planar lipid bilayers. *FEBS J.* 278 : 461—469.
- Prangko P., Yusko E. C., Sept D., Yang J., Mayer M. 2012.* Multivariate analyses of amyloid-beta oligomer populations indicate a connection between pore formation and cytotoxicity. *PLoS ONE.* 7 : e47261.
- Reyes J., Greco F., Motais R., Latorre R. 1983.* Phloretin and phloretin analogs: mode of action in planar lipid bilayers and monolayers. *J. Membr. Biol.* 72 : 93—103.
- Rokitskaya T. I., Kotova E. A., Antonenko Y. N. 2002.* Membrane dipole potential modulates proton conductance through gramicidin channel: movement of negative ionic defects inside the channel. *Biophys. J.* 82 (2): 865—873.
- Salter D. W., Custead-Jones S., Cook J. S. 1978.* Quercetin inhibits hexose transport in a human diploid fibroblast. *J. Membr. Biol.* 40 : 67—76.
- Sonkina S., Tukhfatullina I. I., Benseny-Cases N., Ionov M., Bryszewska M., Salakhutdinov B. A., Cladera J. 2010.* Interaction of the prion protein fragment PrP 185-206 with biological membranes: effect on membrane permeability. *J. Pept. Sci.* 16 : 342—348.
- Spasic D., Tolia A., Dillen K., Baert V., De Strooper B., Vrijens S., Annaert W. 2006.* Presenilin-1 maintains a nine-transmembrane topology throughout the secretory pathway. *J. Biol. Chem.* 281 : 26 569—26 577.
- Sun X., Garlid K. D. 1992.* On the mechanism by which bupivacaine conducts protons across the membranes of mitochondria and liposomes. *J. Biol. Chem.* 267 : 19 147—19 154.
- Wolfe M. S., Xia W., Ostaszewski B. L., Diehl T. S., Kimberly W. T., Selkoe D. J. 1999.* Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and gamma-secretase activity. *Nature.* 398 : 513—517.
- Zakharov V. V., Mosevitsky M. I. 2010.* Oligomeric structure of brain abundant proteins GAP-43 and BASP1. *J. Struct. Biol.* 170 : 470—483.

Поступила 21 XI 2014

#### THE INFLUENCE OF DIPOLE MODIFIERS ON THE CHANNEL-FORMING ACTIVITY OF AMYLOID AND AMYLOID-LIKE PEPTIDES IN LIPID BILAYERS

S. S. Efimova,<sup>1,\*</sup> V. V. Zakharov,<sup>2,3</sup> O. S. Ostroumova<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, <sup>2</sup> National Research Centre NRC «Kurchatov Institute», Gatchina, and <sup>3</sup> St. Petersburg State Polytechnical University; \* e-mail: ssefimova@mail.ru

We have studied the steady-state transmembrane current induced by amyloid and amyloid-like peptides in lipid bilayers in the presence of dipole modifiers. It has been shown that the addition of dipole modifier, phloretin, to the membrane bathing solutions leads to an increase in the multichannel activity of amyloid  $\beta$ -peptide fragment 25—35, [Gly<sup>35</sup>]-amyloid  $\beta$ -peptide fragment 25—35, prion protein fragment 106—126 and amyloid-like peptides myr-BASP1 (1—13), myr-BASP1(1—19) and GAP-43(1—40). We have found that the effect of phloretin is not the result of dipole potential changes due to adsorption of this modifier on the membrane. Using the various fragments of amyloid  $\beta$ -peptide, presenilin, prion protein and neuronal proteins BASP1 and GAP-43 allows to conclude that the steady-state peptide-induced transmembrane current in the case of addition of phloretin is due to the electrostatic interaction between the positively charged channel-forming agents and negatively charged dipole modifier. The results obtained by electron microscopy have demonstrated that this interaction increases degree of peptide oligomerization.

**Key words:** bilayer lipid membranes, amyloidogenic peptides, dipole modifiers, membrane dipole potential.