

РГБ ОД

1 2 АБГ 1995

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
ПО ВЫСШЕМУ ОБРАЗОВАНИЮ  
РОССИЙСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ДРУЖБЫ НАРОДОВ

---

На правах рукописи

УДК 612.82+616.001.31+577.112.115

КУДИНОВА Наталья Владимировна

**АМИЛОИД БЕТА И ЛИПИДНЫЙ МЕТАБОЛИЗМ.**

( Специальность 03.00.04 - биохимия )

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени  
кандидата медицинских наук

МОСКВА-1996

Работа выполнена в на кафедре биохимии медицинского факультета  
Российского Университета Дружбы Народов

Научный руководитель:

академик РАМН, доктор медицинских наук,  
профессор Т.Т. Березов

Официальные оппоненты:

член-корреспондент РАМН, доктор медицинских наук,  
профессор Панченко Л.Ф.

доктор биологических наук, профессор  
Болдырев А. А.

Ведущая организация:

Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН

Защита диссертации состоится "27" сентября 1996 года в \_\_\_ часов на  
заседании диссертационного совета Д 053.22.02 при Российском  
Университете Дружбы народов по адресу: 117198 Москва, ул. Миклухо-  
Маклая, д. 8, Медицинский Факультет.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке Российского  
Университета Дружбы народов по адресу: 117198 Москва, ул. Миклухо-  
Маклая, д. 6.

Автореферат разослан "\_\_\_" \_\_\_\_\_ 1996 года

Учёный секретарь  
диссертационного совета  
доктор медицинских наук,  
профессор

В.Э. Торбек

**Актуальность проблемы.** В последнее время в медико-биологической науке пристальное внимание исследователей приковано к проблеме амилоидозов. Амилоидозы представляют большую группу клинически и биохимически разнообразных патологических состояний, характеризующихся отложением в тканях и органах нерастворимых фибриллярных белков. Особое место в этой группе занимают бета амилоидозы мозга при болезни Альцгеймера (БА), синдроме Дауна (СД) и старческом слабоумии (деменции). Главным морфобиологическим признаком этих заболеваний является отложение специфического белка— амилоида бета (А $\beta$ ) в виде амилоидных фибрилл в ткани и сосудах мозга. А $\beta$  состоит из 39-43 аминокислотных остатков. Он образуется путем протеолиза из своего предшественника— трансмембранного гликопротеина. Длительное время в литературе существовало мнение, что А $\beta$  является исключительно патологическим белком. Однако в 1992 году А $\beta$  был обнаружен в растворимой форме (рА $\beta$ ) в плазме крови и спинномозговой жидкости (СМЖ) не только больных, но и здоровых людей, а также в секретах многих клеточных линий. На сегодняшний день основными нерешенными остаются вопросы о тонких молекулярных механизмах патологического изменения растворимой формы А $\beta$  и его фибрилlogenеза, о причинах возникновения  $\beta$ -амилоидоза мозга при нормальном старении и при патологии; еще далеки от своего разрешения и проблемы избирательности поражения мозга и последствия амилоидоза для всего организма. Одним из направлений в решении этих вопросов является изучение нормальной биологии рА $\beta$  и его взаимосвязи с липидным метаболизмом. Почву для такого рода исследований дают экспериментальные доказательства нарушения метаболизма липидов мембран при БА и СД, а также открытие в 1994 году ассоциации рА $\beta$  с липопротеинами высокой плотности (ЛПВП) в плазме крови здоровых доноров. В этой связи особенно актуальным представляется исследование возможности взаимосвязи А $\beta$  и метаболизма липопротеинов (ЛП) в целом. Понимание молекулярной сущности этого процесса позволило бы приоткрыть причинно-следственные отношения между нарушениями липидного обмена у больных БА и СД и отложениями А $\beta$ , выяснить этиологию и патогенез бета-амилоидозов мозга, и в связи с этим попытаться разработать принципы патогенетически обоснованной терапии заболеваний. Не менее актуальным является решение фундаментальной биохимической задачи— понимание механизмов поддержания гидрофобных белковых молекул в растворенном состоянии. С этих позиций важным является выяснение вопроса о взаимодействии рА $\beta$  с липопротеиновыми частицами в спинномозговой жидкости, что, наряду с существованием ассоциации рА $\beta$  с ЛПВП плазмы крови, позволяет рассматривать липопротеины как систему транспорта рА $\beta$  в биологических жидкостях организма.

**Цель и задачи исследования.** Целью настоящей диссертационной работы было выяснение ассоциации растворимой формы А $\beta$  с липопротеи-

нами СМЖ здоровых людей, выделение нативного Аβ из липопротеинов СМЖ здоровых доноров и определение возможных физиологических функций рАβ в липидном метаболизме.

В соответствии с целью в работе были поставлены следующие практические задачи: 1) исследовать возможность существования связи рАβ с липопротеинами спинномозговой жидкости здоровых доноров; 2) разработать метод выделения нативного Аβ из ЛП СМЖ; 3) изучить влияние Аβ пептидов на реакцию этерификации холестерина в плазме крови здоровых доноров; 4) исследовать действие Аβ на синтез внутриклеточных липидов в культуре клеток печени человека HepG2.

### **Научная новизна.**

В работе впервые показана важная роль липопротеинов спинномозговой жидкости как системы транспорта рАβ. Ассоциация рАβ с липопротеинами высокой плотности 3-го класса (ЛПВПЗ) и липопротеинами очень высокой плотности (ЛПОВП) СМЖ, доказанная прямым определением N-концевой аминокислотной последовательности, высокоэффективной жидкостной гельфильтрацией и методом иммуноэлектронной микроскопии, дает основание для заключения, что рАβ циркулирует в составе липопротеинов в биологических жидкостях организма.

Нативный рАβ впервые был выделен из ЛПВП СМЖ. Разработанный метод выделения и очистки рАβ открывает широкие возможности для получения этого белка в количествах, достаточных для более детального исследования его физико-химических и биологических свойств.

При исследовании возможных функций рАβ, связанных с липидным обменом, впервые был обнаружен ингибирующий эффект его синтетических гомологов на: 1) этерификацию холестерина в плазме крови здоровых доноров; 2) биосинтез различных липидов в культуре клеток печени HepG2.

### **Практическое значение работы.**

Проведенные исследования впервые позволили: 1. Показать существование связи рАβ с ЛПВПЗ и ЛПОВП в спинномозговой жидкости здоровых доноров. 2. Разработанный метод выделения и очистки нативного рАβ из ЛПВПЗ СМЖ может быть использован для выделения препаративных количеств этого белка. 3. Участие Аβ в липидном метаболизме посредством ингибирования: а) реакции этерификации холестерина в плазме крови здоровых доноров и б) синтеза внутриклеточных липидов в культуре клеток печени HepG2, с одной стороны отражает возможные биологические функции рАβ, а с другой предлагает объяснение этиологии и патогенеза бета амилоидозов. Это в свою очередь может служить основой для разработки методов патогенетически обоснованной терапии этой группы заболеваний.

### **Положения, выносимые на защиту:**

1. Растворимый Аβ ассоциирован с липопротеинами высокой плотности спинномозговой жидкости здоровых доноров, в частности ЛПВПЗ и ЛПОВП.

2. Липопротеины высокой плотности, с которыми ассоциирован рАβ представляют собой сферические частицы со средним диаметром 16,8 нм и с молекулярной массой ~200 кДа.

3. Нативный рАβ был выделен из ЛПВП спинномозговой жидкости здоровых доноров.

4. Синтетические пептиды Аβ, длиной в 40 и 28 аминокислот, оказывают ингибирующее влияние на реакцию этерификации холестерина плазмы крови здоровых доноров, максимальный эффект составляет 40-50%

5. Первые 28 аминокислот внемембранной последовательности Аβ отвечают за ингибирование реакции этерификации холестерина.

6. Синтетический пептид Аβ1-40 в культуре клеток печени НерG2, оказывает ингибирующее действие на синтез внутриклеточных липидов. Этот эффект зависит от концентрации пептида.

7. Максимальный ингибирующий эффект Аβ1-40 на синтез липидов составляет: 40% для свободного холестерина, 30% для эфиров холестерина, 25% для фосфолипидов и 23% для триацилглицеринов.

### **Апробация работы.** Материалы диссертации докладывались на:

1. Межуниверситетской научной неврологической конференции, проводимой на базе Медицинского центра Нью-Йоркского Университета, Нью-Йорк, декабрь 1995.

2. Межлабораторном научном семинаре кафедры биохимии медицинского факультета Российского Университета Дружбы Народов РАМН, сентябрь 1995.

3. Научном семинаре лаборатории нейрхимии института неврологии РАМН, сентябрь 1995.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов, обсуждения, заключения и выводов. Она изложена на 123 страницах машинописного текста и иллюстрирована 6 таблицами, одной схемой и 16 рисунками. Библиография содержит 225 отечественных и зарубежных источника.

## **СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.**

**Спинномозговая жидкость** нормолипидемических доноров, не имеющих диагноза деменции, была получена из Клинической Лаборатории Нью-Йоркского Медицинского Центра. **Плазму крови** получали путем 15 мин центрифугирования цельной крови нормолипидемических доноров при 2500 об/мин при 4°C и немедленно использовали для экспериментов по определению скорости этерификации холестерина. **Синтетические**

**пептиды:** Аβ1-40 и Аβ1-28 были синтезированы твердофазным методом в Йельском Университете, США. **Липопротеины СМЖ** выделяли методом препаративного ультрацентрифугирования в роторе фирмы Beckman Ti 50.2. Во всех случаях центрифугирование проводили при 16°C и скорости 45000 об/мин. Сначала СМЖ подвергали центрифугированию при плотности 1,063 г/мл в течении 16 ч, получая флотирующий слой (1/10 объема), соответствующий общей фракции липопротеинов очень низкой плотности (ЛПОНП) и липопротеинов низкой плотности (ЛПНП). Инфранатант собирали, доводили до плотности 1,125 г/мл и центрифугировали в течении 20 ч, получая флотирующие ЛПВП2. Последовательными центрифугированиями в течении 40 ч при плотностях 1,21 г/мл и 1,25 г/мл получали фракции: ЛПВП3 и ЛПОВП, соответственно, и инфранатант— свободную от ЛП СМЖ (СЛПСМЖ). В отдельных случаях плотность цельной СМЖ доводили сразу до 1,25 г/мл и после 60 ч центрифугирования получали тотальную фракцию ЛПВП. Все фракции ЛП диализовали против воды, лиофилизировали и анализировали на общий белок, электронномикроскопически, высокоэффективной жидкостной гельфильтрацией, гелелектрофорезом и иммуноблот анализом с антителами против разных апобелков. Для электронной микроскопии (ЭМ) ЛПВП СМЖ диализовали, наносили на ЭМ-решетки и инкубировали 2 мин, затем фиксировали 2 мин в 2 % фосфотунгстате и визуализировали в электронном микроскопе Цейса при 80 kV. В случае иммуноэлектронной микроскопии (И-ЭМ) ЭМ-решетки после нанесения на них материала инкубировали в 0,5% растворе бычьего сыровоточного альбумина и 0,1% желатине 1 ч, а затем с поликлональными анти-Аβ антителами (SGY3160) 30 мин во влажной камере. После 2 отмывок материал инкубировали 30 мин с Протеином А, конъюгированным с частицами золота диаметром 10 нм, фиксировали 2% фосфотунгстатом и визуализировали в электронный микроскоп. Высокоэффективную Жидкостную Хроматографию (ВЖХ) проводили в ВЖХ-системе фирмы Waters. Нативную ВЖХ-гельфильтрацию проводили на колонке Супероза 6/60 фирмы Pharmacia, США. Колонку уравнивали и элюцию проводили буфером, содержащем 150 мМ NaCl, pH 7.3 и 1 мМ ЭДТА со скоростью потока 0.2 мл/мин и при длине волны детектора 214 нм. Обратно-фазную ВЖХ (ОФ-ВЖХ) вели на аналитической колонке Видак С4 (США). Аликвоты ЛПВП СМЖ растворяли в 200 мкл 20% ацетонитрила в 0,1% ТФУ и наносили на колонку. Элюцию проводили линейным градиентом 20-80% ацетонитрила в 0.1% ТФУ в течении 30 или 60 мин при скорости потока 0.5 мл/мин и длине волны детектора 214 нм. Фактор удержания вещества на колонке во всех случаях обозначали как  $k' = (t_R \times t_S) / t_S$ , где  $t_R$ — время задержания вещества в колонке или время элюции,  $t_S$ — значение  $t_R$  для вещества, не связанного с колонкой]. Гельэлектрофорез и иммуноблот анализ. Аликвоты ЛП СМЖ разделяли на Трис/Трициновом/SDS 10% и 14% ПААГе в редуцирующих условиях (200 мМ дитиотриетол), далее осуществляли электроперенос на Имобилон Р мембраны. Мембраны либо окрашивали Кумаси, либо инкубировали с 5% раствором сухого молока в 10мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

+ 150 мМ NaCl, pH 7,4 и затем с различными антителами в течении 16 ч при 4°C. Специфическое связывание выявляли вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена. Флуорограммы готовили с использованием хемилюминисцентного реагента фирмы DuPont (США) согласно инструкциям фирмы. Концентрацию Аβ определяли денситометрически. **Определение аминокислотной последовательности** интересующих белковых полос осуществляли методом автоматической Эдмановской деградации на 477А белковом анализаторе; образующиеся фенилгидантоиновые производные аминокислот определяли на подключенном к системе анализаторе фенилгидантоиновых производных аминокислот 120А (Applied Biosystem, США). **Масс-спектроскопия.** Очищенный методом ОФ-ВЖХ рАβ и синтетический пептид Аβ1-40 подвергали лазерному масс-спектроскопическому анализу. **Изучение влияния пептидов Аβ на реакцию этерификации холестерина в плазме крови здоровых доноров.** В начальный момент времени в экспериментах, проводимых без пептидов, каждая контрольная проба содержала 6 мкл свежей плазмы крови, 3 мкл 150 мМ йодоацетата и 3 мкл инкубационного буфера (50 мМ фосфата натрия, pH 7,4), в то время как каждая тестируемая проба содержала 6 мкл плазмы крови и 6 мкл инкубационного буфера. В экспериментах с синтетическими пептидами Аβ1-40, Аβ1-28 или человеческим сывороточным альбумином (ЧСА), 3 мкл раствора пептида или белка и 3 мкл 150 мМ йодоацетата добавляли к контрольной пробе, содержащей 6 мкл плазмы, в то время как 3 мкл пептида и 3 мкл инкубационного буфера добавляли в каждую тестируемую пробу (6 мкл плазмы). Все пробы инкубировали при 37°C в течении 40 минут. Реакцию останавливали добавлением 3 мкл 150 мМ йодоацетата к тестируемым пробам и 3 мкл инкубационного буфера к контрольным пробам, где реакция была заингибирована в начальный момент времени. Затем 100 мкл цветного реагента добавляли в каждую пробу и инкубировали 45 мин при 37°C. Оптическую плотность образцов измеряли спектрофотометрически на аппарате ELISA (Cambridge Technologies, США) при длине волны 490 нм. Скорость этерификации холестерина в плазме определяли как разницу концентраций холестерина в тестируемой пробе и в пробе, где реакция была заингибирована йодоацетатом (% уменьшения свободного холестерина в час). **Культура клеток.** Клетки печени человека HepG2 были получены из американской коллекции культуры клеток (АККК, Роквилл, США). Клетки выращивали в минимальной среде DMEM с 10% эмбриональной телячьей сывороткой (ЭТС), 6,99 мМ L-глутамином и антибиотиками (100 ед/мл пенициллина, 100 ед/мл стрептавидина) при 37°C в клеточном инкубаторе в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> и 95% O<sub>2</sub> в 6-луночных (35 мм в диаметре) пластиковых микротестах для культивирования клеток. **Метаболическое мечение вновь синтезированных липидов** осуществляли путем инкубирования клеток с 0,1 мКи <sup>14</sup>C-ацетата на лунку (0,5 мл DMEM без ЭТС). Эксперименты проводили в присутствии различных концентраций синтетического пептида Аβ1-40 или ЧСА и без пептида/ЧСА (контроль). После 3 ч инкубации клетки промывали с DMEM

без ЭТС и инкубировали 24 ч без радиоактивной метки и пептида. По окончании инкубации внутриклеточные липиды экстрагировали три раза смесью гексан : изопропанол (3:2, объем/объем) в течении 30 мин. Экстрагированные липиды анализировали методом тонкослойной хроматографии на пластинах Silica Gel G (Wattman, США). Непосредственно перед нанесением липиды растворяли в 20 мкл гексана. Разделение липидов проводили в системе петролиевый эфир: этиловый эфир: уксусная кислота (70:30:1, объем/ объем/ объем) и визуализировали парами йода. Области, соответствующие стандартам липидов вырезали из пластинок, помещали в сцинтилляционные пробирки с 2 мл сцинтилляционной жидкости (ICN, США) и анализировали степень радиоактивности в сцинтилляционном счетчике (Beckman, США). **Статистические методы.** Данные представлены в виде среднего значения с указанием стандартной ошибки. В экспериментах по определению влияния Аβ пептидов на: 1) скорость этерификации холестерина плазмы крови и 2) степень включения <sup>14</sup>C-ацетата в новосинтезированные липиды, достоверность различий средних величин в присутствии и в отсутствии синтетических пептидов определяли с помощью непараметрического критерия знаков Вилкоксона. Этот же критерий использовали для оценки различий в эффекте синтетических пептидов Аβ1-40 и Аβ1-28 на этерификацию холестерина в плазме крови.

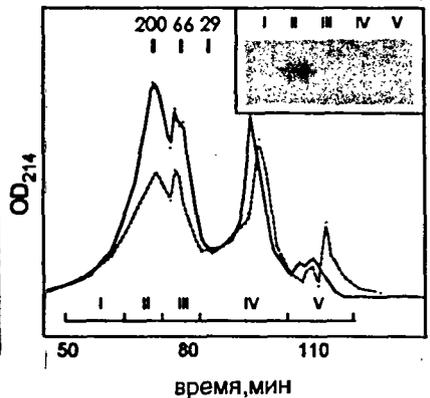
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.

### **Изучение ассоциации рАβ с ЛПВП3 и ЛПОВП.**

Основываясь на известных фактах ассоциации рАβ с ЛПВП3 и ЛПОВП в плазме крови и циркуляции в СМЖ только ЛПВП, представляло интерес изучить возможность взаимодействия рАβ с липопротеинами этого класса в спинномозговой жидкости. Для этого различные классы липопротеинов СМЖ выделяли методом препаративного ультрацентрифугирования. Для специфической характеристики апобелково-го состава выделенных ЛП все полученные фракции разделяли электрофорезом в ПААГе и окрашивали Кумаси. Белковый спектр был специфичен для каждого класса ЛП СМЖ (Рис.1а). Это подтверждали иммуноблот анализом с антителами против различных аполипипропротеинов (апо): А-I, А-II, А-IV, В, С-II, Е, J и сывороточный альбумин А (САА). Фракция с плотностью <1,063 г/мл содержала следовые количества апобелков ЛПВП СМЖ и не содержала апоВ, что свидетельствует об отсутствии апо-В содержащих фракций (ЛПОНП и ЛПНП) в нормальной СМЖ. Остальные фракции: ЛПВП2, ЛПВП3, ЛПОВП содержали в основном апоА-I (28 кДа) и апоЕ (34кДа) и в меньшем количестве апоС (6-8 кДа). Альбумин (66 кДа), основной компонент ИЛПСМЖ, составлял около ~1-3% всего белка ЛПВП (Рис.1а). Анализ белково-липидного состава ЛП СМЖ выявил, что ЛПВП содержали по весу 38,2 % белка, остальное содержание представляли липиды: фосфолипиды (34,8 %), холестерин (18,8 %) и триацилглицерины (8,8 %). Свободная от липопротеинов СМЖ, в отличие от фракций ЛПВП содержала только свой специфический белок: α1- антихимотрипсин.

**Рис. 3. Высокоэффективная жидкостная гельфильтрация ЛПВПЗ и ЛПОВП СМЖ.**

Фракции ЛПВПЗ (сплошная линия) и ЛПОВП (пунктирная линия) СМЖ подвергли ВЖХ гельфильтрации в нативных условиях. Позиция стандартов мол. массы указаны вверху. Иммуноблот анализ с моноклональными анти-А $\beta$  (6E10) антителами (вставка) выявил мономерную форму А $\beta$  только во фракции II (~ 200 кДа). Эта фракция обнаружила также иммунореактивность с антителами против аполиппротеинов: апоА-I, апоА-II, апоА-IV, апоЕ, апо J и САА (данные не показаны).



Для выявления рА $\beta$  в ЛП СМЖ, фракции, выделенные из 6 мл цельной СМЖ, разделяли на ПААГе, переносили на мембрану и анализировали с моноклональными антителами против А $\beta$  (6E10). Растворимый А $\beta$  был обнаружен преимущественно в ЛПВПЗ (Рис.1В, линия 3) и в ЛПОВП (линия 4). ЛПВП2 содержали значительно меньше рА $\beta$  (линия 2), в то время как во фракциях ЛПОНП+ЛПНП (линия 1) и СЛПСМЖ (линия 5) рА $\beta$  отсутствовал.

Локализация рА $\beta$  в ЛПВП была подтверждена:

- 1) Анализом N-концевой аминокислотной последовательности белка (Рис.1В, линия 3), по электрофоретической подвижности соответствующего синтетическому пептиду А $\beta$ 1-40, использованного в качестве контроля (Рис.1В, линия 6). Для этого область в 4 кДа вырезали из мембраны и подвергали автоматической Эдмановской деградации на белковом анализаторе. Полученная последовательность DAEFRXDXG (X-неидентифицированные аминокислоты) совпала с аминоконцевой последовательностью А $\beta$ .
- 2) Иммуноэлектронной и электронной микроскопией. Эпитопы А $\beta$  были обнаружены на поверхности ЛПВПЗ и ЛПОВП (Рис. 2А). Эти А $\beta$ -содержащие ЛП частицы имели сферическую форму и средний диаметр  $16,8 \pm 3,2$  нм, соответствующий диаметру ЛПВП СМЖ.
- 3) Высокоэффективной жидкостной хроматографией ЛПВПЗ и ЛПОВП на гельфильтрационной колонке (Рис. 3). После гельфильтрации все хроматографические фракции диализовали против воды, лиофилизировали, разгоняли на гельэлектрофореze, переносили на мембрану и анализировали иммуноблот анализом с антителами против различных апобелков: А-I, А-II, А-IV, Е и САА. Все эти аполиппротеины были выявлены во втором хроматографическом пике (пик II, Рис. 3). Этот пик с

молекулярной массой ~200 кДа, соответствующей известной молекулярной массе ЛПВПЗ, обнаружил также иммуореактивность с антителами против Аβ (Вставка, Рис. 3).

Полученные результаты являются доказательством положения, что рАβ в СМЖ ассоциирован с ЛПВП, в частности с ЛПВПЗ и ЛПОВП. Подобное взаимодействие ранее было обнаружено и в плазме крови, что позволяет сделать заключение об ассоциации рАβ с ЛПВП как общем явлении, которое может иметь место и в биологических жидкостях, и в тканях целостного организма.

### **Выделение нативного рАβ из спинномозговой жидкости.**

Обнаружение рАβ в ЛПВП СМЖ и его относительно высокая концентрация в СМЖ по сравнению с плазмой крови послужило основанием для его выделения из этих частиц. Выделение рАβ имело большой практический интерес, поскольку на сегодняшний день не существует метода выделения нативного рАβ и все физико-химические свойства этого белка изучаются на примере его синтетических гомологов. В настоящем исследовании предлагается оригинальный, быстрый и простой метод выделения нативного рАβ.

Метод выделения включает две основные стадии:

1) выделение Аβ-содержащей тотальной фракции ЛПВП из СМЖ методом ультрацентрифугирования при плотности < 1,25 г/мл. На этом этапе степень очистки рАβ составила примерно 100 раз;

2) двухэтапная обратно-фазная высокоэффективная жидкостная хроматография, выделенных ЛПВП. На первом этапе ОФ-ВЖХ ЛП высокой плотности СМЖ проводили с 30 минутным градиентом ацетонитрила. Профиль элюции представлен на Рис. 4А. Все хроматографические фракции были разделены на ПААГе и окрашены Кумаси для выявления белкового спектра. Во фракциях 8-11 выявлялись два основных белка, по молекулярной массе соответствующих апо А-1 (28 кДа) и апоЕ (34 кДа). Для специфического выявления рАβ и апобелков, белки геля перенесли на мембрану и окрашивали иммунохимически с моноклональными анти-Аβ (6Е10) антителами и антителами против различных апобелков: А-1, Е, А-IV, J, САА (данные не показаны). Около 80% рАβ было выявлено во фракциях 4 и 5 (Рис. 4А, фракции 4-5:  $k' = 1,93-1,96$ ). Остальные 20% рАβ были обнаружены в других фракциях: в альбуминсодержащей фракции, которая элюировала сразу после рАβ (Рис. 4А, фракция 6:  $k' = 2,1$ ), и во фракциях, содержащих апоА-1, апоЕ, апо С и другие апобелки ЛПВП СМЖ (Рис. 4А, фракции 8-11:  $k' = 2,6-3,52$ ). Для получения более чистой фракции рАβ был проведен дополнительный этап очистки на ОФ-ВЖХ. Фракции 4-5, собранные в пяти хроматографических экспериментах, объединяли и лиофилизировали; объединенную фракцию подвергали ОФ-ВЖХ с 60 минутным градиентом ацетонитрила (Рис. 4В). Все хроматографические фракции разделяли на ПААГе и переносили на мембрану. Иммуоблот анализ с моноклональными анти-Аβ антителами (6Е10) выявил рАβ преимущественно

**Таблица 1. Выделение рАβ из спинномозговой жидкости здоровых доноров (60 мл).**

Этупени очистки	Объем (мл)	Общий белок	рАβ (нг)	Степень очистки (%)
Цельная СМЖ	60	21.25 мг	—	—
I. Ультрацентрифугирование СМЖ при 1.25 г/мл (выделение ЛПВП)	6	0.25 мг	451	100
II. 1-ая ОФ-ВЖХ, 30 мин градиент (фракции 4/5, x5)	2	0.5 мкг	357	50000
III. 2-ая ОФ-ВЖХ, 60 мин градиент (фракция 7)	0.25	—	250	100000

о фракции 7 (Рис.5, линия 7). Фактор  $k'$  для рАβ в данных условиях роматографической элюции составил 2,96 (Рис. 4В, фракция 7) и совпадал с значением фактора  $k'$  для синтетического пептида Аβ1-40, использованного в качестве контроля.

Следует отметить, что выделенный рАβ был представлен мономерной и димерной формами (Рис. 5, линии 7-11). Однако димерная форма белка полностью отсутствовала в случае иммуноблот анализа нативных ЛПВП (Рис. 1) и ЛПВП, подвергнутых нативной гельфильтрации (Рис. 3, вставка). Это наблюдение можно объяснить тем, что при репаративном ультрацентрифугировании, равно как и при гельфильтрации, проводимой в нативных условиях, ЛПВП СМЖ сохраняют свою изологическую целостность, в то время как органический растворитель при ОФ-ВЖХ приводит к разрушению липопротеиновых частиц. Возможно, при этом нарушается физиологическая ассоциация рАβ с ЛПВП СМЖ, как следствие, приводит к его димеризации. С другой стороны, такое эведение может отражать хроматографические свойства самого белка, поскольку синтетический пептид Аβ1-40 ведет себя аналогично, т.е. агрегируется в течении ОФ-ВЖХ. Таким образом, на основании полученных результатов можно сделать предположение о важности липидного окружения для поддержания рАβ в физиологической конформации.

Выделенный рАβ также был охарактеризован анализом N-концевого аминокислотной последовательности и масс-спектроскопией. Таким образом, с помощью комбинации ультрацентрифугирования и ОФ-ВЖХ удалось быстро и эффективно выделить рАβ из ЛПВП СМЖ со степенью очистки белка 100000 раз (Таблица 1). Разработанный метод можно использовать с целью получения нативного рАβ в репаративных количествах, необходимых для дальнейшего изучения его физико-химических и биологических свойств.

### **Изучение влияния синтетических пептидов Аβ на реакцию этерификации холестерина.**

Реакция этерификации холестерина плазмы крови катализируется ферментом ЛХАТ, который специфически локализуется в ЛПВП плазмы крови человека. Смысл реакции заключается в переносе остатка жирной кислоты от фосфотидилхолина к гидроксильной группе холестерина, в результате образуются эфиры холестерина и лизофосфатидилхолин.

Располагая фактом ассоциации рАβ с ЛПВП и ЛПОВП, а также известной взаимосвязью рАβ с Апо А-I, основным кофактором ЛХАТ представляло интерес проверить влияние рАβ на реакцию этерификации холестерина. С этой целью определяли скорость этерификации эндогенного холестерина плазмы крови здоровых доноров. Реакцию этерификации оценивали путем прямого определения количества эндогенного свободного ХС в тестируемых образцах плазмы крови. Реакцию проводили в присутствии различных концентраций синтетических пептидов Аβ1-40 и Аβ1-28: 0,001; 0,01; 0,1; 1 и 10 нг/мл; в качестве отрицательного контроля использовали ЧСА. Влияние синтетических пептидов на реакцию этерификации выражали в процентах от контроля (без пептидов), принятого за 100%. Концентрация свободного холестерина в контрольной пробе (без пептида), где в начальный момент времени реакция была заингибирована, составляла  $1,35 \pm 0,12$  ммоль/л.

Добавление пептидов в реакционную среду в диапазоне физиологических концентрации рАβ ингибировало этерификацию холестерина (Рис. 6). Это позволяет сделать предположение о том, что ингибирующий эффект Аβ может иметь место и в физиологических условиях. Максимальный эффект ингибирования составлял 40-50%. Статистический анализ не выявил различий в действиях Аβ1-40 и Аβ1-28. На основании этих данных было сделано заключение об ответственности внеклеточной 1-28 аминокислотной последовательности Аβ за ингибирующий эффект. ЧСА не оказывал влияния на реакцию этерификации холестерина.

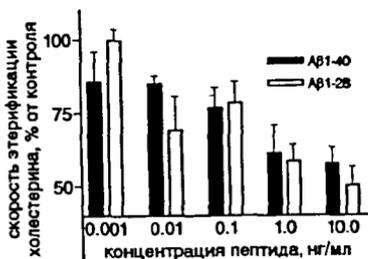
Таким образом, полученные результаты позволяют сделать вывод, что одной из возможных физиологических функций рАβ является ингибирование реакции этерификации холестерина в плазме крови.

### **Исследование влияния синтетического пептида Аβ1-40 на синтез внутриклеточных липидов.**

Существующие в литературе экспериментальные доказательства нарушения мембранных липидов при БА, побудили к изучению влияния на биосинтез отдельных классов липидов. Общепризнанной моделью для изучения метаболизма липидов является клетки печени. Поэтому для исследования была выбрана культура клеток печени человека HepG2. Клетки инкубировали в присутствии синтетического пептида Аβ1-40 в концентрациях: 0 (контроль); 0,5; 1; 5; 10; 100 и 500 нг/мл среды. Как отрицательно

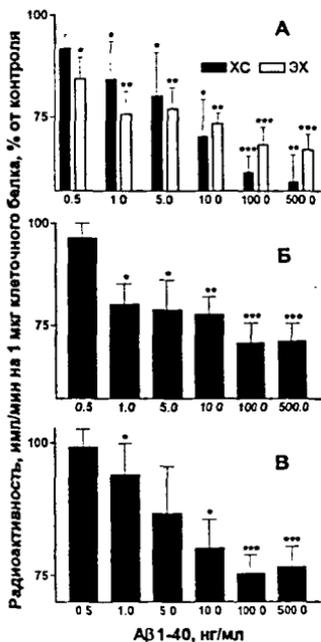
### с.6. Влияние синтетических пептидов Аβ1-40 и Аβ1-28 на эрификацию холестерина в плазме крови.

Анализ эффекта синтетических пептидов Аβ1-40 и 1-28 на этерификацию тестерина в плазме крови в зависимости от их концентрации проводили согласно протоколу в главе "Экспериментальная часть". Данные представлены в виде графика зависимости скорости эрификации холестерина (% от контроля) концентрации пептидов (нг/мл): Аβ1-40 (темные бары) и Аβ1-28 (светлые бары). Скорость этерификации холестерина в контроле (без пептида) была принята за 100%. Начиная с концентрации 0.1 нг/мл скорость эрификации была статистически значимо (<0.05).



### с.7. Влияние синтетического пептида Аβ1-40 на синтезы липидов в культуре клеток печени человека HepG2.

Влияние синтетического пептида Аβ1-40 на внутриклеточный синтез холестерина и его эфиров (А), фосфолипидов (Б) и триглицеридов (В) оценивали по степени встраивания С<sup>14</sup>-ацетата во вновь синтезированные липиды в печеночных клетках HepG2. Клетки инкубировали в присутствии различных концентраций Аβ1-40. В качестве контроля инкубацию проводили без пептида (полученные значения принимали за 100%). Данные представляли в виде среднего значения с указанием стандартной ошибки. В диапазоне концентраций Аβ1-40 от 0.5 до 100 нг/мл среды эффект ингибирования достигал своего насыщения и составлял 40% для холестерина, 30% для эфиров холестерина, 25% для фосфолипидов и 23% для триглицеридов.



тельный контроль использовали ЧСА. Влияние Аβ1-40 на синтез внутриклеточных липидов оценивали по степени встраивания радиоактивного <sup>14</sup>C-ацетата во вновь синтезированные фосфолипиды свободный и этерифицированный холестерин и триацилглицерин. Внутриклеточные липиды экстрагировали и разделяли методом тонкослойной хроматографии. Области, соответствующие положению липидных стандартов, вырезали и степень их радиоактивности оценивали на сцинтиллаторе. Полученные данные для каждого класса липидов выражали как <sup>14</sup>C-радиоактивность имп/мин на 1 мкг клеточного белка процента от контроля (без пептида), принятого за 100%. Контрольные значения (без пептида) для разных липидов составляли (имп/мин/ мкг клеточного белка): 18,54 ± 0,54 для фосфолипидов, 0,534 ± 0,02 для свободного холестерина и его эфиров и 7,63 ± 0,42 для триацилглицеринов.

Синтетический пептид Аβ1-40 оказывал ингибирующее действие на синтез внутриклеточных липидов разных классов, в частности на синтез фосфолипидов, свободного холестерина и его эфиров и триацилглицерина (Рис. 7). Статистически значимые результаты ингибирующего эффекта были получены при концентрациях пептида 0,5-10 нг/мл среды соответствующих физиологическим концентрациям рАβ (концентрация Аβ в плазме крови 1 нг/мл, а в СМЖ 4-20 нг/мл). Это может отражать еще одну физиологическую функцию Аβ в обмене липидов: регуляцию синтеза внутриклеточных липидов. Ингибирующее влияние Аβ1-40 на внутриклеточный синтез было различным для липидов разных классов. Наибольший эффект пептид оказывал на синтез свободного холестерина: ингибируя его синтез на ~40%. В меньшей степени были снижены синтез эфиров холестерина (на 30%), фосфолипидов (на 25%) и триацилглицеринов (на 23%). ЧСА не оказывал влияния на синтезы липидов.

В диапазоне концентраций Аβ1-40 от 10 до 100 нг/мл среды эффект достигал своего насыщения. В физиологических условиях столь высокие концентрации Аβ (100-500 нг/мл среды) маловероятны, однако такие концентрации могут иметь место локально в ткани мозга больных БА.

Обнаруженный эффект ингибирования синтеза липидов амилоидом β, позволяет дать объяснение ряду экспериментальных наблюдений и предложить следующую вероятную схему патогенеза β-амилоидоза мозга. Известно, что повышенное содержание холестерина в организме приводит к увеличению продукции Аβ, высокие концентрации которого, в данном настоящей работы, в свою очередь ингибируют синтез холестерина. С другой стороны в высоких концентрациях Аβ полимеризуется с образованием амилоидных отложений в ткани мозга, что составляет морфологическую и биохимическую основу главных признаков БА, СД и сенильной деменции.

Таким образом, обнаруженные ингибирующие эффекты амилоида β на реакцию этерификации холестерина в плазме крови и на синтез внутриклеточных липидов позволяют сделать заключение о важной роли

ого белка в регуляции обмена липидов. Наряду с этим, полученные данные об ассоциации Аβ с липопротеинами высокой плотности дают основание рассматривать Аβ в качестве непосредственного участника метаболизма липидов.

## ВЫВОДЫ

1. Растворимый Аβ ассоциирован с липопротеинами высокой плотности спинномозговой жидкости здоровых доноров, а именно с ЛПВП3 и ЛПВП1.

2. Липопротеины высокой плотности, с которыми ассоциирован рАβ представляют собой сферические частицы со средним диаметром 16,8 нм и молекулярной массой 200 кДа.

3. Нативный рАβ был выделен из ЛПВП спинномозговой жидкости здоровых доноров.

4. Синтетические пептиды Аβ, длиной в 40 и 28 аминокислот, оказывают ингибирующее влияние на реакцию этерификацию холестерина в плазме крови здоровых доноров; максимальный эффект составляет 40-50%

5. Первые 28 аминокислот внеклеточной последовательности Аβ отвечают за ингибирование реакции этерификации холестерина.

6. Синтетический пептид Аβ1-40 в культуре печеночных клеток HepG2, оказывает ингибирующее действие на синтез внутриклеточных липидов. Этот эффект зависит от концентрации пептида.

7. Максимальный ингибирующий эффект Аβ1-40 на синтез внутриклеточных липидов составляет: 40% для свободного холестерина, 25% для эфиров холестерина, 25% для фосфолипидов и 23% для триглицеридов.

## СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ.

Is amyloid beta an apolipoprotein? // In: Neuroscience Meeting Abstract Book. New York University Medical Center, New York, USA, 2-3 Dec.-1995 /leag. Koudinov A.R., Kumar A.

Alzheimer's peptides Aβ1-40 and Aβ1-28 inhibit the plasma cholesterol esterification rate // Biochem Mol Biol Internat- 1996.- Vol. 38 (4)- p. 747-752 /leag. Koudinov A.R., Berezov T. T./

Амилоид β в плазме крови и спинномозговой жидкости ассоциирован с липопротеинами высокой плотности.// Вопр. Мед. Химии. - 1996. -т. 42.- 2.- с. /соавторы Куудинов А.Р., Березов Т.Т./

Alzheimer's soluble amyloid protein is associated with high density lipoproteins in normal human cerebrospinal fluid and is secreted by HepG2 cells as a part of lipoprotein complexes. // 26th Annual Meeting, Society for Neuroscience Washington, DC, USA, 1996 (nov 16-21)- Abstract Book 22.- p. /leag. A.R. Koudinov, A. Kumar, R.S. Beavis, J. Ghiso.

## THE AMYLOID BETA PROTEIN AND LIPID METABOLISM

N.V. Koudinova.

Department of Biochemistry, Russian Peoples' Friendship University.  
Miklucho-Maklay St., 8, Moscow 117198, Russia.

### SUMMARY

The amyloid fibrils of Alzheimer's disease and Down's syndrome amyloid deposits are composed mainly of aggregated amyloid beta protein (A $\beta$ ) which also exists in a soluble form. The soluble form of amyloid  $\beta$  protein (sA $\beta$ ) associated with high density lipoprotein (HDL) in normal human plasma. To ascertain whether sA $\beta$  to HDL association is a rather more general phenomenon taking place in other biological fluids and reflecting sA $\beta$  function(s) in lipid metabolism the colocalization of sA $\beta$  with lipoproteins (LP) in CSF and the effects of A $\beta$  peptides on plasma cholesterol esterification and on synthesis of lipids in hepatoma cells were investigated. Normal human CSF LPs were obtained by sequential flotation ultracentrifugation and analysed for the presence of sA $\beta$  via immunoblot, size-exclusion (SE) HPLC, immunoelectron microscopy, N-terminal sequence and mass-spectrometry analyses. Soluble A $\beta$  was associated with ~200 kDa CSF-HDL particles of  $16.8 \pm 3.2$  nm in diameter. A ~4.3 kDa component purified by reverse phase HPLC was immunoreactive with anti-A $\beta$  antibodies, exhibited an N-terminal sequence identical to the A $\beta$  peptide and a mass of 4325.1 Da, indicating that the main sA $\beta$  species associated with CSF-HDL is sA $\beta$ 1-40. Our novel method for purification of sA $\beta$  can be used for the peptide preparative isolation for its further studies.

The studies of the effect of synthetic peptides A $\beta$ 1-40 and A $\beta$ 1-28 on normal human plasma cholesterol esterification, assessed colourimetrically, revealed that both peptides at a concentration of 1 ng/ml inhibited plasma cholesterol esterification rate to 40-50 % of control value. Statistical analysis showed no differences in the effect of A $\beta$ 1-40 and A $\beta$ 1-28 on the inhibition, suggesting the importance of A $\beta$  sequence 1-28 for this effect.

We also studied the effect of synthetic peptide A $\beta$ 1-40, homologous to the major circulatory species of Alzheimer's amyloid  $\beta$  protein (A $\beta$ ), on multiple lipid biosyntheses in human hepatoma HepG2 cells. This culture synthesizes various lipids from [ $^{14}$ C]-acetate as a precursor. Treatment of cells with different concentrations of A $\beta$ 1-40 decreased the syntheses of various radiolabeled lipid species. The decrease reached saturation at the peptide concentration equal to 100 ng per ml of media. The lipids whose synthesis was most decreased were free and esterified cholesterol and phospholipids. This inhibitory effect suggests that A $\beta$  protein may modulate physiological intracellular lipid syntheses. It may be of special importance in the pathological condition and contribute to neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders. Our results suggest that sA $\beta$  to LP association represents a common mechanism for peptide transport in biological fluids and that sA $\beta$  has important functions in lipid metabolism.