

Исследование интерфейса связывания бета-амилоида с кандидатным маркером нейродегенеративных заболеваний

**Никольский К.С.¹, Куликова Л.И.*¹, Руднев В.Р.¹, Петровский Д.В.¹,
Габестро И.С.², Каем С.Л.², Карпова Е.М.², Копылов А.Т.¹,
Кайшева АЛ.¹**

¹*Институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича, Москва, Россия*

²*ООО Лайфмиссия, Москва, Россия*

Аннотация. Нейродегенеративные заболевания представляют группу медленно прогрессирующих, наследственных или приобретённых патологий нервной системы. Общей чертой является нейродегенерация, что приводит к различным неврологическим симптомам, включая деменцию, двигательные расстройства, нарушение когнитивных функций и поведенческие изменения. В связи с широким распространением в современном обществе нейродегенеративных заболеваний растёт количество исследований, посвящённых изучению молекулярных основ развития этих заболеваний, что открывает перспективы создания новых подходов для ранней диагностики и поиска эффективных методов лечения. К биомолекулам, ассоциированным с патогенезом нейродегенеративных заболеваний, относятся ацетилхолиновый рецептор и бета-амилоид. Перспективной для изучения представляется модифицированная форма тетрапептида НАЕЕ (His-Ala-Glu-Glu), которая, вероятно, связывает бета-амилоид в присутствии катионов. Методом молекулярного моделирования получены комплексы ацетилхолинового рецептора и бета-амилоида, а также модифицированной формы тетрапептида НАЕЕ и бета-амилоида в присутствии и без катиона цинка. Выполнено картирование и характеристика интерфейсов связывания смоделированных комплексов, сравнительный анализ стабильности комплексов с применением методов молекулярной динамики. Показано, что присутствие иона цинка приводит к стабилизации двух типов комплексов. Наиболее стабилен комплекс никотиновый ацетилхолиновый рецептор и бета-амилоид в присутствии цинка по сравнению с другими изучаемыми комплексами. Наименьшую стабильность в экспериментах продемонстрировал комплекс тетрапептида НАЕЕ и бета-амилоида. Филогенетический анализ происхождения последовательности N-концевой α -спирали nAChR человека длиной 18 аминокислотных остатков, содержащей тетрапептид НАЕЕ, выявил белки-ортологи высокой гомологии со схожей биологической функцией у большинства из самых многочисленных классов царства Животных.

Ключевые слова: нейродегенеративные заболевания, молекулярное моделирование, интерфейс связывания, стабильность комплекса, модифицирование пептида, филогенетический анализ последовательности белка

ВВЕДЕНИЕ

Нейродегенеративные заболевания оказывают значительное влияние на смертность во всем мире. В 2021 году они составили 2.1 % от всех причин смертности в России. В развитых странах расходы на лечение и уход за пациентами с нейродегенеративными заболеваниями уже превышают совокупные затраты на онкологические, сердечно-сосудистые заболевания и диабет. По прогнозам, к 2050 году распространённость нейродегенеративных заболеваний значительно возрастет, что усилит нагрузку на системы здравоохранения [1]. По данным ВОЗ, к 2040 году нейродегенеративные заболевания станут второй по частоте причиной смерти в развитых странах, уступая лишь онкологическим заболеваниям [2].

Таблица 1. Ассоциация pAChR и Aβ с развитием нейродегенеративных заболеваний

Медицинская значимость	pAChR	Aβ	Молекулярный механизм	Источник
Болезнь Альцгеймера				
Aβ и фосфорилированные формы тау-белка образуют нейрофибриллярные клубки	да	да	– дегенерация холинергических нейронов, активация pAChR по пути Aβ, усиление провоспалительных путей и снижение когнитивных способностей – формирование сенильных бляшек (состав Aβ), дегенерация нейронов через окислительный стресс	[8–15]
Болезнь Паркинсона				
Формирование в нейронах «телец Леви», содержащих α-синуклеин и другие белки	нет [16] да	да	– отложение Aβ и тау-белка приводит к снижению когнитивных функций – усиление нейровоспаления и дисбаланс метаболизма Aβ – снижение экспрессии генов Chrna4 и Chrna6, кодирующих субъединицы α4 и α6 pAChR в черной субстанции	[14,17–25]
Болезнь Ниманна-Пика				
Нейродегенерация с тау-патологией, повышение уровня Aβ [26, 27]	спорно	Да	– мутации <i>de novo</i> в генах, кодирующих никотинергические, холинергические рецепторы и др, вызывающие аутосомно-доминантную лобную эпилепсию – формирование амилоидогенных фрагментов, повышение уровня Aβ и тау-белка в спинномозговой жидкости	[28–35]
Боковой амиотрофический склероз				
Повышение мышечного тонуса, накопление неправильно свернутого белка, нарушение аксонального транспорта	Да	Да	– предшественник APP и Aβ одни из самых ранних признаков БАС – пептид 682YENPTY687 рассматривается как активный и критически важный в контроле функции APP и предотвращении переклочения с неамилоидогенного на амилоидогенный путь посредством фосфорилирования остатка Tyr682 – мутации в CHRNA (pAChR) – генетический фактор риска развития БАС	[36–45]
Рассеянный склероз				
APP считается маркером аксонального повреждения	Да	Да	– Aβ в спинномозговой жидкости (СМЖ) при РС коррелирует с тяжестью когнитивных дефектов	[46–53]

Понимание молекулярных основ развития этих заболеваний открывает перспективы создания новых подходов для ранней диагностики и поиска мишеней для терапевтического действия. Исследования показывают, что амилоидные отложения начинают накапливаться в мозге за десятилетия до появления симптомов. Важной задачей является своевременное выявление патологии на бессимптомной стадии.

Участниками патогенеза нейродегенеративных заболеваний являются ацетилхолиновый рецептор (nAChR) и бета-амилоид (A β) (см. таблица 1) [3]. A β представляет собой фрагмент белка массой 4 кДа, образующийся из более крупной молекулы предшественника амилоида (APP, от англ. «англ. amyloid precursor protein»), которая продуцируется нейронами мозга, клетками сосудов и крови (включая тромбоциты), и в меньшей степени астроцитами [4]. В 1984 году пептид A β и его аминокислотная последовательность длиной 42 остатка (а.о.) были впервые описаны как основной компонент полиморфных отложений в оболочечных сосудах у пациентов с синдромом Дауна [5]. Позднее плотные агрегаты A β были обнаружены в нейритных бляшках неокортекса при болезни Альцгеймера [6].

Гетеромер nAChR является рецептором типа ионный канал и состоит из пяти трансмембранных субъединиц. Продолжительная стимуляция nAChR вызывает отсроченные клеточные реакции, которые обеспечивают нейропротекцию посредством внутриклеточных сигнальных путей, вероятно, индуцируемых притоком катионов Ca²⁺. Наиболее распространенными подтипами nAChR, экспрессируемыми в центральной нервной системе (ЦНС), являются $\alpha 4$ (известные как $\alpha 4\beta 2$) и $\alpha 7$. Длительное воздействие никотина или ингибиторов ацетилхолинэстеразы (AChE) обеспечивает защиту от нейротоксичности, вызванной глутаматом, A β и другими токсическими агентами. Нейропротективные эффекты, вызванные длительной стимуляцией nAChR, указывают на важную роль рецепторов в выживании нейронов в патологических условиях, таких как ишемия мозга и нейродегенеративные заболевания [7].

Раскрытие механизмов нейропротекции, опосредованных nAChR, открывает широкие возможности для разработки новых подходов диагностики и поиска эффективных терапевтических мишеней. В литературе обсуждается защитная роль модифицированной формы тетрапептида His-Ala-Glu-Glu, ацетилированного по N-концу и амидированного по C-концу (Ac-NAEE-NH₂) в патогенезе болезни Альцгеймера [54–59]. Последовательность NAEE характерна nAChR, локализована во внеклеточном домене. На сегодня считается, что интерфейс взаимодействия со стороны nAChR представлен последовательностью NAEE, со стороны A β – 11-EVHH-14. Вероятно, пептид NAEE посредством конкурентного взаимодействия с A β , способен проявлять нейропротективный эффект [59].

Целью настоящего исследования стало изучение и характеристика интерфейсов связывания ацетилхолинового рецептора и A β , а также модифицированной формы тетрапептида NAEE и A β ; проведение сравнительного анализа стабильности комплексов с применением методов молекулярной динамики.

МЕТОДЫ

Моделирование трехмерной структуры модифицированной формы тетрапептида Ac-NAEE-NH₂

Для моделирования пептида Ac-NAEE-NH₂ за основу была выбрана структура «structure1.pdb», размещенная в приложении к статье [54]. Пептид NAEE находится в данной структуре по координатам D35-D38. Добавление ацетильной группы (ACE) и аминогруппы (NH₂) в состав пептида производилось по следующему алгоритму:

- из исходной структуры был вырезан NAEE пептид (D35-D38);
- с использованием инструментов моделирования PyMOL v.2.5.0 была добавлена ацетильная группа (ACE) и аминогруппа (NH₂);

– с целью нивелирования стерических затруднений и столкновений между атомами боковых цепей и добавленными группами все боковые цепи в структуры были удалены, а затем восстановлены с использованием программного пакета xLEaP AmberTools xLEaP v.24 с параметрами силового поля ff14SB;

– оптимизация геометрии пептида проводилась в программном пакете Avogadro v.1.2.0 с использованием оптимизатора Open Babel и силового поля GAFF.

Моделирование связывания пептида с ионами цинка производилось с использованием WEB-сервиса «Metal Ion-Binding Site Prediction and Docking Server» [60].

Поиск трехмерной структуры nAChR в открытых базах данных трёхмерных структур

Поиск осуществлялся по открытым базам данных полноатомных моделей белков Protein Data Bank (www.rcsb.org) и AlphaFold (alphafold.ebi.ac.uk). По результатам поиска полноатомных моделей ацетилхолинового рецептора nAChR (UniProt ID P43681) сформирован массив данных, содержащий 26 структур. Среди выявленных структур для дальнейшего структурного анализа была отобрана 8STO цепь A, как структура с предпочтительным разрешением и содержащая целевой фрагмент HAEE, а также с наилучшими показателями полноты и совпадения аминокислотной последовательности с целевым белком P43681. Данная структура является одной из последних экспериментально разрешенных и аннотирована в 2024 году [61]. Пространственная структура белка определена с помощью метода электронной микроскопии с высоким разрешением 2.4 Å. Структура 8STO – многодоменная, количество атомов 26 031.

Поиск трехмерной структуры Aβ в открытых базах данных трёхмерных структур

Для решения задачи выбора амилоида проведен поиск трехмерных структур Aβ (UniProt ID P05067) в открытых базах данных структур (PDB, AlphaFold). В результате поиска получена выборка, состоящая из 740 структур. Важным критерием выбора структуры являлось наличие последовательности -EVNH- и полное совпадение по аминокислотной последовательности и длине 42 аминокислотных остатка (а.о.) с целевым белком. Для дальнейших исследований в качестве Aβ выбрана полноатомная модель PDB ID 6SZF (Solution structure of the amyloid beta-peptide (1–42)), аннотированная в PDB 2020 году [62]. Молекулярный вес составляет 4.5 кДа, количество атомов 318.

Формирование молекулярных комплексов

С применением метода молекулярного докинга выполнено моделирование четырех вариантов комплексов взаимодействующих факторов в присутствии и отсутствии катиона цинка:

- комплекс №1: HAEE + Aβ + Zn;
- комплекс №2: HAEE + Aβ;
- комплекс №3: nAChR + Aβ;
- комплекс №4: nAChR + Aβ + Zn.

Моделирование молекулярных комплексов включало три этапа: стыковка взаимодействующих молекулярных факторов, анализ результатов молекулярного моделирования и поиск оптимальной конформации для целевых комплексов. Стыковка выполнялась посредством веб-сервиса HADDOCK [63]. Настройка процесса стыковки взаимодействующих молекулярных факторов осуществлялась с учетом литературных данных. На сегодня известно, что участками, играющими ключевую роль в связывании и стабилизации комплекса Aβ и рецептора nAChR являются последовательность -

EVNH- с 11-го аминокислотного остатка в A β и -HAEE- в N-концевом домене рецептора nAChR [54]. При этом, тот же участок описан как являющийся минимальным сайтом, отвечающим за связывание ионов цинка [64]. Ион цинка локализован в центре интерфейса стыковки взаимодействующих участков HAEE и EVNH [65].

Поиск оптимальной конформации из результатов стыковки и молекулярного докинга проводился с помощью анализа ключевых показателей: суммарное и среднее значение площади, доступной на растворитель (SASA), комплекса и интерфейса взаимодействия, SASA отдельных цепей, пространственное попарное выравнивание моделей комплекса без цинка и комплекса с участием цинка и определение среднеквадратичного отклонения положений C α -атомов (RMSD), визуальное соответствие представлениям о взаимодействии этих структур литературным данным; а также на основании критериев ранжирования сервиса MolProbity v4.5.2 (количество стерических затруднений, некорректных углов Рамачандрана) [66].

Проведение молекулярно-динамического эксперимента

В рамках подготовки структур после докинга были изменены порядковые номера аминокислотных остатков в структурах для строгого разграничения номеров аминокислот в составе разных компонентов комплекса. Для комплексов, содержащих nAChR, был удален трансмембранный домен, поскольку он не вступает во взаимодействие с A β , но значительно увеличивает размер структуры и, как следствие, затраты вычислительных мощностей на симуляцию.

Молекулярно-динамическое моделирование выполнялось с использованием программного пакета GROMACS 2022.4 и силового поля AMBER99SB-ILDN. Моделирование выполнялось в водной среде (модель воды TIP3P) с добавлением ионов натрия для нейтрализации системы. Вокруг комплекса рассчитывалась коробка с минимальным расстоянием от края коробки до молекулы равным 2 нм. Симуляция выполнялась при атмосферном давлении и постоянной температуре среды 310 К. Время симуляции составило 100 нс. Для комплексов без участия цинка были выполнены по три технических повтора, а для комплексов с присутствием цинка – по четыре технических повтора с идентичными условиями симуляции.

Определение геометрических характеристик выполнялось с использованием собственного инструментария GROMACS для анализа траектории: «gmx rmsd», «gmx rmsf», «gmx sasa». Расчет энергии связывания выполнялся посредством утилиты gmx_MMPBSA [67], являющейся адаптацией инструмента MMPBSA.py [68] для работы с траекториями GROMACS.

Филогенетический анализ

Филогенетический анализ включал этап поиска белков-ортологов nAChR субъединицы 4 человека (P43681) с использованием инструмента BLAST на платформе UniProt (www.uniprot.org/blast). Условия поиска: база данных “Uniprot references proteomes + Swiss-Prot”, без ограничений по таксонам, алгоритм “blastp”, матрица BLOSUM62, количество идентификаций 1000. Результаты поиска схожих последовательностей далее отфильтрованы по уровню сходства последовательности более 50 %, либо по наличию в последовательности тетрапептида HAEE. В случаях обнаружения для одного вида организма более одного белка, в анализ отбирался наиболее близкий по аминокислотной последовательности. На втором этапе для полученного списка ($n = 537$) белковых последовательностей выполнено выравнивание множественных последовательностей с использованием Clustal-Omega версии 1.2.4, алгоритм ClustalW [69]. На этом этапе удалены белки со значительно удлиненными начальными/концевыми участками как искажающие общее выравнивание. На третьем этапе построена матрица расстояний для участников с использованием Phylip protdist

версии 3.697. Кластеризация выполнялась с помощью алгоритма агломеративной кластеризации из пакета Scikit-Learn для языка программирования Python.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для определения стабильности комплексов проведен анализ полученных в ходе молекулярно-динамического эксперимента характеристик комплексов. Средние значения величин, вычисленных в результате моделирования для каждого комплекса, приведены в таблице 2.

Из таблицы 2 видим, что значения RMSD для малых комплексов №2 (HAEE + A β) и №1 (HAEE + A β + ZN) $1,4 \pm 0,2$ и $1,0 \pm 0,2$ нм, соответственно, значительно превышают соответствующие значения для комплексов №3 (nAChR + A β) и №4 (nAChR + A β + Zn) $0,3 \pm 0,05$ и $0,4 \pm 0,04$ нм, соответственно. Малые комплексы характеризуются малым числом атомов (693 и 694), большей свободой в связи с участием в интерфейсе лишь четырех аминокислотных остатков, по сравнению с крупными комплексами №3 и №4, которые включают 17641 и 17642 атомов. Вычисленные в ходе МД-эксперимента значения RMSD говорят о стабильности крупных комплексов (nAChR+A β) и (nAChR+A β +Zn). Нестабильным комплексом среди участников эксперимента является №2 (HAEE+A β).

Другая характеристика геометрии комплексов, исследуемая в ходе экспериментов молекулярной динамики это – SASA, площадь, доступная растворителю. Исследовали SASA для A β в каждом из четырех комплексов, для интерфейса связывания и комплекса в целом. Наличие иона цинка в комплексах ведет к уменьшению SASA интерфейса, что свидетельствует о более плотном контакте аминокислот в составе интерфейса. Наблюдается выраженный «локальный» эффект на уровне интерфейса комплекса. Однако для полных комплексов наличие катиона не приводит к выраженному эффекту изменения SASA. Иными словами, «глобальный» эффект не наблюдается.

Таблица 2. Характеристики исследуемых комплексов, полученные в ходе молекулярно-динамического эксперимента. Представлены средние значения показателей по 3–4 техническим повторам

Параметр	Комплексы			
	№2 HAEE + A β	№1 HAEE + A β + ZN	№3 nAChR + A β	№4 nAChR + A β + Zn
RMSD, нм	1.4 ± 0.2	1.0 ± 0.2	0.3 ± 0.05	0.4 ± 0.04
SASA (A β), нм ²	36.9 ± 2.5	37.3 ± 1.3	39.7 ± 1.5	40.1 ± 1.3
SASA (Интерфейса), нм ²	14.9 ± 0.7	12.9 ± 1.1	14.4 ± 0.3	13.5 ± 0.3
SASA (Комплекс), нм ²	43.4 ± 1.6	40.8 ± 1.5	487.8 ± 5.7	489.4 ± 3.9
Δ вклада неполярных взаимодействий, кКал/Моль	-1.1 ± 1.2	-2.5 ± 0.4	-7.6 ± 1.4	-7.4 ± 2.0
Δ вклада электростатических взаимодействий*, кКал/Моль	-33.3 ± 14.5	138.1 ± 39.1	-592.3 ± 66.1	108.9 ± 85.1
Δ вклада Вандерваальсовых взаимодействий, кКал/Моль	-8.6 ± 8.8	-17.2 ± 2.8	-64.3 ± 11.0	-54.9 ± 18.2
Энергия связывания, кКал/Моль	-6.7 ± 6.9	-25.5 ± 7.9	-28.8 ± 5.9	-33.4 ± 26.4

*Компонента электростатических взаимодействий по уравнению Пуассона – Больцмана

В таблице 2 представлены термодинамические характеристики для исследуемых комплексов, полученные в результате молекулярно-динамического моделирования,

которые представляют собой компоненты энергии связывания: изменение вклада неполярной, электростатической и полярной, или Вандерваальсовой компоненты. Вандерваальсовы силы возникают при поляризации молекул и образовании диполей. Вклад электростатической и полярной компоненты в присутствии и отсутствии цинка компенсируют друг друга. В природе образование комплекса белка с цинком зачастую модулирует функцию белка посредством возникающих эффектов дипольной поляризации. Энергия связывания Аβ и рецептора существенно ниже по значению Аβ и модифицированной формы тетрапептида НАЕЕ, что свидетельствует о стабильности комплекса №3. Показатели энергии связывания для комплексов с ионом Zn также являются отрицательными величинами, абсолютные значения которых увеличиваются по сравнению со значениями энергии связывания в комплексах без Zn (таблица 2). Последнее наблюдение указывает на важную роль цинка в стабилизации комплексов №1 и №4.

Важно отметить, что полученное значение энергии связывания не является величиной, напрямую отражающей значение изменения свободной энергии Гиббса и поэтому не может быть корректно переведено в константу диссоциации из-за того, что данная величина не учитывает ряд факторов энтропии [68]. Тем не менее расчетные значения энергии связывания позволяют сравнить стабильность нескольких белковых комплексов между собой, оценить изменение энергии связывания при изменении физических и химических условий окружения (рН, ионная сила).

Таким образом, из таблицы 2 можно сделать следующие выводы:

- присутствие в интерфейсах комплексов иона Zn увеличивает стабильность комплексов, как Аβ с пептидом НАЕЕ, так и Аβ с рецептором;
- наиболее сильное связывание возникает между рецептором и Аβ в присутствии иона цинка;
- комплекс между пептидом НАЕЕ и Аβ без иона цинка является наиболее слабым. Этот комплекс показал себя нестабильным: в интервале 30-50 нс симуляции во всех технических повторах происходит разрыв взаимодействия между компонентами комплекса.

Такое нарушение стабильности подтверждается показателями, характеризующими изменение геометрии – среднеквадратичное отклонение C_{α} -атомов (RMSD), площадь доступной на растворитель для комплекса в целом (SASA), площадь, доступная на растворитель интерфейса (см. рис. 1, 2). При этом стабильность комплекса с участием иона цинка выше.

Рисунок 1 демонстрирует временную развертку изменения геометрических показателей комплексов №2 НАЕЕ+Аβ и №1 НАЕЕ+Аβ+ZN в ходе МД-эксперимента. На рисунке представлены результаты для трех технических повторов. На рисунке 1а отображено изменение значений среднеквадратичного отклонения C_{α} -атомов. Видим, что значения RMSD на всем протяжении МД-эксперимента находятся в довольно узком диапазоне значений (синим цветом отображены результаты для комплекса НАЕЕ+Аβ, красным цветом – НАЕЕ+Аβ+Zn). Но значения RMSD довольно велики, что свидетельствует о конформационной нестабильности комплексов. Среднее значение RMSD для комплекса НАЕЕ+Аβ составляет 1.4 ± 0.2 нм, для комплекса НАЕЕ+Аβ+ZN – 1.0 ± 0.2 нм (таблица 1). Следует отметить, что присутствие иона цинка в комплексе дает возможность уменьшить величину RMSD на 4 Å, что позволяет сохранить комплекс на всем периоде эксперимента.

Рисунок 1,б иллюстрирует для тех же комплексов изменение площади, доступной на растворитель, комплекса в целом, рисунок 1,в – интерфейса НАЕЕ-EVHH. Видим, что в присутствии цинка значения SASA комплекса несколько ниже по сравнению со значениями для комплекса без цинка. Косвенно это указывает на большую компактность комплекса с цинком.

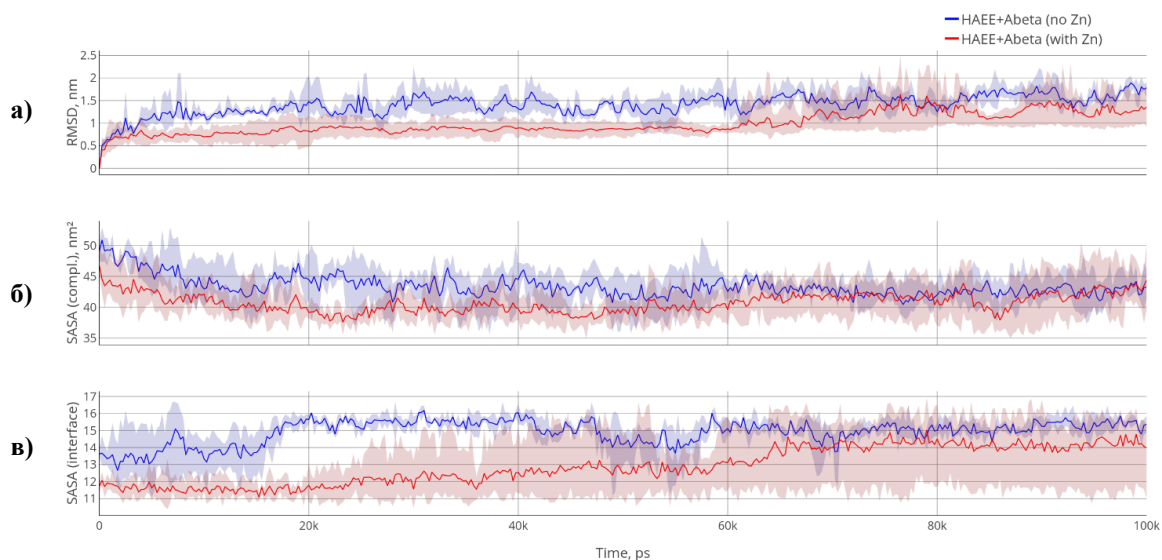


Рис. 1. Сравнение геометрических показателей комплексов HAEE+Аβ и HAEE+Аβ+ZN: геометрические показатели стабильности структуры во времени симуляции: среднее квадратическое отклонение (а), площадь, доступная на растворитель для комплекса в целом (б) и площадь, доступная на растворитель для аминокислот в составе интерфейса HAEE-EVHH (в). На рисунках представлены результаты по всем выполненным техническим повторам МД моделирования: синим цветом – для HAEE+Аβ (в легенде HAEE+Abeta (no Zn)), красным – для HAEE+Аβ+ZN (в легенде HAEE+Abeta (with Zn)); диапазон изменений расчетных значений указан в виде полупрозрачной области вокруг графиков.

Рисунок 2 визуализирует для комплексов №1 и №2 средние значения RMSF, SASA для аминокислотных остатков, находящихся на расстоянии не более 15 Å от интерфейса связывания.

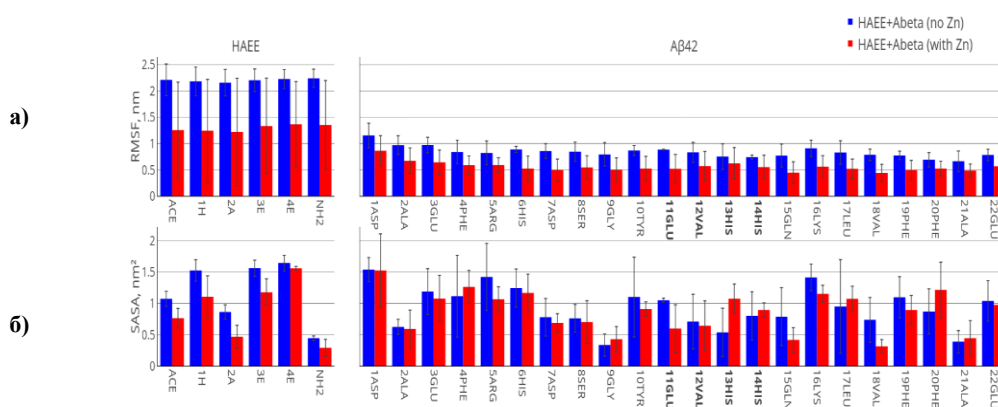


Рис. 2. Анализ геометрических показателей: (а) – среднее квадратическое отклонение C_{α} -атомов (RMSF) и (б) – площадь, доступная на растворитель (SASA) для аминокислотных остатков интерфейса комплексов №1 (HAEE+Аβ +ZN) и №2 (HAEE+Аβ) по всем выполненным техническим повторам (медиана и СКО). По оси X – аминокислотные остатки, находящиеся в интерфейсе связывания и на расстоянии не более 15 Å от интерфейса связывания. Аминокислотные остатки, выделенные жирным шрифтом, принадлежат интерфейсу связывания. Синим цветом выделены вычисленные в ходе МД экспериментальные значения для комплекса №2 (в легенде: HAEE+Abeta (no Zn)), красным цветом – для комплекса №1 (в легенде: HAEE+Abeta (with Zn)).

Первая строка рисунка 2 иллюстрирует средние значения RMSF для каждого аминокислотного остатка, находящегося в интерфейсе связывания и на расстоянии не более 15 Å от интерфейса связывания. Таких аминокислот для комплексов HAEE+Аβ и HAEE+Аβ+ZN оказалось 22. Слева по оси OX отложены а.о. Ас-HAEE-NH₂, далее справа представлен интерфейс Аβ (Аβ42 на рисунке). Из рисунка видим, что средние значения среднее квадратическое отклонения (RMSF) для каждого остатка Ас-HAEE-NH₂

в комплексе НАЕЕ+Аβ ≈ 2.2 нм, а в комплексе НАЕЕ+Аβ+ZN ≈ 1.3 нм. То есть для комплекса с цинком средние значения RMSF для аминокислот модифицированной формы тетрапептида. Ас-НАЕЕ-NH2 почти вдвое ниже, чем величины средних значений RMSF для комплекса без цинка. Такое же соотношение величин сохраняется и для а.о. интерфейса Аβ с той лишь разницей, что средние значения RMSF а.о. для комплекса НАЕЕ+Аβ ≈ (0.8–0.9) нм, а средние значения RMSF для соответствующих а.о. для комплекса НАЕЕ+Аβ+ZN ≈ 0.5 нм. Таким образом, участие цинка в комплексе обуславливает уменьшение флуктуации аминокислотных остатков интерфейса почти вдвое.

Вторая строка рисунка 2 представляет гистограмму средних значений SASA для аминокислотных остатков в составе интерфейса и на удалении не более 15Å. Средние значения SASA для аминокислотных остатков Ас-НАЕЕ-NH2 для обоих комплексов находятся в диапазоне (0.2 – 1.5) нм², причем нужно отметить, что значения SASA для аминокислотных остатков Ас-НАЕЕ-NH2 комплекса с участием цинка всегда меньше соответствующих значений для комплекса НАЕЕ+Аβ. Средние значения SASA для 22 аминокислотных остатков интерфейса Аβ42 распределены следующим образом: абсолютное большинство указанных значений SASA для комплекса с цинком меньше, чем для комплекса без цинка.

Аналогичный сравнительный анализ геометрических показателей аминокислотных остатков интерфейса выполнен для комплексов №3 и №4.

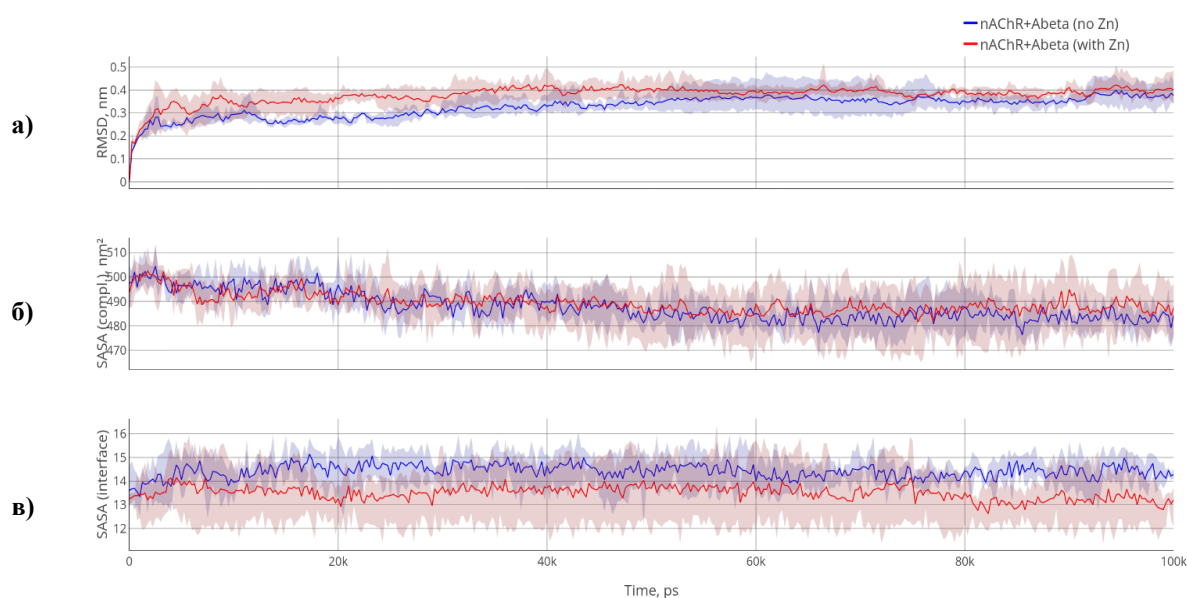


Рис. 3. Сравнение геометрических показателей комплексов №3 nAChR+Аβ и №4 nAChR+Аβ+Zn: среднеквадратичное отклонение С_α-атомов (а), площадь, доступная на растворитель для комплекса в целом (б) и площадь, доступная на растворитель для аминокислот в составе интерфейса связывания (в). На рисунках представлены результаты по всем выполненным техническим повторам МД моделирования: синим цветом – для nAChR+Аβ (в легенде: nAChR+Abeta (no Zn)), красным – для nAChR+Аβ+Zn (в легенде: nAChR+Abeta (with Zn)); диапазон изменений расчетных значений указан в виде полупрозрачной области вокруг графиков.

Рисунок 3 отражает изменение во времени геометрических показателей комплексов №3 и №4 в ходе МД-эксперимента. На рисунках представлены результаты также для трех технических повторов. Рисунок 4,а демонстрирует изменение значений среднеквадратичного отклонения С_α-атомов в рамках эксперимента. Из рисунка 3,а видно, что средние значения RMSD для обоих комплексов быстро стабилизируются и на всем протяжении МД моделирования находятся примерно на одном уровне: для комплекса nAChR+Аβ – 0.3 ± 0.05 нм; для комплекса nAChR+Аβ+Zn – 0.4 ± 0.04 нм. Величины значений RMSD говорят о стабильности обоих комплексов.

Рисунок 3,б иллюстрирует изменение площади, доступной на растворитель, комплекса в целом, и рисунок 3,в – интерфейса связывания. Видно, что указанные характеристики для обоих комплексов быстро стабилизируются и сохраняются на всем протяжении МД моделирования примерно на одном уровне, не демонстрируя большие выбросы. При этом величины средних значений SASA комплекса в целом для nAChR+ $\text{A}\beta$ и nAChR+ $\text{A}\beta$ +Zn сопоставимы. А величины средних значений SASA интерфейса связывания (рисунок 3,в) для комплекса с цинком ($13.5 \pm 0.3 \text{ нм}^2$) чуть меньше, чем соответствующие значения для комплекса без цинка ($14.4 \pm 0.3 \text{ нм}^2$). Вероятно, наличие иона цинка в комплексе уменьшает значение SASA интерфейса связывания и дополнительно стабилизирует комплекс.

В первой строке рисунка 4 представлены средние значения RMSF для каждого аминокислотного остатка, находящегося в интерфейсе связывания и на расстоянии не более $15 \text{ \AA}$ от интерфейса связывания для комплексов nAChR+ $\text{A}\beta$ и nAChR+ $\text{A}\beta$ +Zn. Анализируя представленные данные RMSF, можем отметить, что флуктуации всех исследуемых аминокислотных остатков рецептора как для комплекса с цинком, так и для комплекса без участия цинка – малы. Расчетные средние значения RMSF ниже 0.2 нм (кроме одного аминокислотного остатка – для $5\text{Glu} \approx 3.7\text{--}3.8 \text{ \AA}$ для комплекса без цинка и с цинком).

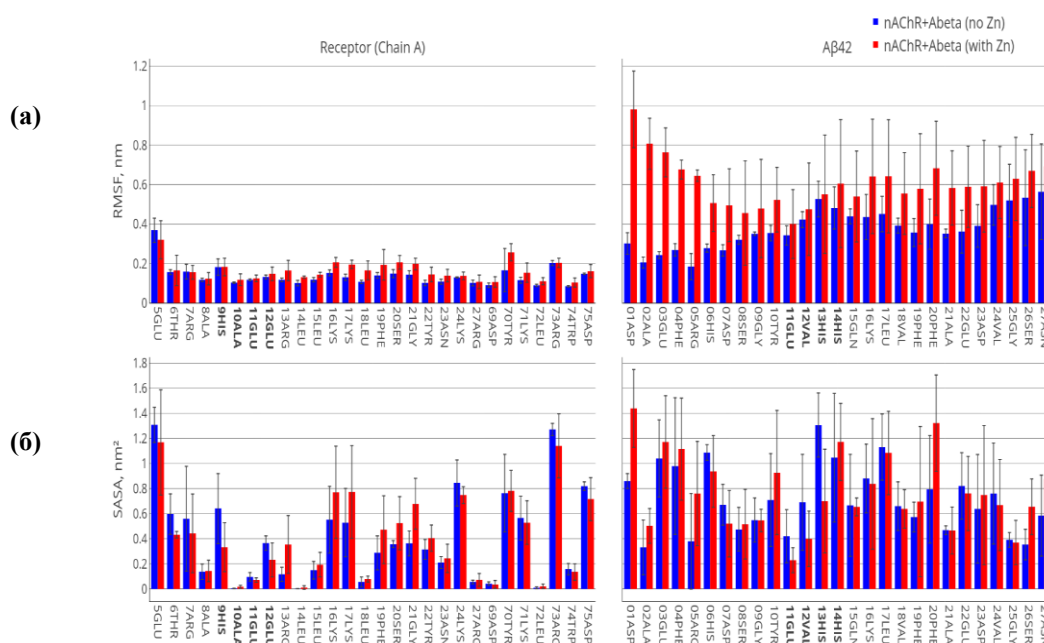


Рис. 4. Анализ геометрических показателей: (а) среднееквадратичное отклонение C_α -атомов (RMSF) и (б) площадь, доступная на растворитель (SASA) для аминокислотных остатков интерфейса комплексов №3 nAChR+ $\text{A}\beta$ и №4 nAChR+ $\text{A}\beta$ +Zn по всем выполненным техническим повторам (медиана и СКО). По оси X – аминокислотные остатки, находящиеся в интерфейсе связывания и на расстоянии не более $15 \text{ \AA}$ от интерфейса связывания. Аминокислотные остатки, выделенные жирным шрифтом, принадлежат интерфейсу связывания. Синим цветом выделены вычисленные в ходе МД экспериментальные значения для комплекса №3 (в легенде рисунка: nAChR+Abeta (no Zn)), красным – для комплекса №4 (в легенде: nAChR+Abeta (with Zn)).

Другая картина для $\text{A}\beta 42$ – средние значения RMSF для исследуемых аминокислот комплекса без цинка варьируют от 0.2 нм до 0.5 нм , тогда как флуктуации аминокислот комплекса с участием цинка гораздо выше: от 0.4 нм до 1 нм . $\text{A}\beta$ включает небольшой участок альфа-спирали и относительно протяженные неструктурированные участки, что обуславливает в целом высокие показатели флуктуации аминокислот.

Во второй строке рисунка 4 даны гистограммы средних значений SASA для аминокислотных остатков, находящихся в интерфейсе связывания и на расстоянии не более $15 \text{ \AA}$ от интерфейса связывания для комплексов №3 и №4. Видим, что значения

SASA для исследуемых аминокислотных остатков сильно различаются друг от друга. И такая картина свойственна как для комплекса с участием цинка, так и для комплекса без цинка. Средние значения SASA для исследуемых аминокислотных остатков сильно варьируют и находятся в диапазоне от 0.3 до 1.3 нм для комплекса без цинка; от 0.1 до 1.45 нм. Сказать, что цинк своим участием уменьшает флуктуации аминокислотных остатков, находящихся в интерфейсе связывания и на расстоянии не более 15 Å от интерфейса связывания, мы не можем.

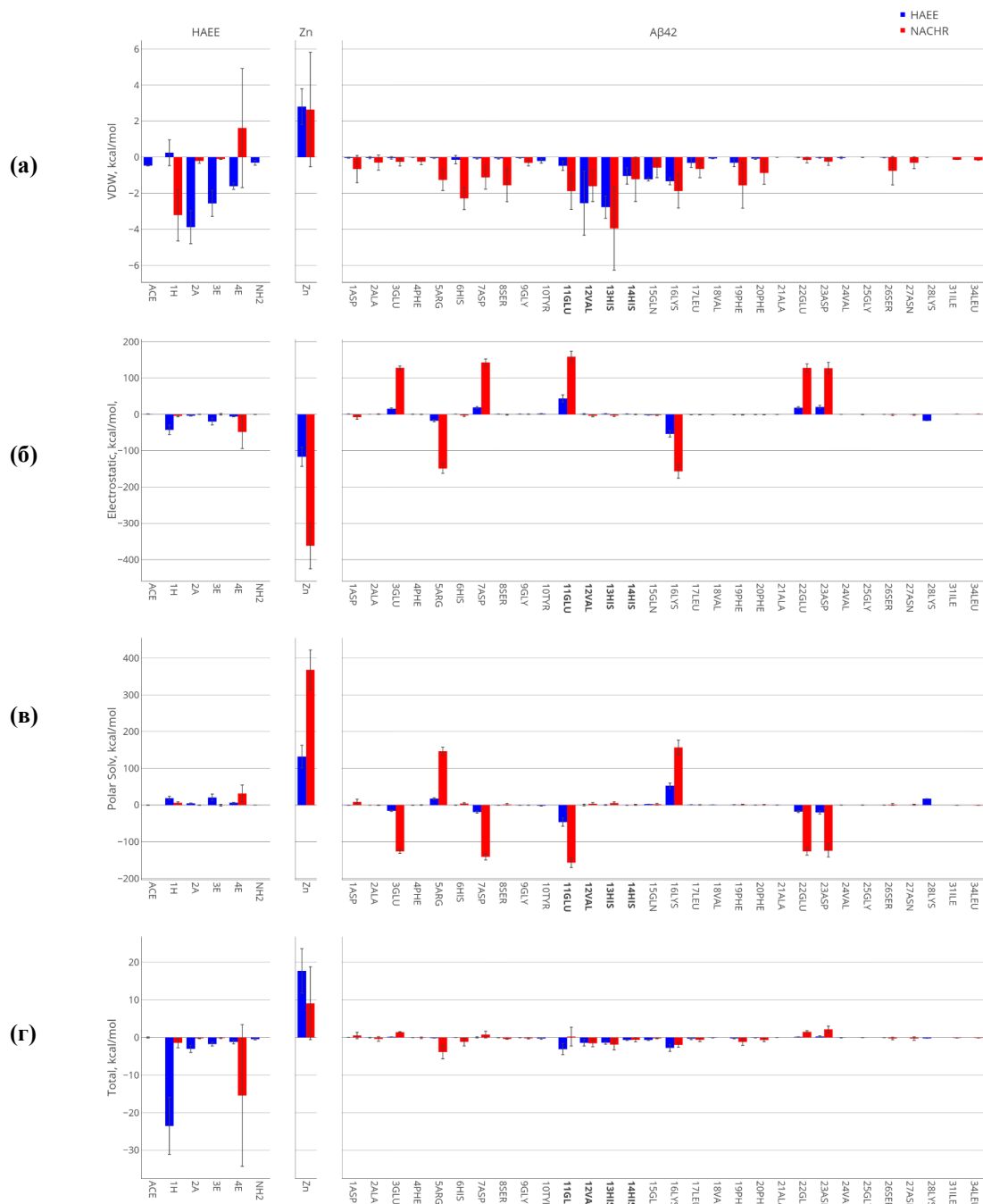


Рис. 5. Сравнение вклада аминокислотных остатков в энергию связывания комплексов HAEE+Ab+Zn и pAChR+Ab+Zn. По оси Y указана величина энергетической компоненты в Ккал/моль. Приведены значения для взаимодействий Ван-дер-ваальса (а), электростатических взаимодействий (б), полярных взаимодействий (в) и суммарное значение (г). По оси X — номер и обозначение аминокислотного остатка. Отображаются только аминокислотные остатки, находящиеся в интерфейсе связывания и на расстоянии не более 15 Å от интерфейса связывания. Первым блоком идут аминокислотные остатки модифицированной формы тетрапептида Ас-НАЕЕ-NH₂, далее – Zn, затем отражены аминокислотные остатки pAChR. Жирным шрифтом выделены аминокислотные остатки, находящиеся непосредственно в интерфейсе (11Glu – 14His).

Интересно отметить, что наличие цинка не уменьшает геометрические флуктуации структур в целом и друг относительно друга, но при этом понижает энергию связывания.

Наиболее перспективными для сравнительного анализа показали себя комплексы НАЕЕ+Аβ+Zn и nAChR+Аβ+Zn. Рассмотрим детально вклад аминокислотных остатков интерфейсов этих комплексов в сравнении друг с другом (рис. 5).

Важным моментом является тот факт, что в тетрапептиде НАЕЕ наибольший вклад в связывание вносит остаток гистидина (1H), в то время как в соответствующей последовательности рецептора наибольший вклад вносит второй остаток глутамата (4E). Стоит отметить, что белковое окружение интерфейса связывания в области НАЕЕ рецептора ограничивает число степеней свободы а.о. по сравнению с тетрапептидом НАЕЕ, который лишен подобных стерических затруднений.

Интерфейсы комплексов по области НАЕЕ схожи: наблюдается вклад Ван-дерваальсовых и электростатических взаимодействий (рис. 5). Интерфейсы со стороны Аβ для малого №1 и большого №4 комплексов очень схожи. В стабилизации этих комплексов участвует прежде всего область EVNH (Ван-дерваальсовы взаимодействия), а также электростатические взаимодействия по 5R и 16K (со стороны Аβ) и сольватационные взаимодействия по 11E, 22E и 23D (рис. 5).

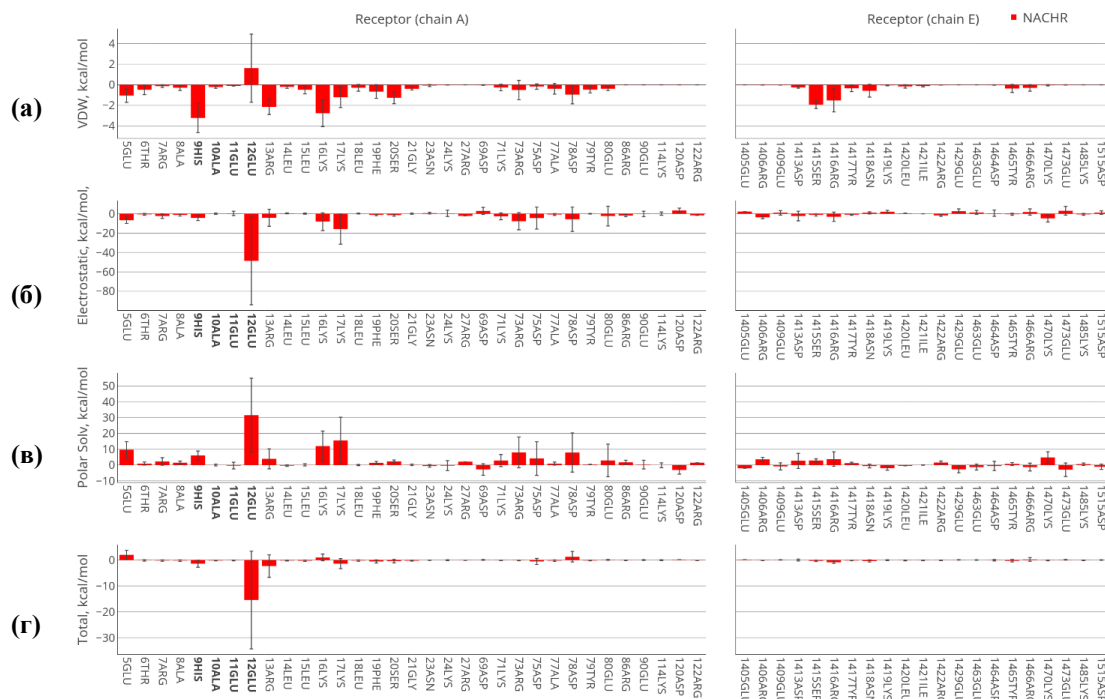


Рис. 6. Декомпозиция вклада аминокислотных остатков в энергию связывания только для рецептора nAChR (цепи А, Е). На всех рисунках по оси Y указана величина энергетической компоненты в Ккал/моль. Приведены значения для взаимодействий Ван-дер-ваальса (а), электростатических взаимодействий (б), полярных взаимодействий (в) и суммарное значение (г). По оси X — номер и обозначение аминокислотного остатка. Отображаются только аминокислотные остатки, находящиеся в интерфейсе связывания и на расстоянии не более 15 Å от интерфейса связывания. Первым блоком отражены аминокислотные остатки nAChR, цепь А. Жирным шрифтом выделены аминокислотные остатки, находящиеся непосредственно в интерфейсе 9HIS-12GLU, вторым блоком – аминокислотные остатки nAChR, цепь Е.

По результатам МД экспериментов в рецепторе nAChR помимо области -НАЕЕ- участвуют в стабилизации комплекса №4 за счет Ван-дерваальсовых взаимодействий аминокислоты в составе двух областей 13K-23D и 71K-80E и за счёт электростатических взаимодействий 15L, 17K, 71K-78D (рис. 6). Вероятно, эти взаимодействия также определяют более низкие значения энергии связывания

комплекса №4 по сравнению с комплексом №1.

ОБСУЖДЕНИЕ

Небольшие пептиды – ди-, три-, тетрапептиды обладают значительным терапевтическим потенциалом. Источником циркулирующих пептидов в крови является процессинг, созревание и деградация эндогенных белков. Другим источником циркулирующих пептидов является микробиом. В кровотоке здорового человека может содержаться 900 и более пептидов, которые представляют фрагменты бактериальных белков преимущественно кишечной биоты. Интересно, что содержание бактериальных пептидов не является следовым и соответствует диапазону средне представленных белков плазмы от 0.1 нМ до 1 мкМ, которые успешно детектируются методами tandemной масс-спектрометрии [70].

Циркулирующий пептидом крови является индикатором состояния здоровья и патологии организма. Биоактивные пептиды активно участвуют в регуляции биологических процессов. Ряд пептидов обладают широким спектром терапевтических эффектов, как антиоксидантные, антитромботические, противомикробные и иммуномодулирующие, противодиабетические [71]. В последние годы в литературе активно обсуждаются малые пептиды в качестве перспективных диагностических и прогностических маркеров нейродегенеративных заболеваний. Уровень содержания некоторых ди- и три-пептидов изменяется в плазме крови, спинномозговой жидкости и тканях мозга при нейродегенеративных заболеваниях. Так, дипептиды карнозин (β -аланил-L-гистидин) и гомокарнозин (γ -аминомасляная кислота - гистидин) участвуют в защите нейронов от окислительного стресса [72–75]. Снижение уровня этих дипептидов обнаружено в спинномозговой жидкости у пациентов с болезнью Альцгеймера [76–78]. Другой дипептид ансерин (β -аланил-3-метил-L-гистидин) участвует в протекции нейроваскулярных структур, состоящих из эндотелиальных клеток, перицитов и глиальных клеток [79, 80], а также предотвращает накопление токсичных α -синуклеиновых агрегатов при болезни Паркинсона [81, 82]. При боковом амиотрофическом склерозе выявлены изменения в концентрации трипептида глутатиона (γ -глутамил-цистеинил-глицин), участвующего в регуляции глутаматергической передачи и нейровоспаления. Глутатион является ключевым антиоксидантом, защищающим мотонейроны от оксидативного повреждения [83, 84]. Также глутатион играет ключевую роль в защите олигодендроцитов от повреждения при рассеянном склерозе, а его снижение коррелирует с прогрессированием заболевания [85, 86].

Кровь обеспечивает обмен и доставку биомолекул между всеми органами и тканями. Биоактивные пептиды могут преодолевать гистогематические барьеры, а также гематоэнцефалический барьер (ГЭБ). Так, большинство нейропептидов присутствует как в центральной нервной системе, так и в крови [87, 88]. В ряде исследований показано, что несмотря на серьезные ограничения некоторые пептиды и регуляторные белки способны преодолевать ГЭБ посредством транспортных систем и выполнять функцию информационных молекул между периферией и мозгом. Такой транспорт может происходить в одном направлении кровь-мозг, мозг-кровь или в обоих направлениях [89].

Объектом нашего исследования является модифицированная форма пептида НАЕЕ, ацетилированная по N-концу и амидированная по C-концу. Данный пептид с соответствующими модификациями является диагностическим биомаркером крови для нейродегенеративных заболеваний, в том числе болезни Альцгеймера [90, 91]. Такое сочетание посттрансляционного модифицирования, вероятно, может осуществляться ферментативными системами микробиома. Ацетилирование гистидина в присутствии ацетил-КоА осуществляет гистидин N-ацетилтрансфераза (EC 2.3.1.33, HICAT). На сегодня этот фермент обнаружен только у холоднокровных, у человека известен

ортолог NAT16, который проявляет лишь следовую активность HISAT [92]. Процесс амидирования остатков D-глутамата известен у бактерий и важен в поддержании целостности клеточной стенки [93]. Однако данная гипотеза требует экспериментальной проверки.

Можно предположить, что независимо от происхождения и локализации (кровоток или мозг) НАЕЕ в присутствии цинка способен связывать Аβ. Подобное взаимодействие с Аβ реализуется у рецептора nAChR, который также содержит в качестве интерфейса взаимодействия участок НАЕЕ. Интерфейс локализован во внеклеточном N-концевом домене рецептора nAChR с координатами 35–38 (P43681) и доступен для Аβ. НАЕЕ локализован в α-спирали и относится к функциональному домену Acetylcholine Binding Protein (2.70.170) по иерархической аннотации CATH (www.cathdb.info). Наше исследование показало, что комплексы пептида НАЕЕ и рецептора nAChR с Аβ в присутствии цинка устойчивы, природа взаимодействия и стабилизации комплексов схожа. При этом многоатомный комплекс nAChR+Аβ более устойчив, в том числе благодаря более обширному региону взаимодействия.

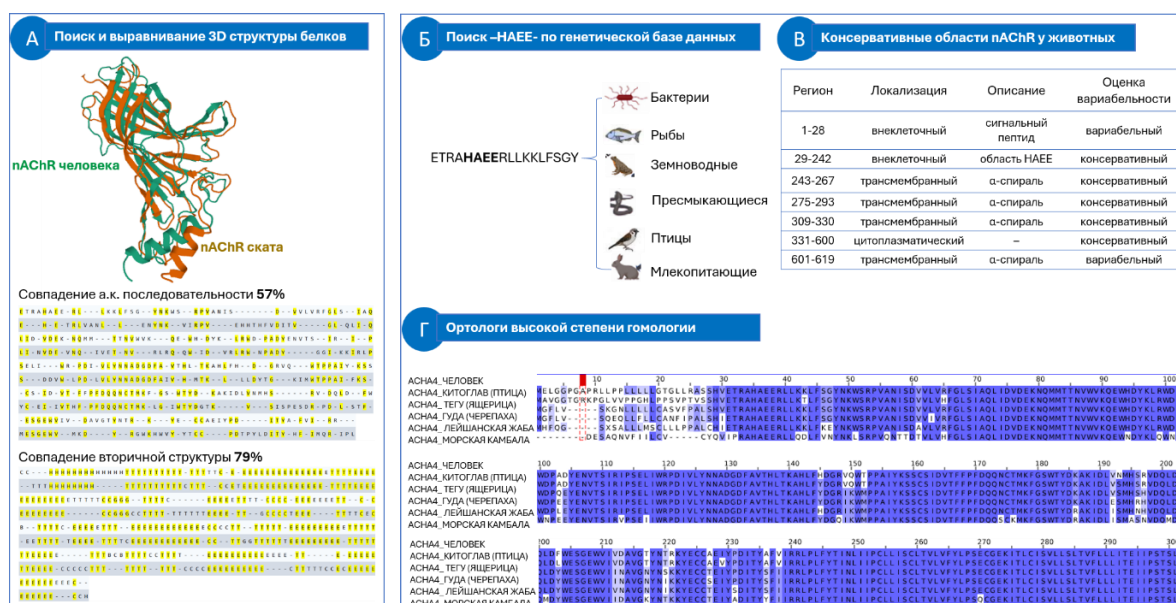


Рис. 7. Филогенетический анализ. (А) Выровненные ленточные модели структуры nAChR человека P43681 (зеленый цвет) и белка P02711 скаута (красный цвет). Результаты выравнивания аминокислотных последовательностей шаблона и белка P02711 скаута (совпадение аминокислотной последовательности, %), а также элементов вторичной структуры (совпадение вторичной структуры, %). Желтым цветом указаны совпадения символов. **(Б)** Организмы, протеом которых содержит белок с последовательностью ETRAHAEEERLLKKLFSGY по результатам поиска BLAST на платформе UniProt. **(В)** Сведения о консервативных областях аминокислотной последовательности nAChR у животных. **(Г)** Выравнивание полной последовательности белка nAChR человека P43681 для других организмов: китоглав (Птицы), тегу (Ящерицы), гуда (Черепахи), лейшанская жаба (Жабы), морская камбала (Камбала) в виде сравнения полной последовательности и приближения области, содержащей НАЕЕ. Представители видов были выбраны случайным образом из результатов поиска BLAST на платформе UniProt.

В филогенетическом отношении анализ происхождения функционального элемента рецептора nAChR, содержащего участок НАЕЕ, показал высокий уровень сходства по топологии, а также по аминокислотной последовательности ортологов у организмов различной сложности организации (рис. 7). Поиск схожих трехмерных структур по отношению к ацетилхолин-связывающему домену человека (P43681) выявил 1264 структуры белков, совпадение по топологии для которых составило 80 % и выше, а совпадение аминокислотной последовательности с шаблоном около 40 % (пример

представлен на рис. 7,а). Топология крупного функционального домена рецептора nAChR встречается в разных формах организации от млекопитающих, амфибий, рыб до червей, моллюсков и даже бактерий. Выявленные белки являются участниками глицинергической синаптической и ацетилхолиновой передачи сигнала, связывания глутамата и ацетилхолина, регуляции активности трансмембранного сигнального и нейротрансмиттерного рецептора.

Анализ происхождения участка HAEE выполнен для N-концевой последовательности α -спирали ETRAHAEERLLKKLFSGY, содержащей последовательность HAEE в генетической базе данных белковых последовательностей Swiss-Prot (Release 2024_06). Такая последовательность α -спирали nAChR обнаружена у широкого круга таксономических групп организмов, в том числе у термофильных грамотрицательных бактерий класса *Chloroflexia*. Начиная с холонокровных животных и далее по филогенетическому дереву у теплокровных, обнаруживаются ортологи высокой степени гомологии (рис. 7,б). При этом аминокислотная последовательность внеклеточного домена nAChR является крайне консервативной при наличии изменений в линкерной N-концевой последовательности (перед спиралью HAEE) и в трансмембранной и внутриклеточной частях белка (рис. 7,в). Область с HAEE при этом является одним из наиболее стабильных участков этого консервативного региона (рис. 7,г).

Филогенетический анализ происхождения последовательности ETRAHAEERLLKKLFSGY (N-концевая α -спираль) nAChR человека показал, что последовательность может быть выявлена в различных по сложности организации организмах, начиная с бактерий. Анализ полной последовательности nAChR субъединицы 4 человека выявил высокоомологичные ортологи со схожей биологической функцией у большинства из самых многочисленных классов царства Животные. Белки, гомологичные по последовательности субъединице 4 nAChR человека (P43681) были выявлены в 537 организмах, в том числе млекопитающие ($N = 105$), птицы ($N = 308$), пресмыкающиеся ($N = 27$), земноводные ($N = 19$) и рыбы ($N = 78$). В результате кластеризации гомологи белка разделены на четыре кластера. Первый кластер ($N = 101$) содержит белки исключительно млекопитающих, включая человека, при этом включает практически всех исследованных млекопитающих. Для этого кластера среднее внутреннее генетическое расстояние составляет 0.17, что свидетельствует о некоторой разнородности полной последовательностей nAChR субъединицы 4 среди участников кластера, при этом среднее расстояние до организмов, не отнесенных к первому кластеру, составляет 0.36. Второй кластер ($N = 354$) состоит преимущественно из таксономических групп класса птиц, пресмыкающихся и земноводных. Второй кластер однороден (среднее генетическое расстояние внутри кластера – 0.095). Практически все лучепёрые рыбы вошли в третий кластер ($N = 63$), внутри которого наблюдается достаточно низкая однородность при наибольшей отдаленности от других (среднее генетическое расстояние внутри кластера – 0.29, вне кластера – 0.44). Отдельные виды рыб, птиц и земноводных сформировали четвертый кластер ($N = 19$).

Необходимо отметить, что во всех кластерах, кроме четвертого, подавляющее число последовательностей содержит участок HAEE в неизменном виде. В четвертом кластере последовательность найдена только для белков 12 организмов. Полная последовательность α -спирали (ETRAHAEERLLKKLFSGY) найдена в 52 % и 87 % белков первого и второго кластера, соответственно, но не выявлена в третьем и четвертом. Последовательность α -спирали встречается у 93 % видов птиц, 53 % млекопитающих, 81–90 % пресмыкающихся (в зависимости от отряда). Абсолютные совпадения последовательности не выявлены у земноводных и рыб. Таким образом, последовательность α -спирали является консервативной у исследованных видов, несовпадения обусловлены возникновением аминокислотных замен (точечных

мутаций). Данный N-концевой участок является частью высококонсервативного домена (рис. 7,г).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Данная работа посвящена исследованию возможности модифицированной формы тетрапептида НАЕЕ конкурировать с ацетилхолиновым рецептором по взаимодействию с Аβ: изучению интерфейсов связывания ацетилхолинового рецептора и Аβ, а также модифицированной формы тетрапептида НАЕЕ и Аβ; изучению стабильности комплексов с помощью молекулярно-динамического моделирования. Эндогенные молекулярные факторы белковой природы ацетилхолиновый рецептор и Аβ ассоциированы с патогенезом широкого спектра нейродегенеративных заболеваний. Вовлеченность nAChR и Аβ в патогенез нейродегенеративных заболеваний определяет их высокую медицинскую значимость. Модифицированная форма тетрапептида НАЕЕ рассматривается как кандидатный маркер нейродегенеративных заболеваний с нейропротекторными свойствами.

В ходе настоящего исследования нами с помощью молекулярного моделирования построена трехмерная структура модифицированной формы тетрапептида Ас-НАЕЕ-NH₂; методом молекулярного докинга построены комплексы модифицированной формы тетрапептида и Аβ, а также рецептора nAChR и Аβ в присутствии и без катиона цинка; для сравнительной оценки стабильности сформированных белковых комплексов проведены молекулярно-динамические эксперименты.

Нами было показано, что комплекс №2 (НАЕЕ+Аβ) не стабилен в молекулярно-динамическом эксперименте: комплекс диссоциирует на 40–60 нс. Наличие в комплексе цинка приводит к стабилизации и понижению значения энергии связывания по сравнению с комплексом без цинка. Стабилизирующий эффект цинка на комплекс №1 (НАЕЕ+Аβ+Zn) подтверждается изменением геометрических и термодинамических показателей. Так, снижается существенно значение флуктуаций C_α-атомов в МД эксперименте (снижение RMSD ~30 %), понижается в интерфейсе площадь, доступная на растворитель (снижение SASA ~13 %), по сравнению с аналогичными показателями комплекса без цинка. Наблюдается изменение величины энергии связывания в комплексе с цинком (–25.5 кКал/моль по сравнению с -6.7 кКал/моль без цинка).

В большом комплексе №4 (nAChR+Аβ+Zn) ион цинка обуславливает подобные малому комплексу эффекты, но они менее выражены в абсолютных значениях геометрических показателей (RMSD, SASA интерфейса). Комплекс №3 (nAChR+Аβ) стабилен независимо от наличия в интерфейсе цинка. Однако в присутствии цинка комплекс более стабилен. Среди исследованных комплексов комплекс №4 (nAChR+Аβ+Zn) является наиболее стабильным, комплекс №2 (НАЕЕ+Аβ) – наименее стабильным. Проведенный сравнительный анализ стабильности исследуемых комплексов указывает на важную роль цинка в стабилизации комплексов.

Важным результатом филогенетического анализа происхождения N-концевой последовательности nAChR (длиной 18 аминокислот) стало выявление высокой гомологии ортологов среди организмов царства Животные. При этом аминокислотная последовательность внеклеточного домена nAChR является крайне консервативной как в области N-концевой последовательности, содержащей НАЕЕ (за исключением сигнальной последовательности), так и в трансмембранных и внутриклеточной областях белка.

Работа выполнена в рамках реализации и при финансовой поддержке проекта «Моделирование комплексов белковой природы» (Договор №02 ЦКП-2025 от 14.01.2025 года).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Feigin V.L., Vos T., Nichols E., Owolabi M.O., Carroll W.M., Dichgans M., Deuschl G., Parmar P., Brainin M., Murray C. The Global Burden of Neurological Disorders: Translating Evidence into Policy. *Lancet Neurol.* 2020. V. 19. P. 255–265. doi: [10.1016/S1474-4422\(19\)30411-9](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(19)30411-9)
2. Steinmetz J.D., Seeher K.M., Schiess N., Nichols E., Cao B., Servili C., Cavallera V., Cousin E., Hagins H., Moberg M.E., et al. Global, Regional, and National Burden of Disorders Affecting the Nervous System, 1990–2021: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2021. *Lancet Neurol.* 2024. V.23. P. 344–381. doi: [10.1016/S1474-4422\(24\)00038-3](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(24)00038-3)
3. Vallés A.S., Barrantes F.J. Nicotinic Acetylcholine Receptor Dysfunction in Addiction and in Some Neurodegenerative and Neuropsychiatric Diseases. *Cells.* 2023. V. 12. No. 16. doi: [10.3390/cells12162051](https://doi.org/10.3390/cells12162051)
4. Blennow K., de Leon M.J., Zetterberg H. Alzheimer's disease. *The Lancet.* 2006. V. 368. P. 387–403. doi: [10.1016/s0140-6736\(06\)69113-7](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(06)69113-7)
5. Masters C.L., Simms G., Weinman N.A., Multhaup G., McDonald B.L., Beyreuther K. Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1985. V. 82. P. 4245–4249. doi: [10.1073/pnas.82.12.4245](https://doi.org/10.1073/pnas.82.12.4245)
6. Cras P., Kawai M., Lowery D., Gonzalez-DeWhitt P., Greenberg B., Perry G. Senile plaque neurites in Alzheimer disease accumulate amyloid precursor protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1991. V. 88. P. 7552–7556. doi: [10.1073/pnas.88.17.7552](https://doi.org/10.1073/pnas.88.17.7552)
7. Akaike A., Izumi Y. Overview. In: *Nicotinic Acetylcholine Recept Signal Neuroprotection.* Eds. Akaike A. Shimohama S., Misu Y. Singapore: Springer, 2018. doi: [10.1007/978-981-10-8488-1](https://doi.org/10.1007/978-981-10-8488-1)
8. Willem M., Tahirovic S., Busche M.A., Ovsepian S.V., Chafai M., Kootar S., Hornburg D., Lewis D.B.E., Moore S., Daria A., et al. η -Secretase processing of APP inhibits neuronal activity in the hippocampus. *Nature.* 2015. V. 526. P. 443–447. doi: [10.1038/nature14864](https://doi.org/10.1038/nature14864)
9. Du X., Wang X., Geng M. Alzheimer's disease hypothesis and related therapies. *Transl. Neurodegener.* 2018. V. 7. doi: [10.1186/s40035-018-0107-y](https://doi.org/10.1186/s40035-018-0107-y)
10. Cummings J., Aisen P.S., Du Bois B., Frölich L., Jack C.R., Jones R.W., Morris J.C., Raskin J., Dowsett S.A., Scheltens P. Drug development in Alzheimer's disease: the path to 2025. *Alz. Res. Ther.* 2016. V. 8. doi: [10.1186/s13195-016-0207-9](https://doi.org/10.1186/s13195-016-0207-9)
11. Gandy S., Sano M. Alzheimer disease: Solanezumab-prospects for meaningful interventions in AD? *Nat. Rev. Neurol.* 2015. V. 11. P. 669–670. doi: [10.1038/nrneurol.2015.218](https://doi.org/10.1038/nrneurol.2015.218)
12. Karran E., De Strooper B. The amyloid hypothesis in Alzheimer disease: new insights from new therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2022. V. 21. P. 306–318. doi: [10.1038/s41573-022-00391-w](https://doi.org/10.1038/s41573-022-00391-w)
13. Lau H.H.C., Ingelsson M., Watts J.C. The existence of A β strains and their potential for driving phenotypic heterogeneity in Alzheimer's disease. *Acta. Neuropathol.* 2021. V. 142. P. 17–39. doi: [10.1007/s00401-020-02201-2](https://doi.org/10.1007/s00401-020-02201-2)
14. Alves G., Brønnick K., Aarsland D., Blennow K., Zetterberg H., Ballard C., Kurz M.W., Andreasson U., Tysnes O.B., Larsen J.P., et al. CSF amyloid-beta and tau proteins, and cognitive performance, in early and untreated Parkinson's disease: the Norwegian ParkWest study. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 2010. V. 81. P. 1080–1086. doi: [10.1136/jnnp.2009.199950](https://doi.org/10.1136/jnnp.2009.199950)

15. Matrone C., Iannuzzi F., Annunziato L. The Y682ENPTY687 motif of APP: Progress and insights toward a targeted therapy for Alzheimer's disease patients. *Ageing Res. Rev.* 2019. V. 52. P. 120–128. doi: [10.1016/j.arr.2019.04.003](https://doi.org/10.1016/j.arr.2019.04.003)
16. Hudson G., Stutt A., Eccles M., Robinson L., Allcock L.M., Wesnes K.A., Chinnery P.F., Burn D.J. Genetic variation of CHRNA4 does not modulate attention in Parkinson's disease. *Neurosci. Lett.* 2010. V. 479. P. 123–125. doi: [10.1016/j.neulet.2010.05.041](https://doi.org/10.1016/j.neulet.2010.05.041)
17. Lim E.W., Aarsland D., Ffytche D., Taddei R.N., van Wamelen D.J., Wan Y.-M., Tan E.K., Ray Chaudhuri K. Amyloid- β and Parkinson's disease. *J. Neurol.* 2019. V. 266. P. 2605–2619. doi: [10.1007/s00415-018-9100-8](https://doi.org/10.1007/s00415-018-9100-8)
18. Kim Y.S., Joh T.H. Microglia, major player in the brain inflammation: their roles in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Exp. Mol. Med.* 2006. V. 38. P. 333–347. doi: [10.1038/emmm.2006.40](https://doi.org/10.1038/emmm.2006.40)
19. Shimohama S., Kawamata J. Roles of Nicotinic Acetylcholine Receptors in the Pathology and Treatment of Alzheimer's and Parkinson's Diseases. In: *Nicotinic Acetylcholine Recept Signal Neuroprotection*. Springer, 2018. P. 137–158. doi: https://doi.org/10.1007/978-981-10-8488-1_8
20. Compta Y., Martí M.J., Ibarretxe-Bilbao N., Junqué C., Valldeoriola F., Muñoz E., Ezquerra M., Ríos J., Tolosa E. Cerebrospinal tau, phospho-tau, and beta-amyloid and neuropsychological functions in Parkinson's disease. *Mov. Disord.* 2009. V. 24. P. 2203–2210. doi: [10.1002/mds.22594](https://doi.org/10.1002/mds.22594)
21. Montine T.J., Shi M., Quinn J.F., Peskind E.R., Craft S., Ginhina C., Chung A.K., Kim H., Galasko D.R., Jankovic J., et al. CSF A β (42) and tau in Parkinson's disease with cognitive impairment. *Mov. Disord.* 2010. V. 25. P. 2682–2685. doi: [10.1002/mds.2328](https://doi.org/10.1002/mds.2328)
22. Siderowf A., Xie S.X., Hurtig H., Weintraub D., Duda J., Chen-Plotkin A., Shaw M. L., Van Deerlin V., Trojanowski Q.J., Clark C., et al. CSF amyloid {beta} 1-42 predicts cognitive decline in Parkinson disease. *Neurology*. 2010. V. 75. P. 1055–1061. doi: [10.1212/WNL.0b013e3181f39a78](https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3181f39a78)
23. Shi M., Bradner J., Hancock A.M., Chung K.A., Quinn J.F., Peskind E.R., Galasko D., Jankovic J., Zabetian C.P., Kim H.M., et al. Cerebrospinal fluid biomarkers for Parkinson disease diagnosis and progression. *Ann. Neurol.* 2011. V. 69. P. 570–580. doi: [10.1002/ana.22311](https://doi.org/10.1002/ana.22311)
24. Wang Y., Hancock A.M., Bradner J., Chung K.A., Quinn J.F., Peskind E.R., Galasko D., Jankovic J., Zabetian C.P., Kim H.M., et al. Complement 3 and factor h in human cerebrospinal fluid in Parkinson's disease, Alzheimer's disease, and multiple-system atrophy. *Am. J. Pathol.* 2011. V. 178. P. 1509–1516. doi: [10.1016/j.ajpath.2011.01.006](https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.01.006)
25. Chu C.J., Yang Y.C., Wei J.X., Zhang L. Association of nicotinic acetylcholine receptor subunit alpha-4 polymorphisms with smoking behaviors in Chinese male smokers. *Chin. Med. J. (Engl)*. 2011. V. 124. No. 11. P. 1634–1638.
26. Malnar M., Hecimovic S., Mattsson N., Zetterberg H. Bidirectional links between Alzheimer's disease and Niemann-Pick type C disease. *Neurobiol. Dis.* 2014. V. 72. doi: [10.1016/j.nbd.2014.05.03](https://doi.org/10.1016/j.nbd.2014.05.03)
27. Martone R., Gonzales C., Ramaswamy G. Niemann-Pick Type C Disease: At the Nexus of Neurodegenerative and Neurodevelopmental Disorders. *J. Park. Dis. Alzheimer. Dis.* 2019. V. 6. No. 1. Article No 10.
28. Huang Y., Yu S., Wu Z., Tang B. Genetics of hereditary neurological disorders in children. *Transl. Pediatr.* 2014. V. 3. P. 108–119. doi: [10.3978/j.issn.2224-4336.2014.03.04](https://doi.org/10.3978/j.issn.2224-4336.2014.03.04)
29. Mattsson N., Olsson M., Gustavsson M.K., Kosicek M., Malnar M., Månsson J.-E., Blomqvist M., Gobom J., Andreasson U., Brinkmalm G., et al. Amyloid- β metabolism

- in Niemann-Pick C disease models and patients. *Metab. Brain. Dis.* 2012. V. 27. P. 573–85. doi: [10.1007/s11011-012-9332-8](https://doi.org/10.1007/s11011-012-9332-8)
30. Shin S.D., Shin A., Mayagoitia K., Siebold L., Rubini M., Wilson C.G., Bellinger D.L., Soriano S. Loss of amyloid precursor protein exacerbates early inflammation in Niemann-Pick disease type C. *J. Neuroinflammation*. 2019. V. 16. doi: [10.1186/s12974-019-1663-5](https://doi.org/10.1186/s12974-019-1663-5)
 31. Jin L.-W., Shie F.-S., Maezawa I., Vincent I., Bird T. Intracellular accumulation of amyloidogenic fragments of amyloid-beta precursor protein in neurons with Niemann-Pick type C defects is associated with endosomal abnormalities. *Am. J. Pathol.* 2004. V. 164. P. 975–985. doi: [10.1016/s0002-9440\(10\)63185-9](https://doi.org/10.1016/s0002-9440(10)63185-9)
 32. Malnar M., Kosicek M., Mitterreiter S., Omerbasic D., Lichtenthaler S.F., Goate A., Hecimovic S. Niemann-Pick type C cells show cholesterol dependent decrease of APP expression at the cell surface and its increased processing through the beta-secretase pathway. *Biochim. Biophys. Acta.* 2010. V. 1802. P. 682–691. doi: [10.1016/j.bbadis.2010.05.006](https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2010.05.006)
 33. Stefulj J., Peric M., Malnar M., Kosicek M., Schweinzer C., Zivkovic J., Scholler M., Panzenboeck U., Hecimovic S. Pharmacological activation of LXRs decreases amyloid- β levels in Niemann-Pick type C model cells. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 2013. V. 14. P. 582–593. doi: [10.2174/138920101131400224](https://doi.org/10.2174/138920101131400224)
 34. Mattsson N., Zetterberg H., Bianconi S., Yanjanin N.M., Fu R., Månsson J.-E., Porter F.D., Blennow K. Miglustat treatment may reduce cerebrospinal fluid levels of the axonal degeneration marker tau in niemann-pick type C. *JIMD Rep.* 2012. V. 3. P. 45–52. doi: [10.1007/8904_2011_47](https://doi.org/10.1007/8904_2011_47)
 35. Stern S., Crisamore K., Schuck R., Pacanowski M. Evaluation of the landscape of pharmacodynamic biomarkers in Niemann-Pick Disease Type C (NPC). *Orphanet J. Rare Dis.* 2024. V. 19. doi: [10.1186/s13023-024-03233-7](https://doi.org/10.1186/s13023-024-03233-7)
 36. Bryson J.B., Hobbs C., Parsons M.J., Bosch K.D., Pandraud A., Walsh F.S., Doherty P., Greensmith L. Amyloid precursor protein (APP) contributes to pathology in the SOD1(G93A) mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Hum. Mol. Genet.* 2012. V. 21. P. 3871–3882. doi: [10.1093/hmg/dds215](https://doi.org/10.1093/hmg/dds215)
 37. Muresan V., Villegas C., Muresan Z.L. Functional interaction between amyloid- β precursor protein and peripherin neurofilaments: a shared pathway leading to Alzheimer's disease and amyotrophic lateral sclerosis? *Neurodegener. Dis.* 2014. V. 13. P. 122–125. doi: [10.1159/000354238](https://doi.org/10.1159/000354238)
 38. Matrone C. The paradigm of amyloid precursor protein in amyotrophic lateral sclerosis: The potential role of the 682YENPTY687 motif. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 2023. V. 21. P. 923–30. doi: [10.1016/j.csbj.2023.01.008](https://doi.org/10.1016/j.csbj.2023.01.008)
 39. Matrone C. A new molecular explanation for age-related neurodegeneration: the Tyr682 residue of amyloid precursor protein. *Bioessays.* 2013. V. 35. P. 847–852. doi: [10.1002/bies.201300041](https://doi.org/10.1002/bies.201300041)
 40. Pathak N., Vimal S.K., Tandon I., Agrawal L., Hongyi C., Bhattacharyya S. Neurodegenerative Disorders of Alzheimer, Parkinsonism, Amyotrophic Lateral Sclerosis and Multiple Sclerosis: An Early Diagnostic Approach for Precision Treatment. *Metab. Brain Dis.* 2022. V. 37. P. 67–104. doi: [10.1007/s11011-021-00800-w](https://doi.org/10.1007/s11011-021-00800-w)
 41. Sabatelli M., Lattante S., Conte A., Marangi G., Luigetti M., Del Grande A., Chiò A., Corbo M., Giannini F., Mandrioli J., et al. Replication of association of CHRNA4 rare variants with sporadic amyotrophic lateral sclerosis: the Italian multicentre study. *Amyotroph. Lateral Scler.* 2012. V. 13. P. 580–584. doi: [10.3109/17482968.2012.704926](https://doi.org/10.3109/17482968.2012.704926)
 42. Sabatelli M., Eusebi F., Al-Chalabi A., Conte A., Madia F., Luigetti M., Mancuso I., Limatola C., Trettel F., Sobrero F., et al. Rare missense variants of neuronal nicotinic

- acetylcholine receptor altering receptor function are associated with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Hum. Mol. Genet.* 2009. V. 18. P. 3997–4006. doi: [10.1093/hmg/ddp339](https://doi.org/10.1093/hmg/ddp339)
43. Jalaiei A., Asadi M.R., Daneshmandpour Y., Rezazadeh M., Ghafouri-Fard S. Clinical, molecular, physiologic, and therapeutic feature of patients with CHRNA4 and CHRNA2 deficiency: A systematic review. *J. Neurochem.* 2024. V. 169. doi: [10.1111/jnc.16200](https://doi.org/10.1111/jnc.16200)
 44. Couturier N., Hörner S.J., Nürnberg E., Joazeiro C., Hafner M., Rudolf R. Aberrant evoked calcium signaling and nAChR cluster morphology in a SOD1 D90A hiPSC-derived neuromuscular model. *Front. Cell. Dev. Biol.* 2024. V. 12. doi: [10.3389/fcell.2024.1429759](https://doi.org/10.3389/fcell.2024.1429759)
 45. Moriconi C., Di Angelantonio S., Piccioni A., Trettel F., Sabatelli M., Grassi F. Mutant human $\beta 4$ subunit identified in amyotrophic lateral sclerosis patients impairs nicotinic receptor function. *Pflugers Arch. – Eur. J. Physiol.* 2011. V. 461. P. 225–233. doi: [10.1007/s00424-010-0905-2](https://doi.org/10.1007/s00424-010-0905-2)
 46. Gentile A., Mori F., Bernardini S., Centonze D. Role of amyloid- β CSF levels in cognitive deficit in MS. *Clin. Chim. Acta.* 2015. V. 449. P. 23–30. doi: [10.1016/j.cca.2015.01.035](https://doi.org/10.1016/j.cca.2015.01.035)
 47. Stampanoni Bassi M., Garofalo S., Marfia G.A., Gilio L., Simonelli I., Finardi A., Furlan R., Sancesario G.M., Di Giandomenico J., Storto M., et al. Amyloid- β Homeostasis Bridges Inflammation, Synaptic Plasticity Deficits and Cognitive Dysfunction in Multiple Sclerosis. *Front. Mol. Neurosci.* 2017. V. 10. doi: [10.3389/fnmol.2017.00390](https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00390)
 48. Pietroboni A.M., Caprioli M., Carandini T., Scarioni M., Ghezzi L., Arighi A., Cioffi S., Cinnante C., Fenoglio C., Oldoni E., et al. CSF β -amyloid predicts prognosis in patients with multiple sclerosis. *Mult. Scler.* 2019. V. 25. P. 1223–1231. doi: [10.1177/1352458518791709](https://doi.org/10.1177/1352458518791709)
 49. Mizrachi T., Vaknin-Dembinsky A., Brenner T., Treinin M. Neuroinflammation Modulation via $\alpha 7$ Nicotinic Acetylcholine Receptor and Its Chaperone, RIC-3. *Molecules.* 2021. V. 26. doi: [10.3390/molecules26206139](https://doi.org/10.3390/molecules26206139)
 50. Reale M., Di Bari M., Di Nicola M., D'Angelo C., De Angelis F., Velluto L., Tata A.M. Nicotinic receptor activation negatively modulates pro-inflammatory cytokine production in multiple sclerosis patients. *Int. Immunopharmacol.* 2015. V. 29. P. 152–157. doi: [10.1016/j.intimp.2015.06.034](https://doi.org/10.1016/j.intimp.2015.06.034)
 51. Gatta V., Mengod G., Reale M., Tata A.M. Possible Correlation between Cholinergic System Alterations and Neuro/Inflammation in Multiple Sclerosis. *Biomedicines.* 2020. V. 8. doi: [10.3390/biomedicines8060153](https://doi.org/10.3390/biomedicines8060153)
 52. Di Bari M., Reale M., Di Nicola M., Orlando V., Galizia S., Porfilio I., Costantini E., D'Angelo C., Ruggieri S., Biagioni S., et al. Dysregulated Homeostasis of Acetylcholine Levels in Immune Cells of RR-Multiple Sclerosis Patients. *Int. J. Mol. Sci.* 2016. V. 17. doi: [10.3390/ijms17122009](https://doi.org/10.3390/ijms17122009)
 53. Meyer P., Kurtz K., Thomae E., Becker G., Schildan A., Patt M., Lobsien D., Hesse S., Bergh F.T., Sabri O. Reduced cortical $\alpha 4\beta 2^*$ nicotinic acetylcholine receptor binding and its relationship to impaired memory and attention in early stage multiple sclerosis: A 2-[18F]F-A-85380 (2FA) PET study. *J. Nucl. Med.* 2010. V. 51. P. 1792–1792.
 54. Barykin E.P., Garifulina A.I., Tolstova A.P., Anashkina A.A., Adzhubei A.A., Mezentsev Y.V., Shelukhina I.V., Kozin S.A., Tsetlin V.I., Makarov A.A. Tetrapeptide Ac-HAEE-NH₂ Protects $\alpha 4\beta 2$ nAChR from Inhibition by A β . *Int. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21. doi: [10.3390/ijms21176272](https://doi.org/10.3390/ijms21176272)
 55. Козин С.А., Барыкин Е.П., Митькевич В.А., Макаров А.А. Антиамилоидная терапия болезни Альцгеймера: современное состояние и перспективы. *Биохимия.* 2018. Т. 83. С. 1331–1342. doi: [10.1134/S0320972518090075](https://doi.org/10.1134/S0320972518090075)

56. Kozin S.A., Barykin E.P., Mitkevich V.A., Makarov A.A. Anti-amyloid Therapy of Alzheimer's Disease: Current State and Prospects. *Biochemistry (Moscow)*. 2018. V. 83. P. 1057–1067. doi: [10.1134/S0006297918090079](https://doi.org/10.1134/S0006297918090079)
57. Deigin V.I., Poluektova E.A., Beniashvili A.G., Kozin S.A., Poluektov Y.M. Development of Peptide Biopharmaceuticals in Russia. *Pharmaceutics*. 2022. V. 14. doi: [10.3390/pharmaceutics14040716](https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14040716)
58. Козин С.А., Макаров А.А. Конвергенция концепций патогенеза болезни Альцгеймера. *Молекулярная биология*. 2019. Т. 53. № 6. С. 1020–1028. doi: [10.1134/s0026898419060107](https://doi.org/10.1134/s0026898419060107)
59. Vilella A., Romoli B., Bodria M., Pons S., Maskos U., Zoli M. Evidence for a protective effect of the loss of $\alpha 4$ -containing nicotinic acetylcholine receptors on A β -related neuropathology in Tg2576 mice. *Front. Neurosci.* 2023. V. 17. doi: [10.3389/fnins.2023.1097857](https://doi.org/10.3389/fnins.2023.1097857)
60. Lin Y.-F., Cheng C.-W., Shih C.-S., Hwang J.-K., Yu C.-S., Lu C.-H. MIB: Metal Ion-Binding Site Prediction and Docking Server. *J. Chem. Inf. Model.* 2016. V. 56. P. 2287–2291. doi: [10.1021/acs.jcim.6b00407](https://doi.org/10.1021/acs.jcim.6b00407)
61. Mazzaferro S., Kang G., Natarajan K., Hibbs R.E., Sine S.M. Structural bases for stoichiometry-selective calcium potentiation of a neuronal nicotinic receptor. *Br. J. Pharmacol.* 2024. V. 181. P. 1973–1992. doi: [10.1111/bph.16321](https://doi.org/10.1111/bph.16321)
62. Santoro A., Grimaldi M., Buonocore M., Stillitano I., D'Ursi A.M. Exploring the Early Stages of the Amyloid A β (1-42) Peptide Aggregation Process: An NMR Study. *Pharm. (Basel)*. 2021. V. 14. No. 8. doi: [10.3390/ph14080732](https://doi.org/10.3390/ph14080732)
63. Van Zundert G.C.P., Rodrigues J.P.G.L.M., Trellet M., Schmitz C., Kastitis P.L., Karaca E., Melquiond A.S.J., van Dijk M., de Vries S.J., Bonvin A.M.J.J. The HADDOCK2.2 Web Server: User-Friendly Integrative Modeling of Biomolecular Complexes. *J. Mol. Biol.* 2016. V. 428. No. 4. P. 720–725. doi: [10.1016/j.jmb.2015.09.014](https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.09.014)
64. Tsvetkov P.O., Kulikova A.A., Golovin A.V., Tkachev Y.V., Archakov A.I., Kozin S.A., Makarov A.A. Minimal Zn²⁺ binding site of amyloid- β . *Biophys. J.* 2010. V. 99. doi: [10.1016/j.bpj.2010.09.015](https://doi.org/10.1016/j.bpj.2010.09.015)
65. Mitkevich V.A., Barykin E.P., Eremina S., Pani B., Katkova-Zhukotskaya O., Polshakov V.I., Adzhubei A.A., Kozin S.A., Mironov A.S., Makarov A.A., et al. Zn-dependent β -amyloid Aggregation and its Reversal by the Tetrapeptide HAEE. *Aging and Dis.* 2023. V. 14. No. 2. P. 309–318. doi: [10.14336/AD.2022.0827](https://doi.org/10.14336/AD.2022.0827)
66. Williams C.J., Headd J.J., Moriarty N.W., Prisant M.G., Videau L.L., Deis L.N., Verma V., Keedy D.A., Hintze B.J., Chen V.B., et al. MolProbity: More and better reference data for improved all-atom structure validation. *Protein Sci.* 2018. V. 27. P. 293–315. doi: [10.1002/pro.3330](https://doi.org/10.1002/pro.3330)
67. Valdés-Tresanco M.S., Valdés-Tresanco M.E., Valiente P.A., Moreno E. gmx_MMPBSA: A New Tool to Perform End-State Free Energy Calculations with GROMACS. *J. Chem. Theory Comput.* 2021. V. 17. No. 10. P. 6281–6291. doi: [10.1021/acs.jctc.1c00645](https://doi.org/10.1021/acs.jctc.1c00645)
68. Miller B.R., McGee T.D., Swails J.M., Homeyer N., Gohlke H., Roitberg A.E. MMPBSA.py: An Efficient Program for End-State Free Energy Calculations. *J. Chem. Theory Comput.* 2012. V. 8. No. 9. P. 3314–3321. doi: [10.1021/ct300418h](https://doi.org/10.1021/ct300418h)
69. Madeira F., Madhusoodanan N., Lee J., Eusebi A., Niewielska A., Tivey A.R.N., Lopez R., Butcher S. The EMBL-EBI Job Dispatcher Sequence Analysis Tools Framework in 2024. *Nucleic Acids Res.* 2024. V. 52. P. W521–W525. doi: [10.1093/nar/gkae241](https://doi.org/10.1093/nar/gkae241)
70. Arapidi G.P., Urban A.S., Osetrova M.S., Shender V.O., Butenko I.O., Bukato O.N., Kuznetsov A.A., Saveleva T.M., Nos G.A., Ivanova O.M., et al. Non-human peptides

- revealed in blood reflect the composition of intestinal microbiota. *BMC Biol.* 2024. V. 22. №1. doi: [10.1186/s12915-024-01975-1](https://doi.org/10.1186/s12915-024-01975-1)
71. Baig M.H., Ahmad K., Saeed M., Alharbi A.M., Barreto G.E., Ashraf G.M., Choi I. Peptide based therapeutics and their use for the treatment of neurodegenerative and other diseases. *Biomed. Pharmacother.* 2018. V. 103. P. 574–581. doi: [10.1016/j.biopha.2018.04.025](https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.04.025)
 72. Ding Q., Tanigawa K., Kaneko J., Totsuka M., Katakura Y., Imabayashi E., Matsuda H., Hisatsune T. Anserine/Carnosine Supplementation Preserves Blood Flow in the Prefrontal Brain of Elderly People Carrying APOE e4. *Aging. Dis.* 2018. V. 9. P. 334–345. doi: [10.14336/ad.2017.0809](https://doi.org/10.14336/ad.2017.0809)
 73. Hipkiss A.R. Aging risk factors and Parkinson's disease: contrasting roles of common dietary constituents. *Neurobiol. Aging.* 2014. V. 35. No. 6. P. 1469–1472. doi: [10.1016/j.neurobiolaging.2013.11.032](https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2013.11.032)
 74. Boldyrev A.A., Aldini G., Derave W. Physiology and pathophysiology of carnosine. *Physiol. Rev.* 2013. V. 93. No. 4. P. 1803–1845. doi: [10.1152/physrev.00039.2012](https://doi.org/10.1152/physrev.00039.2012)
 75. Hipkiss A.R. On the Relationship between Energy Metabolism, Proteostasis, Aging and Parkinson's Disease: Possible Causative Role of Methylglyoxal and Alleviative Potential of Carnosine. *Aging. Dis.* 2017. V. 8. P. 334–345. doi: [10.14336/AD.2016.1030](https://doi.org/10.14336/AD.2016.1030)
 76. Bellia F., Vecchio G., Rizzarelli E. Carnosinases, their substrates and diseases. *Molecules.* 2014. V. 19. P. 2299–2329. doi: [10.3390/molecules19022299](https://doi.org/10.3390/molecules19022299)
 77. Blennow K., Hampel H., Weiner M., Zetterberg H. Cerebrospinal fluid and plasma biomarkers in Alzheimer disease. *Nat. Rev. Neurol.* 2010. V. 6. P. 131–144. doi: [10.1038/nrneurol.2010.4](https://doi.org/10.1038/nrneurol.2010.4)
 78. Perrin R.J., Craig-Schapiro R., Malone J.P., Shah A.R., Gilmore P., Davis A.E., Roe C.M., Peskind E.R., Li G., Galasko D.R., et al. Identification and Validation of Novel Cerebrospinal Fluid Biomarkers for Staging Early Alzheimer's Disease. *PLoS ONE.* 2011. V. 6. doi: [10.1371/journal.pone.0016032](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016032)
 79. Kaneko J., Enya A., Enomoto K., Ding Q., Hisatsune T. Anserine (beta-alanyl-3-methyl-L-histidine) improves neurovascular-unit dysfunction and spatial memory in aged AβPPswe/PSEN1dE9 Alzheimer's-model mice. *Sci. Rep.* 2017. V. 7. doi: [10.1038/s41598-017-12785-7](https://doi.org/10.1038/s41598-017-12785-7)
 80. Masuoka N., Yoshimine C., Hori M., Tanaka M., Asada T., Abe K., Hisatsune T. Effects of Anserine/Carnosine Supplementation on Mild Cognitive Impairment with APOE4. *Nutrients.* 2019. V. 11. doi: [10.3390/nu11071626](https://doi.org/10.3390/nu11071626)
 81. Wu G. Important roles of dietary taurine, creatine, carnosine, anserine and 4-hydroxyproline in human nutrition and health. *Amino Acids.* 2020. V. 52. P. 329–360. doi: [10.1007/s00726-020-02823-6](https://doi.org/10.1007/s00726-020-02823-6)
 82. Morais L.H., Boktor J.C., MahmoudianDehkordi S., Kaddurah-Daouk R., Mazmanian S.K. α-synuclein overexpression and the microbiome shape the gut and brain metabolome in mice. *Npj. Park. Dis.* 2024. V. 10. P. 1–12. doi: [10.1038/s41531-024-00816-w](https://doi.org/10.1038/s41531-024-00816-w)
 83. Kim K. Glutathione in the Nervous System as a Potential Therapeutic Target to Control the Development and Progression of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Antioxidants (Basel).* 2021. V. 10. No. 7. doi: [10.3390/antiox10071011](https://doi.org/10.3390/antiox10071011)
 84. Weiduschat N., Mao X., Hupf J., Armstrong N., Kang G., Lange D.J., Mitsumoto H., Shungu D.C. Motor cortex glutathione deficit in ALS measured *in vivo* with the J-editing technique. *Neurosci. Lett.* 2014. V. 570. P. 102–107. doi: [10.1016/j.neulet.2014.04.020](https://doi.org/10.1016/j.neulet.2014.04.020)
 85. Carvalho A.N., Lim J.L., Nijland P.G., Witte M.E., Van Horssen J. Glutathione in multiple sclerosis: more than just an antioxidant? *Mult. Scler.* 2014. V. 20. P. 1425–1431. doi: [10.1177/1352458514533400](https://doi.org/10.1177/1352458514533400)

86. Ferreira B., Mendes F., Osorio N., Caseiro A., Gabriel A., Valado A. Glutathione in multiple sclerosis. *Br. J. Biomed. Sci.* 2013. V. 70. P. 75–79. doi: [10.1080/09674845.2013.11669939](https://doi.org/10.1080/09674845.2013.11669939)
87. Hanas J.S., Hocker J.R.S., Vannarath C.A., Lerner M.R., Blair S.G., Lightfoot S.A., Hanas R.J., Couch J.R., Hershey L.A. Distinguishing Alzheimer’s Disease Patients and Biochemical Phenotype Analysis Using a Novel Serum Profiling Platform: Potential Involvement of the VWF/ADAMTS13 Axis. *Brain Sci.* 2021. V. 11. doi: [10.3390/brainsci11050583](https://doi.org/10.3390/brainsci11050583)
88. Kumar V., Patiyal S., Dhall A., Sharma N., Raghava G.P.S. B3Pred: A Random-Forest-Based Method for Predicting and Designing Blood–Brain Barrier Penetrating Peptides. *Pharmaceutics*. 2021. V. 13. doi: [10.3390/pharmaceutics13081237](https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13081237)
89. Banks W.A. Peptides and the blood–brain barrier. *Peptides*. 2015. V. 72. P. 16–19. doi: [10.1016/j.peptides.2015.03.010](https://doi.org/10.1016/j.peptides.2015.03.010)
90. Копылов А.Т., Карпова Е.М. *Диагностическая тест-система для определения биомаркера, специфического для нейродегенеративных заболеваний или нейродегенеративных нарушений*: патент RU2827060C1. Москва; 2024. URL: https://new.fips.ru/registers-doc-view/fips_servlet?DB=RUPAT&DocNumber=2827060&TypeFile=html (дата обращения: 22.05.2025)
91. Козин С.А., Копылов А.Т., Карпова Е.М., Яковлев Р.Ю. Физиологически активное вещество SRFM как биомаркер крови для диагностики нейродегенеративных нарушений и заболеваний человека: патент RU2822604C1. Москва; 2024. URL: https://new.fips.ru/registers-doc-view/fips_servlet?DB=RUPAT&DocNumber=2822604&TypeFile=html (дата обращения: 22.05.2025)
92. Yamada S., Arikawa S. An ectotherm homologue of human predicted gene NAT16 encodes histidine N-acetyltransferase responsible for N α -acetylhistidine synthesis. *Biochim. Biophys. Acta*. 2014. V. 1840. P. 434–442. doi: [10.1016/j.bbagen.2013.10.004](https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.10.004)
93. Shaku M.T., Ocius K.L., Apostolos A.J., Pires M.M., Van Nieuwenhze M.S., Dhar N., Kana B.D. Amidation of glutamate residues in mycobacterial peptidoglycan is essential for cell wall cross-linking. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2023. V. 13. doi: [10.3389/fcimb.2023.1205829](https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1205829)

Рукопись поступила в редакцию 30.04.2025, переработанный вариант поступил 03.06.2025.
Дата опубликования 14.07.2025.

Investigation of the Beta-Amyloid Binding Interface with a Candidate Marker for Neurodegenerative Diseases

Nikolsky K.S.¹, Kulikova L.I.¹, Rudnev V.R.¹, Petrovskiy D.V.¹,
Gabestro I.S.², Kaem S.L.², Karpova E.M.², Kopylov A.T.¹, Kaysheva A.L.¹

¹V.N. Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry, Moscow, Russia

²LLC Lifemission, Moscow, Russia

Abstract. Neurodegenerative diseases represent a group of slowly progressive, hereditary or acquired pathologies of the nervous system. Their common feature is neurodegeneration, which leads to various neurological symptoms, including dementia, movement disorders, cognitive impairment, and behavioral changes. Due to the increasing prevalence of neurodegenerative diseases in modern society, there is a growing number of studies focused on exploring the molecular mechanisms underlying these diseases, which opens prospects for developing new approaches for early diagnosis and effective treatment methods. The biomolecules associated with the pathogenesis of neurodegenerative diseases include the acetylcholine receptor and beta-amyloid. A modified form of the HAEE tetrapeptide (His-Ala-Glu-Glu), which likely binds to beta-amyloid in the presence of cations, appears promising for investigation. Using molecular modeling methods, complexes of the acetylcholine receptor with beta-amyloid, as well as the modified form of HAEE tetrapeptide with beta-amyloid, were obtained both in the presence and absence of zinc cation. Mapping and characterization of binding interfaces in the modeled complexes were performed, along with comparative analysis of complex stability using molecular dynamics methods. It was demonstrated that the presence of zinc ions leads to the stabilization of two types of complexes. The nicotinic acetylcholine receptor- beta-amyloid complex in the presence of zinc showed the highest stability compared to other studied complexes. The HAEE tetrapeptide-beta-amyloid complex exhibited the lowest stability in the experiments. Phylogenetic analysis of the origin of the 18-amino acid residue long N-terminal α -helix sequence of human nAChR containing the tetrapeptide HAEE revealed highly homologous orthologous proteins with similar biological function in the majority of the most abundant animal classes.

Key words: neurodegenerative diseases, molecular modeling, binding interface, complex stability, peptide modification, phylogenetic analysis of protein sequence