

УДК 577.24

Особенности фосфорилирования бета-амилоида при болезни Альцгеймера

П. А. Стрельникова^{1,2#}, А. Е. Бугрова^{1,2#}, Н. В. Захарова^{1,2}, К. В. Даничкина¹,
М. И. Индейкина^{1,2}, М. С. Гавриш³, В. Г. Круть⁴, А. А. Бабаев³, А. Ю. Морозова^{5,6},
А. С. Кононихин^{1,7*}, В. А. Митькевич^{8*}, А. А. Макаров⁸, Е. Н. Николаев¹

¹Сколковский институт науки и технологий, Москва, 121205 Россия

²Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва, 119334 Россия

³Научно-исследовательский институт нейронаук, Нижегородский государственный университет имени Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород, 603022 Россия

⁴Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова, Москва, 117997 Россия

⁵Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии имени В.П. Сербского, Москва, 119034 Россия

⁶Психиатрическая клиническая больница № 1 им. Н.А. Алексеева Департамента здравоохранения г. Москвы, Москва, 117152 Россия

⁷Институт энергетических проблем химической физики имени В.Л. Тальрозе Федерального исследовательского центра химической физики имени Н.Н. Семёнова РАН, Москва, 119334 Россия

⁸Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта РАН, Москва, 119991 Россия

Равный вклад.

*E-mail: a.kononikhin@skoltech.ru; mitkevich@gmail.com

Поступила в редакцию 09.07.2024

Принята к печати 16.08.2024

DOI: 10.32607/actanaturae.27456

РЕФЕРАТ Характерным признаком прогрессии болезни Альцгеймера (БА) является накопление нейротоксичных агрегатов бета-амилоидных пептидов (Аβ). Посттрансляционные модификации (ПТМ) способствуют агрегации и увеличению цитотоксичности Аβ, при этом содержание специфических протеоформ Аβ повышено в сенильных бляшках пациентов с БА. Патологические механизмы формирования агрегатов и роль протеоформ Аβ требуют детального изучения как для понимания роли конкретных процессов в инициации дегенерации нейронов, так и для поиска эффективных превентивных методов терапевтического воздействия. В представленной работе изучена динамика накопления фосфорилированной по серину-8 протеоформы Аβ (pSer8-Аβ) у мышей линии 5xFAD, использованных в качестве модели амилоидогенеза. Также изучены образцы Аβ из спинномозговой жидкости (СМЖ) и головного мозга человека. Методом Вестерн-блоттинга с использованием антител 1E4E11 и 4G8 показали, что накопление pSer8-Аβ в мозге мышей 5xFAD начинается уже в 3-месячном возрасте и достигает максимума к 14–17 месяцам, что в целом сходно с динамикой накопления общего пула пептидов Аβ. Содержание pSer8-Аβ в СМЖ человека при БА может составлять порядка 1–10% от всего количества Аβ. Масс-спектрометрический анализ показал возможность фосфорилирования Аβ в тканях мозга по остаткам Ser8, Tyr10 и Ser26, а также фосфорилирования APP по остатку Thr719. Полученные результаты подкрепляют предположение о вовлеченности фосфопротеоформ Аβ в развитие амилоидоза при БА.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА бета-амилоид, масс-спектрометрия, болезнь Альцгеймера, фосфорилирование.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ БА – болезнь Альцгеймера; Аβ – бета-амилоидные пептиды; Аβ_{1–42} – пептид из 42 аминокислотных остатков; ПТМ – посттрансляционные модификации; pSer8-Аβ – фосфорилированная по серину-8 протеоформа Аβ; СМЖ – спинномозговая жидкость; APP – белок-предшественник амилоида; ТФЭ – твердофазная экстракция; МК – муравьиная кислота; ИП – иммунопреципитация; ПСА – персульфат аммония; БСА – бычий сывороточный альбумин; ВЭЖХ-МС – высокоэффективная жидкостная хроматография-масс-спектрометрия; PASEF – параллельное накопление и последовательная фрагментация.

ВВЕДЕНИЕ

Болезнь Альцгеймера (БА) составляет 60–80% всех случаев деменции, а риск ее развития особенно высок у людей пожилого возраста [1]. Количество пациентов с БА существенно увеличивается с каждым годом и может достичь 115 млн к 2050 г. [2]. Патогенез БА тесно связан с гомеостазом бета-амилоидных пептидов (A β) в мозге [3], именно амилоидные отложения являются общепризнанными маркерами БА. Несмотря на более чем 30-летнюю историю исследований [4, 5], выяснение детальных аспектов молекулярных механизмов амилоидоза не теряет своей актуальности, поскольку влияние на амилоидоз представляется наиболее очевидной стратегией в поиске эффективных средств терапевтического воздействия при БА [6–8].

Полноразмерные формы A β -пептидов (A β_{1-40} и A β_{1-42}) имеют важные физиологические функции, которые могут отличаться в разных тканях организма, где эти пептиды образуются из различных изоформ белка-предшественника амилоида (APP) при участии β - и γ -секретаз [9, 10]. Эти пептиды играют важную роль в регуляции ангио- и нейrogenеза, а также снижают проницаемость гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) и способствуют посттравматическому восстановлению мозга [11]. Важной особенностью A β -пептидов является их способность к агрегации с образованием кросс- β -структур [12]. Дисбаланс между образованием полноразмерных форм A β и их своевременной деградацией может способствовать образованию модифицированных протеоформ, формирующих нейротоксичные олигомеры и агрегаты [3, 13]. В частности, задержка деградации полноразмерных A β -пептидов ведет к накоплению усеченных протеоформ [14–17] и появлению посттрансляционных модификаций (ПТМ), которые стабилизируют агрегаты A β и способствуют их дальнейшему росту. Примечательно, что подавляющее большинство описанных модификаций сосредоточено в цинксвязывающем домене и относится к шести полярным аминокислотным остаткам в N-концевом участке 1–11 [17], а присутствие в амилоидных бляшках мозга характерных укороченных с N-конца пептидов согласуется с повышенной скоростью модификации этого участка [15].

В целом, руго-Glu3, руго-Glu11, isoAsp1 и isoAsp7 являются наиболее распространенными ПТМ A β -пептидов [14, 18–23], которые могут способствовать их повышенной агрегации и стабилизации сенильных бляшек при БА. В частности, оценка динамики накопления разных ПТМ в амилоидных отложениях в мозге мышей линии 5xFAD, моделирующих БА, показала, что накопление руго-Glu3-A β у этих мышей начинается с самого раннего возраста и к 8

месяцам уже выходит на плато, тогда как изомеризация Asp7 в 7-месячном возрасте составляет лишь 8% и достигает своего максимума (~30%) к концу жизненного цикла, но так и не выходит на насыщение [24].

Фосфорилирование Ser8 – это еще одна ПТМ N-концевого участка A β , которая может играть важную роль в патогенезе БА. В частности, образование pSer8-A β , происходящее при участии протеинкиназ во внеклеточном пространстве и на поверхности клеток мозга [25], коррелирует с проявлением симптомов БА и затрудняет деградацию A β при участии инсулиндеградирующих и ангиотензинпревращающих ферментов [26]. Иммуногистохимический анализ образцов неокортекса позволил выявить взаимосвязь между фосфорилированием A β по Ser8 и его агрегацией в диспергируемые олигомеры, протофибриллы и фибриллы при симптоматической БА, но не на доклинической стадии [27]. При использовании синтетических полноразмерных пептидов pSer8-A β_{1-42} наблюдали стремительное образование стабильных фибриллярных агрегатов и нейротоксичных олигомеров в отсутствие ионов цинка [28, 29]. Кроме того, обнаружена возможность образования агрегатов с повышенной нейротоксичностью в результате взаимодействия pSer8-A β_{1-42} с немодифицированными A β_{1-42} [30]. Структурный ЯМР-анализ дополнительно выявил более высокую эффективность амилоидной амплификации и повышенную термодинамическую стабильность фибрилл pSer8-A β_{1-40} в сравнении с фибриллами нефосфорилированного пептида [31]. С другой стороны, как полноразмерный pSer8-A β_{1-42} , так и его цинксвязывающий фрагмент pSer8-A β_{1-16} существенно снижают *in vitro* агрегацию A β , индуцированную ионами цинка [32–34], а инъекции pSer8-A β_{1-42} уменьшают образование амилоидных бляшек в гиппокампе мышей [34]. По всей видимости, возможна реализация обоих сценариев, когда pSer8-A β провоцирует образование фибрилл или, наоборот, препятствует металлзависимой агрегации. Реализация каждого сценария зависит от внешних факторов – наличия и концентрации ионов цинка, белков-партнеров A β и др. В связи с этим исследование динамики накопления pSer8-A β может способствовать прояснению его роли в формировании амилоидных отложений.

Оптимизация подходов, в том числе масс-спектрометрических (МС), к анализу фосфорилированных форм амилоида остается актуальной задачей [17, 35, 36]. В состав A β входят три потенциальных сайта фосфорилирования (Ser8, Ser26 и Tyr10), а также потенциальные сайты в смежных с A β областях APP. На сегодняшний день получены

данные о присутствии *in vivo* фосфорформ Аβ с модифицированными Ser8 и Ser26 [17, 24]. Дальнейшие МС-исследования этих форм могут привести к получению важной информации о роли путей фосфорилирования в амилоидозе, а также к пониманию роли фосфорилирования в патогенезе БА. В представленной работе методами масс-спектрометрии и Вестерн-блоттинга исследованы особенности фосфорилирования Аβ по Ser8 (pSer8-Аβ) на модельных мышцах 5xFAD, а также у пациента с БА.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реагенты и Аβ-пептиды

Все химические вещества и растворители, использованные в данном исследовании, были класса ВЭЖХ. Синтетические пептиды Аβ (Аβ₁₋₁₆, pSer8-Аβ₁₋₁₆, Аβ₁₋₄₂ и pSer8-Аβ₁₋₄₂), полученные методом твердофазного синтеза и очищенные до чистоты более 99.5% с использованием ВЭЖХ (BioPeptide Inc., США), были растворены в 10% ацетонитриле до концентрации 0.5 мг/мл, поделены на аликвоты по 50 мкл и хранились при -80°C. В качестве стандартов и контрольных образцов («спайков») использовали синтетические пептиды в известной концентрации. Для контрольных образцов в качестве матрицы использовали плазму крови человека, разведенную фосфатно-солевым буфером (рН 7.4) в соотношении 1 : 50.

Мыши 5xFAD

В работе использовали линию трансгенных мышей 5xFAD (лаборатория Jackson, США, инвентарный номер 006554) [37]. Мыши этой линии имеют пять тяжелых, связанных с БА, наследственных мутаций в генах белка-предшественника амилоида (APP) человека (SweK670N, M671L, LonV717I и FloI716V) и пресенилина 1 (PSEN1) (M146L и L286V), экспрессируемых под контролем промотора Thy1 мыши. Эти мыши экспрессируют трансгенный Аβ человека на значительно более высоком уровне, чем нативный мышинный Аβ, что приводит к ускоренному ухудшению когнитивных функций мозга. Первые поведенческие нарушения проявляются в возрасте ~6 месяцев и становятся наиболее выраженными к 9 месяцам [38].

Образцы мозга мышей были предоставлены Центром генетических коллекций лабораторных животных (Институт биологии и биомедицины ННГУ им. Н.И. Лобачевского). Когорта состояла из 6 особей в возрасте 3, 8, 12, 14, 17 и 23 месяцев. Животных содержали в колонии при свободном доступе к пище и воде в помещении с контролируемой температурой +20 ± 2°C и влажностью 40–60%

при 12-часовом цикле света/темноты. Эксперименты на мышцах проводили в соответствии с методиками, утвержденными местным этическим комитетом и органами контроля за животными (Методические рекомендации по размещению и уходу за животными. Окружающая среда, содержание и управление, 2016).

Все мыши 5xFAD были генотипированы для подтверждения наличия всех мутаций. Для этого ДНК выделяли из части хвоста, помещали в 300 мкл лизирующего буфера (10 mM Трис-НСl, рН 8.0, 100 mM NaCl) с протеиназой К, инкубировали с ротацией 650 об/мин 16–20 ч при +55°C, перемешивали и центрифугировали при комнатной температуре (5 мин, 14000 об/мин). Верхнюю фракцию, содержащую ДНК, дополнительно промывали 1 раз изопропанолом и дважды 80% этанолом с последующим центрифугированием при +4°C (15 мин, 14000 об/мин). Наличие генов *PSEN1* и *APP* человека проверяли с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием специфичных к вставкам праймеров 5'-AAT AGA GAA CGG CAG GAG CA-3' и 5'-GCC AT G AGG GCACT AAT CAT-3' для *PSEN1* и 5'-AGG ACT GAC CACT CG ACC AG-3' и 5'-CGG GGG T CT AGT T CT GCA T-3' для *APP* [39]. Контрольными праймерами были 5'-CT A GGC CAC AGA AT T GAA AGA T CT-3' и 5'-GT A GGT GGA AAT T CT AGC ATC C-3'.

Образцы СМЖ и мозга человека

Образец ткани мозга человека получен от 82-летнего пациента со спорадической формой БА во время аутопсии (post-mortem interval (PMI) – 15 ч). Образцы височной доли и гиппокампа были заморожены в жидком азоте для дальнейшего МС-анализа, а также зафиксированы в 10% забуференном формалине («БиоВитрум», Россия) для гистологического анализа. Для верификации диагноза были изготовлены гистологические срезы ткани головного мозга толщиной 4–5 мкм и окрашены Конго красным («БиоВитрум», Россия). Для иммуногистохимического (ИГХ) окрашивания использовали антитела к тау-белку и Аβ.

Образец СМЖ получен путем диагностической люмбальной пункции стерильной иглой от мужчины 79 лет с установленным диагнозом болезнь Альцгеймера. Объем спинномозговой жидкости составлял 1 мл. В течение 1 ч с момента забора образец центрифугировали (1500 об/мин, 15 мин), далее проводили отбор супернатанта. Образцы хранили при температуре -80°C.

Все процедуры, связанные с получением биологического материала человека, проводили в соответствии с рекомендациями Хельсинкской декларации

и после получения одобрения комиссии по этике (Протокол № 1 от 25 января 2022 года Этического комитета ПКБ № 1 им. Н.А. Алексеева ДЗМ). Было получено письменное информированное согласие от пациентов.

Экстракция Аβ-пептидов из тканей мозга

Для выделения Аβ-пептидов образцы мозга гомогенизировали на льду с использованием стеклянного гомогенизатора Поттера с добавлением 4 объемов лизирующего буфера (20 мМ Трис, 2.5 мМ EDTA, 137 мМ NaCl, pH 7.6), содержащего смесь ингибиторов протеаз (Roche, Франция). После добавления муравьиной кислоты (МК) до 70% (по объему) образцы обрабатывали ультразвуком (10 мин × 2), встряхивали и центрифугировали (30000 g, 1 ч, +4°C). МК из супернатанта выпаривали с помощью вакуумного концентратора (Eppendorf, Германия). Полученные кислые экстракты хранили при температуре -80°C. Далее Аβ выделяли твердофазной экстракцией (ТФЭ), используя картриджи Oasis MCX (Waters, США), согласно протоколу производителя [40] со следующими модификациями. Кислые экстракты растворяли в смеси 8 М/2 М мочевины/тиомочевина и добавляли до 2% H₃PO₄. Картриджи для ТФЭ предварительно кондиционировали 1 мл метанола и уравнивали 1 мл 4% H₃PO₄. Образец (2 мл) загружали в картридж ТФЭ и промывали 2 мл 4% H₃PO₄ и 10% ацетонитрила (ACN). Фракцию, обогащенную Аβ, элюировали 1 мл раствора ACN/H₂O/NH₄OH 75 : 15 : 10 (по объему), образцы упаривали до 100 мкл, используя вакуумный концентратор (Eppendorf, Германия).

Выделение Аβ-пептидов из СМЖ человека

Аβ-пептиды из СМЖ и контрольных образцов («спайков») выделяли методом иммунопреципитации (ИП) с использованием высокоспецифичных к pSer8-Аβ моноклональных антител 1E4E11 (Merck KGaA, Германия), а также антител 6E10 и 1E8 (на три порядка более чувствительных к немодифицированному Аβ) и 4G8 (с одинаковой специфичностью к обеим формам Аβ). ИП проводили в течение 3 ч при +4°C с антителами, иммобилизованными на магнитные частицы Dynabeads (Thermo Scientific) в присутствии ингибиторов протеаз. Аβ элюировали с использованием 70% ACN с добавлением 10 мМ HCl либо двукратного денатурирующего буфера для образцов для последующего электрофореза пептидов и Вестерн-блоттинга.

Пептидный электрофорез и Вестерн-блоттинг

Полученные после ТФЭ образцы, обогащенные фракцией Аβ, смешивали в соотношении 1 : 1

с 2× буфером для образцов для пептидного электрофореза (100 мМ Трис-HCl pH 8.8, 1% SDS, 4% бета-меркаптоэтанол, 24% глицерин, 0.02% Кумасси бриллиантовый синий) и денатурировали в течение 5 мин при ~ +90°C [41]. Пептидный электрофорез проводили в ячейках Mini-PROTEAN (Bio-Rad, США) с использованием Трис-трициновой буферной системы (25 мМ Трис, 25 мМ Трицин, 0.05% SDS) в 12% полиакриламидном геле. На 10 мл разделяющего геля добавляли 4 мл 30% раствора акриламида/бисакриламида (AA/БА, 29/1), 5 мл 2.5 М Трис-HCl pH 8.8, 6 мкл TEMED и 100 мкл 10% персульфата аммония (ПСА). Для приготовления 5 мл 4% концентрирующего геля добавляли 0.66 мл AA/БА, 0.76 мл 2.5 М Трис-HCl pH 8.8, 5 мкл TEMED и 150 мкл ПСА. Электрофорез проводили в течение 1.5–2 ч при 60 мА с хорошим охлаждением, до начала выхода фронта краски из геля. Проводили полусухой перенос на нитроцеллюлозную мембрану с размером пор 0.2 мкм в течение 1 ч при 50 мА с использованием буфера, содержащего 47.9 мМ Трис, 38.6 мМ глицин, 0.0385% SDS и 20% метанол.

Для Вестерн-блоттинга мембрану блокировали в течение 30 мин в 2.5% растворе молока в 0.01 М PBS и 0.1% Tween-20 с добавлением 10 мг/мл БСА и инкубировали с первичными антителами в течение ночи. Для детекции pSer8-Аβ использовали высокоспецифичные к этой ПТМ антитела 1E4E11 (1 : 4000, Merck KGaA, Германия). Немодифицированные Аβ выявляли с помощью антител 6E10 (1 : 8000, эпитоп 3–8, Biologend, США), а также антитела 4G8 (1 : 4000, эпитоп 18–23, Biologend, США), способные детектировать как мономерные, так и олигомерные формы [42]. Инкубацию со вторичными антителами (1 : 5000, IgG, конъюгированные с пероксидазой хрена, Hutztest) проводили в течение 1 ч. Результаты визуализировали с применением усиленной хемилюминесценции (enhanced chemiluminescence, ECL) с реактивами SuperSignal (Thermo Fisher Scientific, США). Изображения получали с использованием геле-документирующей системы SYNGENE G:Box (Syngene, Великобритания). Изображения обрабатывали с использованием программы GeneTools.

Хромато-масс-спектрометрический анализ (ВЭЖХ-МС)

Все образцы для проведения ВЭЖХ-МС-анализа гидролизировали протеазой Lys-C (Promega, США) с получением гидрофильных фрагментов Аβ₁₋₁₆. Образцы после ТФЭ (20 мкл) смешивали (1 : 1) со 100 мМ бикарбоната аммония и 0.4 мкг Lys-C, затем инкубировали при 37°C в течение 4 ч.

Нецелевой ВЭЖХ-МС-анализ образцов-гидролизатов (Lys-C) проводили на ВЭЖХ-системе Dionex Ultimate 3000 (Thermo Fisher Scientific), соединенной с времяпролетным масс-спектрометром высокого разрешения TIMS TOF Pro (Bruker Daltonics, США), с использованием метода сбора данных с помощью параллельного накопления и последовательной фрагментации (PASEF) в режиме DDA. Настройки источника электроспрея (ESI) были следующими: напряжение на капилляре – 4500 В, потенциал смещения торцевой пластины – 500 В, расход сухого газа – 3.0 л/мин при температуре 180°C. Измерения проводили в диапазоне масса/заряд (m/z) от 100 до 1700. Диапазон подвижности ионов включал значения от 0.60 до 1.60 В·с/см² ($1/k_0$, где k_0 – подвижность ионов). Общее время цикла установлено равным 1.16 с, а количество сканирований PASEF MS/MS – 10. Для малых количеств образцов общее время цикла установлено равным 1.88 с.

Для ВЭЖХ загруженный объем образца составлял 1 мкл на инъекцию. ВЭЖХ проводили с использованием колонки-эмиттера Ion Optics (C18, 25 см × 75 мкм, 1.6 мкм; Parkville, Австралия) методом градиентного элюирования. Подвижная фаза А содержала 0.1% муравьиной кислоты в воде; подвижная фаза В содержала 0.1% МК в ацетонитриле. Разделение проводили при расходе 400 нл/мин с использованием 40-минутного градиента от 4 до 90% фазы В.

Данные нетаргетного ВЭЖХ-МС анализировали с использованием программы PEAKS Studio 8.5 (параметры: погрешность измерения массы родительского иона – 20 мд; погрешность массы фрагмента – 0.03 Да). Окисление метионина установлено как возможная переменная модификация. Поиск проводили с использованием базы данных Swissprot белков человека. Пороговые значения FDR для всех этапов установлены на уровне 1% или ниже.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Динамика накопления pSer8-Aβ в мозге мышей 5xFAD

Формирование фибриллярных Aβ-структур можно обнаружить уже в мозге 2-месячных мышей линии 5xFAD [37]. Динамика накопления некоторых протеоформ Aβ, исследованных ранее, показала, что в целом накопление протеоформ Aβ коррелирует с образованием амилоидных отложений [24]. Нами проведена серия экспериментов для оценки динамики накопления pSer8-Aβ методом Вестерн-блотинга.

Предварительно приблизительно оценили долю фосфорилированных Aβ у мыши среднего возраста

(12 месяцев). С этой целью сравнивали содержание пептидов в одинаковых навесках ткани одного и того же животного с линейкой соответствующих синтетических стандартов Aβ₁₋₄₂ и pSer8-Aβ₁₋₄₂ (рис. 1А). Для идентификации немодифицированных Aβ использовали антитела 6E10, выявляющие преимущественно мономерные пептиды (эпитоп 3–8); для идентификации pSer8 использовали высокоспецифичные антитела 1E4E11. Полученные результаты указывают на то, что суммарное количество мономерных немодифицированных по Ser8 форм Aβ к 12 месяцам может достигать 2 нг на 1 мг ткани мозга, а доля мономерных pSer8-Aβ может быть в 10–100 раз меньше. Необходимо отметить, что Вестерн-блотинг все-таки не относится к количественным методам и позволяет проводить лишь приблизительные относительные количественные оценки. Кроме того, как общее количество Aβ, так и количество его модифицированных форм может варьироваться у разных животных [24].

Динамику накопления общего и модифицированного Aβ определяли с использованием экстрактов, полученных из препаратов мозга 3-, 8-, 14-, 17- и 23-месячных мышей (рис. 1Б–Г). Для минимизации технических ошибок и с учетом того, что предварительный эксперимент подтвердил возможность присутствия pSer8-Aβ в значительно меньших количествах по отношению к немодифицированным Aβ, одну и ту же мембрану последовательно проявляли сначала антителами к pSer8-Aβ (1E4E11) и лишь затем антителами 4G8, которые, в отличие от 6E10, совсем не конкурируют за эпитоп с 1E4E11 и проявляют все формы Aβ, не имеющие модификаций в участке 18–23 (в том числе и pSer8-Aβ), включая их олигомеры [42]. Визуальная оценка результатов Вестерн-блотинга (рис. 1Б) позволяет заключить, что пептиды pSer8-Aβ выявляются уже в 3-месячном возрасте и в мономерной форме могут достигать максимума к 14 месяцам. Результаты дополнительной оценки интенсивности полос на полученных изображениях (рис. 1В) указывают на схожесть динамики накопления pSer8-Aβ и общего пула мономерных и димерных форм Aβ, что может косвенно указывать на взаимосвязь фосфорилирования Ser8 и стимуляции олигомеризации. Тем не менее полученный результат не позволяет сделать прямых выводов о возможном присутствии pSer8-Aβ в олигомерных формах: аналогично антителам 6E10, перекрывающиеся с ними по эпитопу в N-конце антитела 1E4E11, также могут плохо идентифицировать димерные и олигомерные формы из-за сниженной доступности специфичного участка.

Дополнительный анализ распределения интенсивности окрашивания полос в каждом из об-

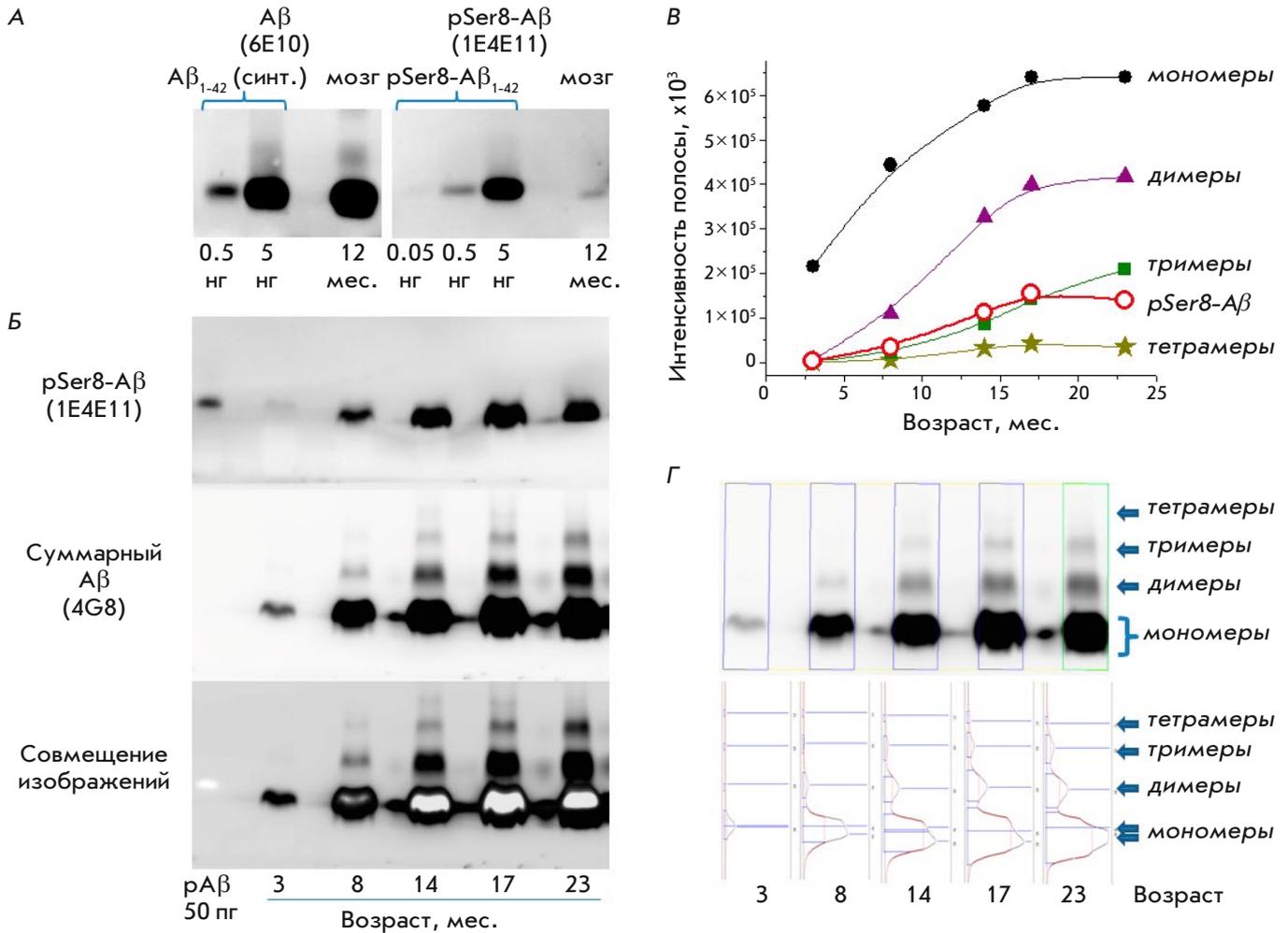


Рис. 1. Анализ динамики накопления pSer8-Aβ в сравнении с общим пулом пептидов Aβ методом Вестерн-блоттинга в мозге мышей 5xFAD. **А** – накопление немодифицированных и pSer8-мономерных форм Aβ в мозге мыши в возрасте 12 месяцев; количество нанесенного образца соответствует 0.3 мг ткани мозга для Aβ и 1 мг ткани – для pSer8-Aβ. **Б** – сравнительный анализ накопления общего пула пептидов Aβ и pSer8-Aβ-форм в мозге мышей разного возраста; количество нанесенного образца соответствует 3 мг ткани мозга. **В** – графики, отображающие динамику накопления мономерных и олигомерных форм Aβ, по результатам обработки изображений в программе GeneTools. **Г** – анализ распределения интенсивности окрашивания полос в каждой дорожке при помощи GeneTools

разцов (рис. 1Г) еще более отчетливо подчеркнул присутствие димеров, тримеров и тетрамеров Aβ в отдельных образцах, а также выявил гетерогенность и наличие, как минимум, двух пиков в пятнах, соответствующих мономерным формам, начиная с 8-месячного возраста. Это может указывать на присутствие усеченных мономеров, наряду с полноразмерными пептидами. Примечательно, что при совмещении изображений на рис. 1Б расположение фосфорилированных форм скорее можно отнести к верхней части мономерного пятна и, в целом, пятна, соответствующие pSer8-Aβ, имеют более четкие границы по сравнению с общим пятном.

Таким образом, можно предположить, что в нижней части общего пятна могут находиться пептиды, усеченные с N-конца и не содержащие участок с Ser8. Это может указывать на то, что фосфорилирование Ser8 может облегчать отщепление соответствующего N-концевого фрагмента.

Анализ pSer8-Aβ в СМЖ

Вестерн-блот-анализ Aβ из СМЖ пациента с БА выявил присутствие существенного количества pSer8-Aβ (рис. 2). Последовательное окрашивание мембраны высокоспецифичными антителами к pSer8-Aβ и антителами к немодифицированным

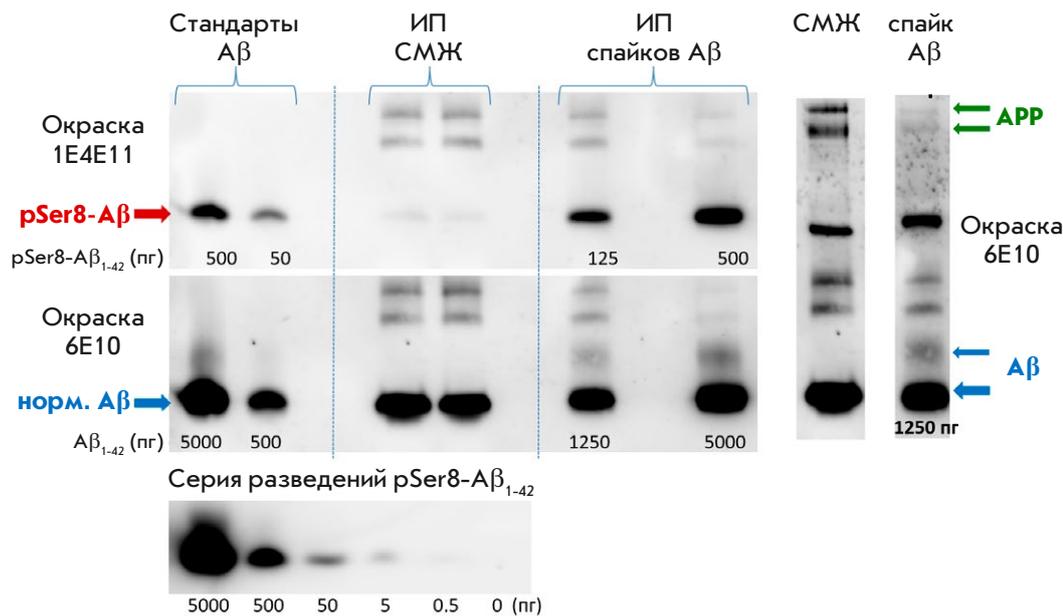


Рис. 2. Оценка содержания рSer8-Аβ в СМЖ пациента с БА методом Вестерн-блотинга. Иммунопреципитацию (ИП) проводили в СМЖ пациента, а также в контрольных образцах Аβ («спайки»). Зеленые стрелки – белок-предшественник (APP), синие – мономер и димер Аβ

формам позволило установить, что доля рSer8-Аβ-форм в СМЖ может составлять порядка 1–10% от немодифицированных полноразмерных форм пептида. Эта величина хорошо согласуется с результатами количественного определения доли фосфорилированных амилоидных мономеров, полученных с использованием электрохимического подхода [43].

Кроме того, в образце СМЖ антитела к немодифицированной форме Аβ идентифицируют две высокомолекулярные полосы, соответствующие белку APP (рис. 2), вероятно, его гликозилированной и негликозилированной формам.

Масс-спектрометрический анализ фосфоформ Аβ из тканей мозга

Фосфорилирование Аβ ранее не удавалось подтвердить методами масс-спектрометрии. В настоящей работе при проведении ВЭЖХ-МС-анализа образцов-фракций Аβ из тканей мозга мышей 5xFAD рассмотрена возможность фосфорилирования Ser, Thr и Tyr (рис. 3). Идентифицированы Аβ-пептиды, фосфорилированные по остаткам Ser8 и Tyr10, но строгое рассмотрение спектров фрагментации не позволило однозначно определить положение ПТМ. Кроме того, обнаружен пептид с двойным фосфорилированием. Это обстоятельство указывает на возможность фосфорилирования не только серина (Ser8), но и тирозина (Tyr10) в составе амилоида. Фосфорилирование Tyr10 не было показано ранее не только МС, но и другими методами. Хотя было установлено, что в данной позиции могут происходить нитрирование и обра-

зование дитирозина, а фосфорилирование может быть промежуточной реакцией, которую сложно детектировать. Помимо Ser8 и Tyr10, некоторые спектры фрагментации указывали на возможность фосфорилирования Ser26. Тем не менее общее качество спектров, полученных для Ser8, Tyr10 и Ser26, нельзя признать достаточным для уверенных выводов, поэтому данный вопрос требует дальнейших исследований.

Кроме того, по данным ВЭЖХ-МС-анализа Аβ-пептидов из мозга человека обнаружен фосфосайт Thr (T719), фосфорилирование которого было близко к 100% и не вызывало сомнений. Этот сайт представлен в составе только удлиненных форм Аβ (X-T48), которые, скорее всего, являются продуктами альтернативного процессинга APP или его деградации, не связанной с амилоидозом. Другие возможные позиции фосфорилирования в APP – 729, 730 и 743 – не имели достоверного покрытия при МС-анализе, что не позволяет сделать каких-либо заключений. Сайт Tyr757 имел хорошее покрытие, однако его фосфорилирования не выявлено.

В целом, хотя результаты МС-анализа указывают на присутствие определенных сайтов фосфорилирования в Аβ и смежных с ним областях APP, тема продолжения МС-исследований фосфоформ Аβ остается актуальной. Решение данной задачи в существенной степени может зависеть от оптимизации процедуры выделения фосфоформ Аβ, поскольку часто используемая солубилизация МК легко гидролизует этерифицированные фосфатные группы [20, 22]. Кроме того, определенные надежды

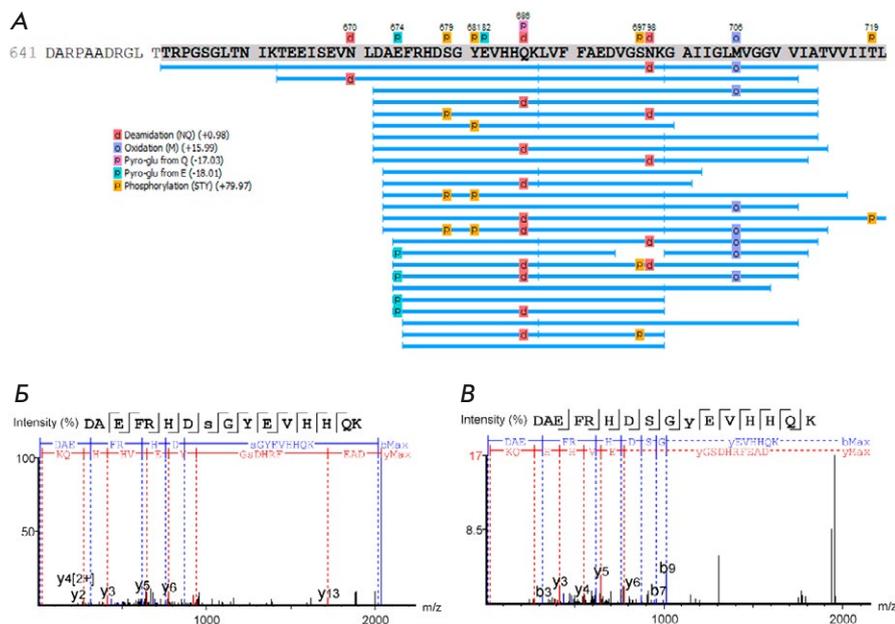


Рис. 3. Покрываемость последовательностей протеоформ Аβ (отмечено серым цветом), выделенных из мозга мышей 5xFAD, с локализацией возможных посттрансляционных модификаций, включая фосфорилирование (Ser (S), Thr (T) и Tyr (Y)). А – масс-спектры столкновительной фрагментации (отмечены характерные у- и b-серии ионов-фрагментов пептида) фосфорилированного пептида Аβ16 с разной локализацией фосфо-группы: спектр для Ser8(s) – Б; спектр для Tyr10(y) – В

связаны с последними достижениями в исследовании синтетических фосфоформ Аβ методом MALDI-TOF и с использованием матричных добавок, минимизирующих потерю фосфатных групп в процессе ионизации, а также усиливающих ионизацию именно фосфопептидов [35, 36].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Согласно полученным результатам, накопление pSer8-Аβ-пептидов в мозге мышей линии 5xFAD схоже с динамикой накопления мономерных и димерных форм общего пула пептидов Аβ. К концу жизненного цикла суммарное количество накопленных Аβ-пептидов может достигать ~10 нг на 1 мг ткани мозга, а доля pSer8-Аβ может составлять 1–10%.

Также показано, что доля pSer8-Аβ-форм в СМЖ человека может составлять порядка 1–10% от немодифицированных полноразмерных форм Аβ. При использовании масс-спектрометрии высокого разрешения получены указания на возможность фосфорилирования Аβ по остаткам Ser8 и Ser26, а также фосфорилирования APP по остатку Thr719. Впервые получены указания на возможность фосфорилирования Tyr10. Дальнейшая оптимизация МС-методик для эффективного анализа фосфоформ Аβ остается крайне актуальной. ●

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 19-74-30007).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Alzheimer's Association // Alzheimer's Dement. 2021. V. 17. № 3. P. 327–406.
- Prince M., Bryce R., Albanese E., Wimo A., Ribeiro W., Ferri C.P. // Alzheimer's Dement. 2013. V. 9. № 1. P. 63–75.
- Wang J., Gu B.J., Masters C.L., Wang Y.J. // Nat. Rev. Neurol. 2017. V. 13. № 10. P. 612–623.
- Hardy J.A., Higgins G.A. // Science. 1992. V. 256. № 5054. P. 184–185.
- Roher A.E., Lowenson J.D., Clarke S., Woods A.S., Cotter R.J., Gowing E., Ball M.J. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1993. V. 90. № 22. P. 10836–10840.
- Klein W.L., Krafft G.A., Finch C.E. // Trends Neurosci. 2001. V. 24. № 4. P. 219–224.
- Selkoe D.J., Hardy J. // EMBO Mol. Med. 2016. V. 8. № 6. P. 595–608.
- Lee S.J.C., Nam E., Lee H.J., Savelieff M.G., Lim M.H. // Chem. Soc. Rev. 2017. V. 46. № 2. P. 310–323.
- Evin G., Zhu A., Holsinger R.M.D., Masters C.L., Li Q.X. // J. Neurosci. Res. 2003. V. 74. № 3. P. 386–392.
- Galozzi S., Marcus K., Barkovits K. // Expert Rev. Proteomics. 2015. V. 12. № 4. P. 343–354.
- Kent S.A., Spires-Jones T.L., Durrant C.S. // Acta Neuropathol. 2020. V. 140. № 4. P. 417–447.
- Gallardo R., Ranson N.A., Radford S.E. // Curr. Opin. Struct. Biol. 2020. V. 60. P. 7–16.
- Rogers J., Strohmeier R., Kovelowski C.J., Li R. // Glia. 2002. V. 40. № 2. P. 260–269.
- Portelius E., Bogdanovic N., Gustavsson M.K., Volkman I., Brinkmalm G., Zetterberg H., Winblad B., Blennow K. // Acta Neuropathol. 2010. V. 120. № 2. P. 185–193.
- Wildburger N.C., Esparza T.J., Leduc R.D., Fellers R.T., Thomas P.M., Cairns N.J., Kelleher N.L., Bateman R.J., Brody D.L. // Sci. Rep. 2017. V. 7. № 1. P. 1–9.
- Zakharova N.V., Bugrova A.E., Kononikhin A.S., Indeykina M.I., Popov I.A., Nikolaev E.N. // Expert Rev. Proteomics.

2018. V. 15. № 10. P. 773–775.
17. Zakharova N.V., Kononikhin A.S., Indeykina M.I., Bugrova A.E., Strelnikova P., Pekov S., Kozin S.A., Popov I.A., Mitkevich V., Makarov A.A., et al. // *Mass Spectrom. Rev.* 2022. V. 28. P. e21775.
18. Kummer M.P., Heneka M.T. // *Alzheimer's Res. Ther.* 2014. V. 6. № 3. P. 28.
19. Brinkmalm G., Portelius E., Öhrfelt A., Mattsson N., Persson R., Gustavsson M.K., Vite C.H., Gobom J., Månsson J.E., Nilsson J., et al. // *J. Mass Spectrom.* 2012. V. 47. № 5. P. 591–603.
20. Mukherjee S., Perez K.A., Lago L.C., Klatt S., McLean C.A., Birchall I.E., Barnham K.J., Masters C.L., Roberts B.R. // *Brain Commun.* 2021. V. 3. № 2. fcab028.
21. Inoue K., Hosaka D., Mochizuki N., Akatsu H., Tsutsu-miuchi K., Hashizume Y., Matsukawa N., Yamamoto T., Toyō'oka T. // *Anal. Chem.* 2014. V. 86. № 1. P. 797–804.
22. Roher A.E., Kokjohn T.A., Clarke S.G., Sierks M.R., Maarouf C.L., Serrano G.E., Sabbagh M.S., Beach T.G. // *Neurochem. Int.* 2017. V. 110. P. 1–13.
23. Moro M.L., Phillips A.S., Gaimster K., Paul C., Mudher A., Nicoll J.A.R., Boche D. // *Acta Neuropathol. Commun.* 2018. V. 6. № 1. P. 3.
24. Bugrova A.E., Strelnikova P.A., Indeykina M.I., Kononikhin A.S., Zakharova N.V., Brzhozovskiy A.G., Barykin E.P., Pekov S.I., Gavrish M.S., Babaev A.A., et al. // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 2022. P. 27.
25. Kumar S., Rezaei-Ghaleh N., Terwel D., Thal D.R., Richard M., Hoch M., Mc Donald J.M., Wüllner U., Glebov K., Heneka M.T., et al. // *EMBO J.* 2011. V. 30. № 11. P. 2255–2265.
26. Kumar S., Singh S., Hinze D., Josten M., Sahl H.G., Siepmann M., Walter J. // *J. Biol. Chem.* 2012. V. 287. № 11. P. 8641–8651.
27. Rijal Upadhaya A., Kosterin I., Kumar S., von Arnim C.A.F., Yamaguchi H., Fändrich M., Walter J., Thal D.R. // *Brain.* 2014. V. 137. № 3. P. 887–903.
28. Rezaei-Ghaleh N., Amininasab M., Kumar S., Walter J., Zweckstetter M. // *Nat. Commun.* 2016. V. 7. P. 11359.
29. Jamasbi E., Separovic F., Hossain M.A., Ciccotosto G.D. // *Mol. Biosyst.* 2017. V. 13. № 8. P. 1545–1551.
30. Hu Z.W., Au D.F., Cruceta L., Vugmeyster L., Qiang W. // *ACS Chem. Neurosci.* 2020. V. 11. № 14. P. 2058–2065.
31. Hu Z.W., Vugmeyster L., Au D.F., Ostrovsky D., Sun Y., Qiang W. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2019. V. 166. № 23. P. 11253–11258.
32. Kulikova A.A., Tsvetkov P.O., Indeykina M.I., Popov I.A., Zhokhov S.S., Golovin A.V., Polshakov V.I., Kozin S.A., Nudler E., Makarov A.A. // *Mol. Biosyst.* 2014. V. 10. № 10. P. 2590–2596.
33. Istrate A.N., Kozin S.A., Zhokhov S.S., Mantsyzov A.B., Kechko O.I., Pastore A., Makarov A.A., Polshakov V.I. // *Sci. Rep.* 2016. V. 6. P. 21734.
34. Barykin E.P., Petrushanko I.Y., Kozin S.A., Telegin G.B., Chernov A.S., Lopina O.D., Radko S.P., Mitkevich V.A., Makarov A.A. // *Front. Mol. Neurosci.* 2018. V. 11. P. 302.
35. Liepold T., Klafki H.W., Kumar S., Walter J., Wirths O., Wiltfang J., Jahn O. // *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2023. V. 34. № 3. P. 505–512.
36. Kuzin A.A., Stupnikova G.S., Strelnikova P.A., Danichkina K.V., Indeykina M.I., Pekov S.I., Popov I.A. // *Molecules.* 2022. V. 27. № 23. P. 8406.
37. Oakley H., Cole S.L., Logan S., Maus E., Shao P., Craft J., Guillozet-Bongaarts A., Ohno M., Disterhoft J., van Eldik L., et al. // *J. Neurosci.* 2006. V. 26. № 40. P. 10129–10140.
38. Schneider F., Baldauf K., Wetzell W., Reymann K.G. // *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2015. V. 128. P. 68–77.
39. Popugaeva E., Chernyuk D., Zhang H., Postnikova T.Y., Pats K., Fedorova E., Poroikov V., Zaitsev A.V., Bezprozvan-ny I. // *Mol. Pharmacol.* 2019. V. 95. № 4. P. 337–348.
40. Lame M.E., Chambers E.E., Blatnik M. // *Anal. Biochem.* 2011. V. 419. № 2. P. 133–139.
41. Haider S.R., Reid H.J., Sharp B.L. // *Methods Mol. Biol.* 2012. V. 869. P. 81–91.
42. Hatami A., Monjazebe S., Milton S., Glabe C.G. // *J. Biol. Chem.* 2017. V. 50. № 2. P. 517–525.
43. Yin Z., Wang S., Shen B., Deng C., Tu Q., Jin Y., Shen L., Jiao B., Xiang J. // *Anal. Chem.* 2019. V. 91. № 5. P. 3539–3545.