

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ
УДК 612.82;16.001.31:577.112.115

АМИЛОИД β В ПЛАЗМЕ КРОВИ И СПИННОМОЗГОВОЙ ЖИДКОСТИ АССОЦИИРОВАН С ЛИПОПРОТЕИНАМИ ВЫСОКОЙ ПЛОТНОСТИ.

Н. В. КУДИНОВА^{1,2}, А. Р. КУДИНОВ³, Т. Т. БЕРЕЗОВ¹.

Кафедра биологической химии Медицинского факультета Российского Университета Дружбы Народов¹
Кафедра медицины² и патологии³ Медицинского Центра Нью-Йоркского Университета, США.

В настоящем исследовании было обнаружено, что растворимая форма амилоида бета ($\text{pA}\beta$) в плазме крови и спинномозговой жидкости (СМЖ) здоровых доноров ассоциирована с липопротеинами очень высокой плотности (ЛПОВП). Это было доказано: в плазме крови - иммунопреципитацией $\text{A}\beta$ из ЛПВПЗ и ЛПОВП; в СМЖ — иммуноблот-анализом, высокоэффективной жидкостной гелевой фильтрацией и иммуноэлектронной микроскопией. Полученные данные позволяют заключить, что $\text{pA}\beta$ в биологических жидкостях организма транспортируются в составе ЛПВП.

Отложения специфического белка амилоида бета ($\text{A}\beta$) в виде амилоидных фибрилл в ткани и сосудах мозга составляют один из основных морфобioхимических признаков болезни Альцгеймера (БА), синдрома Дауна и старческого слабоумия (деменции). Приобретенная или наследственно предрасположенная, БА является наиболее частой формой человеческого амилоидоза и главной причиной деменции, которой страдают 5-10 % населения в возрасте старше 65 лет [1] и до 20 % населения старше 80 лет. По данным С. И. Гавриловой [2], на территории бывшего СССР сенильные деменции составляют 7,6 % от всех впервые зарегистрированных в психоневрологическом диспансере больных позднего возраста.

Аβ состоит из 39-43 аминокислотных остатков. Он является протеолитическим продуктом своего предшественника — трансмембранного гликопротеина, ген которого локализован на 21 хромосоме [3].

В течение длительного времени полагали, что Аβ является исключительно патологическим белком, однако в 1992 году Аβ был обнаружен в плазме крови и спинномозговой жидкости (СМЖ) не только больных, но и здоровых людей и в секретах многих клеточных линий в нормальной, растворенной, а не агрегированной форме [4, 5, 6]. Стало ясным, что Аβ является нормальным белком организма. Компьютерный анализ Аβ показывает, что это чрезвычайно гидрофобная молекула, склонная к агрегации и полимеризации. Что же тогда предотвращает полимеризацию растворимой формы Аβ и удерживает его в нативной физиологической конформации?

Синтетические пептиды, гомологичные Аβ легко образуют амилоидные фибриллы в воде и физиологических растворах [7, 8, 9, 10]. Эти же синтетические пептиды при инкубации со спинномозговой жидкостью фибриллы не образуют, но полимеризуются при инкубации с ультрафильтратом [11]. На основании этого простого эксперимента было сделано предположение, что рАβ может быть связан с неизвестными на сегодня макромолекулами плазмы и СМЖ, которые поддерживают его в растворенной форме.

Ранее в экспериментах *in vitro* было показано, что синтетические Аβ пептиды взаимодействуют с α1-антихимотрипсином, витронектином, а также с аполипопротеинами (апо) J, А-1 и Е [12, 13, 14, 15, 16, 17, 18]. Поскольку вышеуказанные апобелки входят в состав липопротеиновых частиц, то целью настоящей работы явилось исследование ассоциации рАβ с липопротеинами (ЛП) плазмы крови и спинномозговой жидкости (СМЖ).

Методика. Забор крови осуществляли у нормальных доноров натощак в пробирки, содержащие 1 мг/мл ЭДТА [19]. Плазму получали путем центрифугирования цельной крови при 2500 об/мин в течение 15 мин. Супернатант отбирали и добавляли PMSF до конечной концентрации 1 мМ.

Спинномозговая жидкость нормальных доноров была получена из Клинической лаборатории Нью-Йоркского Медицинского Центра.

Синтетический пептид Аβ1-40 был синтезирован твердофазным методом в Йельском Университете, США. Препарат синтетического пептида очищали обратно-фазной высокоэффективной жидкостной хроматографией (ВЖХ) на колонке Вика С4. Элюцию проводили линейным градиентом 20-80% ацетонитрила в 0,1% трифторуксусной кислоте при скорости потока 1,0 мл/мин. Синтетический пептид Аβ1-40 биотинилировали с использованием Сульфо-NHS-Биотина (Пирс, США) согласно следующему протоколу: 1 мг Аβ1-40 растворяли в 1 мл 50 мМ бикарбоната Na, pH 8,5, содержащем 30% ацетонитрила. Затем добавляли 0,32 мг Сульфо-NHS-Биотина и смесь инкубировали в течение 2 ч при 4°C при вращении на мешалке. Для удаления не прореагировавшего биотина реакционную смесь центрифугировали при 1000 x g в течение 30 мин в микроконцентраторе Центриконт 3тм 3,000 (Амикон, США), после чего надосадочный материал разбавляли 150 мМ NaCl и 10 мМ Tris (TBS), pH 7,4, содержащем 30% ацетонитрила. После двух центрифугирований в аналогичных условиях биотинилированный пептид лиофилизировали в аликвотах и хранили при -70°C.

Липопротеины (ЛП) плазмы крови/СМЖ выделяли методом препаративного ультрацентрифугирования [19] и в роторе фирмы Beckman Ti 50,2. Все центрифугирования проводили при 16°C и скорости 45 тыс. об/мин; плотности препаратов на каждом этапе доводили сухим КВг по расчетной формуле, опубликованной ранее [19]. Сначала плазму подвергали ультрацентрифугированию при ее исходной плотности 1,0063 г/мл (d). Через 16 ч флотирующий слой липопротеинов очень низкой плотности (ЛПОНП) отбирался, а инфранатант или цельная СМЖ доводились до плотности 1,063 г/мл и центрифугировались повторно в течение того же времени, давая флотирующий слой ЛП низкой плотности (ЛПНП) в случае плазмы и фракцию ЛПОНП+ЛПНП в случае СМЖ. Инфранатант собирали, доводили до плотности 1,125 г/мл и центрифугировали в течение 20 ч, получая флотирующие ЛП высокой плотности 2-ого подкласса (ЛПВП2). Последующими центрифугированиями в течение 40 ч получали ЛП высокой плотности 3-его подкласса (ЛПВП3; d 1,21 г/мл) и ЛП очень высокой плотности (ЛПОВП; d 1,25 г/мл), и инфранатант — избавленную от ЛП плазму (ИЛПП) или избавленную от ЛП СМЖ (ИЛПП-СМЖ). Все полученные фракции диализовали против TBS pH 7,4, содержащего 1 мМ ЭДТА и хранили при 4°C до использования в экспериментах.

Определение содержания общего белка осуществляли методом Бредфорда, используя реагент фирмы; Bio-Rad (США). В качестве стандартов использовали 2 мг/мл раствор бычьего сывороточного альбумина (БСА) от фирмы Пирс, США. Содержание холестерина и триглицеридов в ЛПВП СМЖ и ИЛП-СМЖ измеряли калориметрически, используя коммерческие киты. Содержание неэтерифицированного холестерина и фосфолипидов определяли по уже известным методикам [20, 21]. Липидные стандарты и стандарты холестерина были от фирмы Sigma (США). Измерение содержания белка и всех липидов осуществляли на 96 луночных микропланшетах (Dinatek). Данные представлены как среднее значение семи измерений с указанием стандартной ошибки.

Аликвоты ЛП СМЖ из 12 мл начального объема СМЖ подвергали ВЖХ методом гельфильтрации на колонке Супероза 6/60 (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 с системным давлением 60-72 Psi и длине волны детектора 214 нм. В качестве стандартов использовали стандарты молекулярных масс для гельфильтрации (Sigma, США). Каждую фракцию, сошедшую с колонки диализовали против воды и лиофилизировали.

Для электронной микроскопии (ЭМ) аликвоты всех полученных ЛП фракций СМЖ и ИЛП-СМЖ диализовали против 5 мМ Na₂(CO₃)₂ и 1 мМ EDTA в микродиализаторе (Reagee, США) с диализной мембраной с размером пор 1 кДа, после чего 15 мкл каждой фракции наносили на электронно-микроскопические решетки (400 ячеек на решетку) и инкубировали в течение 2 мин. Удержанный на решетках материал фиксировали водным раствором 2% фосфотунгстата, pH 7,3 в течение 2 мин. Визуализировали материал в электронном микроскопе Цейса при 80 kV [22].

В случае иммуноэлектронной микроскопии (И-ЭМ) обработку различными реагентами осуществляли последовательным переносом ЭМ-решетки из одного раствора в другой. Сперва решетки с нанесенным на них материалом подвергали заливке неспецифических сайтов в течение 1 ч при комнатной температуре 0,5% БСА и 0,1% желатина в растворе TBS, pH 7,4, после чего инкубировали в течение 30 мин с поликлональными анти-Аβ антителами (SGY3160) [23]. После инкубации с первичным антителом ЭМ-решетки промывали в том же буфере, содержащем 0,05 % Твин-20 (TBS-T) и далее инкубировали 30 мин с Протеином А, конъюгированным с частицами золота диаметром 10 нм (Амершам, разведение 1:50) в TBS, pH 7,4, содержащим 0,5 % БСА и 0,1 % желатина. Процедуру завершали отмыванием в TBS-T в течение 10 мин, а затем в TBS, после чего материал фиксировали 2% фосфотунгстатом натрия и визуализировали в электронном микроскопе.

Для иммунопреципитации и иммунодетекции белков на мембранах использовали следующие антитела в разведении 1:500: поликлональные анти-Аβ SGY3160 и SGY2134, анти-Аβ 1-28 [24], анти-α1-антихимотрипсин, анти-SAA (Кальбиохем, США) и анти-апоА-IV (Кортекс Биохем, США) и моноклональные: анти-Аβ (6E10) [14], анти-β цепь апоJ (IF12) [25], анти-апоЕ, анти-апоА-1.

Для иммунопреципитации в денатурирующих условиях 40 мг каждой фракции ЛП плазмы (2 мг в случае ЛП фракций, содержащих биотинилированный синтетический пептид Аβ1-40) и 200 мг ИЛПП или 5 мг ИЛП СМЖ из 14-15 мл начальной СМЖ, смешивали с 5 х РИПА буфером (1:5 по объему), содержащим 150 мМ NaCl/ 50 мМ Tris/HCl, pH 8,0/ 1,0%, ТритонаX-100/ 0,5 % холиевой кислоты/ 0,1 % SDS/ 5 мМ, ЭДТА, после чего объем всех фракций доводили однократным РИПА до конечного объема 14 мл. Для иммунопреципитации использовали смесь из следующих ингибиторов протеаз в конечных концентрациях: 1 мМ PMSF, 1 мкг/мл леупептина, 0,1 мкг/мл пепстатина и 1 мкг/мл Na-p-тозил-L-лизин хлорометил кетона. В качестве положительного контроля использовали 50 нг синтетического Аβ1-40, который в объеме 14 мл РИПА иммунопреципитировали с анти-Аβ1-28. Иммунопреципитацию при неденатурирующих условиях проводили в TBS, pH 7,4, содержащем указанные выше ингибиторы протеаз. После добавления антител и 50 мкл Протеин G-Сефарозы, реакционную смесь инкубировали при 4°C в течение 12 ч при постоянном перемешивании, затем гранулы Протеин G-Сефарозы осаждали низкоскоростным центрифугированием и отмывали четыре раза с TBS, pH 7,4. Избавленная от ЛП плазма и цельная СМЖ перед добавлением любого антитела инкубировалась со 100 мкл Протеин G-Сефарозы в течение 3 ч при 4 °C для удаления содержащихся в плазме крови и СМЖ иммуноглобулинов.

Аликвоты каждой ЛП фракции и иммунопреципитированные белки разделяли на Трис/Трициновым/SDS 10% и 14% полиакриламидном геле (ПААГ) электрофорезе в редуцирующих условиях (200 мМ дитиотриетол), после чего осуществляли электроперенос на Имобилон Р мембраны в течение 2 ч при 400 мА в 3-циклогексил-амино-1-пропанесульфо-кислотном (Aldrich, США) буфере, pH 11,0, содержащем 10% метанола. Мембраны забивали TBS, содержащим 5% БСА и инкубировали с различными антителами в течение ночи при 4°C. Вторичные анти-мышинные или анти-кроличьи антитела использовали в разведении 1: 3,000 в буфере, содержащем 150 мМ NaCl/50 мМ TrisHCl, pH 7,4, 0,3% Твин20, 0,3% БСА и 10% глицерина. В случае визуализации биотинилированного синтетического Ab1-40, мембраны, после забивки, инкубировали со стрептавидином, конъюгированным с пероксидазой хрена (разведение 1:700). Флуорограммы готовили с использованием хемилюминисцентного реагента фирмы DuPont, США согласно инструкциям фирмы.

Результаты и обсуждение. Наше предположение об ассоциации амилоида β с липопротеиновыми частицами в нормальной плазме крови и СМЖ основывалось на ранее полученных результатах экспериментов *in vitro* о взаимосвязи синтетических аналогов А β с аполипотеинами J, A-I, E, которые являются белковыми компонентами липопротеинов.

Для *in vitro* экспериментов мы использовали плазму крови здоровых доноров, прединкубированную с биотинилированным синтетическим пептидом А β 1-40 (2 мкг А β 1-40 на 20 мл плазмы). Далее методом ультрацентрифугирования из плазмы были выделены различные классы ЛП: ЛПОНП, ЛПНП, ЛПВП2, ЛПВП3, ЛПОВП. Все полученные фракции были охарактеризованы иммуноблот-анализом с антителами против различных апобелков, специфических для различных классов ЛП (Таблица 1). Обнаружение биотинилированного пептида осуществляли денатурирующей иммунопреципитацией всех фракций с антителами анти-А β 1-28 против А β с последующим гелеэлектрофорезом и иммуноблот-анализом со стрептавидином (Рис.1). Биотинилированный А β был обнаружен в ЛПВП3 (линия 5) и ЛПОВП (линия 6) и в меньших количествах в ЛПВП2 (линия 4). В качестве положительного контроля использовали небитинилированный синтетический пептид А β 1-40 (линия 7), иммуноокрашенный с моноклональными антителами против А β (6E10). Данный результат свидетельствует, что при инкубации с плазмой крови синтетический пептид А β 1-40 перераспределяется в липопротеины высокой плотности, что предполагает наличие такого взаимодействия в случае природного рА β .

Для проверки этого предположения ЛП, выделенные из плазмы крови и плазму свободную от ЛП подвергали неденатурирующей иммунопреципитации с поликлональными анти-А β (SGY2134) антителами. Полученные иммунопреципитаты анализировали гелеэлектрофорезом и иммуноблот-анализом с моноклональными анти-А β 4G8 антителами (Рис.2). Как и синтетический пептид в экспериментах *in vitro*, природный



Рис. 1. Иммунопреципитация биотинилированного синтетического пептида А β 1-40 из различных фракций липопротеинов плазмы крови здоровых доноров.

1 — плазма, избавленная от ЛП; 2 — ЛПОНП; 3 — ЛПНП; 4 — ЛПВП2; 5 — ЛПВП3; 6 — ЛПОВП; 7 — 50 нг небитинилированного синтетического пептида А β 1-40; М — маркеры мол. масс, кДа.

Иммунохимическая характеристика очищенных липопротеинов плазмы крови (а) и спинномозговой жидкости (б) здоровых доноров

Таблица 1

ЛП плазмы	Аполипопротеины								
	A-I	A-II	A-IV	B	C-II	E*	J	CAA	раβ
ЛПОНП	-	-	-	+	+	+++	-	-	-
ЛПНП	-	-	-	++	-	+++	-	-	-
ЛПВП2	++	++	-	-	±	+	-	+	±
ЛПВП3	+++	+++	+	-	+	+	++	++	++
ЛПОВП	++	+	++	-	+	-	+	-	++

ЛП СМЖ									
ЛПОНП+	±	-	±	-	-	±	-	±	-
ЛПНП									
ЛПВП2	+++	++	++	-	++	+++	±	++	+
ЛПВП3	+++	++	+	-	+	++	++	++	+++
ЛПОВП	+	±	±	-	-	±	++	±	+++

Примечание. Присутствие каждого аполипопротеина в каждой из ЛП фракций выражали относительно его содержания в других ЛП фракциях.

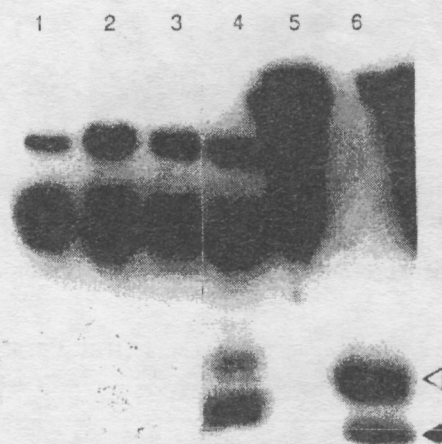


Рис. 2. Иммунопреципитация раβ из ЛПВП3 + ЛПОВП плазмы крови здоровых людей 1 — ЛПОНП; 2 — ЛПНП; 3 — ЛПВП2; 4 — ЛПВП3 + ЛПОВП; 5 — извлеченная от ЛП плазма; 6 — 25 нг синтетического пептида.

Аβ был обнаружен в ЛПВП3 и ЛПОВП (Рис.2, линия 4) и отсутствовал во фракциях ЛПОНП, ЛПНП и плазме, извлеченной от липопротеинов (Рис.2). Итак, в плазме крови здоровых доноров раβ ассоциирован с липопротеинами высокой плотности.

Ассоциация раβ с ЛПВП в плазме предполагает возможную связь раβ с липопротеиновыми частицами и в спинномозговой жидкости. Различные классы липопротеинов СМЖ выделяли методом препаративного ультрацентрифугирования при плотностях, принятых для выделения ЛП плазмы. С целью характеристики различные фракции ЛП СМЖ были разделены электрофорезом в ПААГе. Окраска Кумаси выявила сходный

белковый состав ЛПВП2, ЛПВП3 и ЛПОВП (Рис.3а). Иммуноблот-анализ с антителами против различных аполипопротеинов, в том числе: А-1, А-II, А-IV, В, С-II, Е, и САА показал распределение апобелков в каждой фракции ЛП (Таблица 2б).

Во фракции с плотностью 1,063 г/мл обнаруживались лишь следовые количества апоА-1, апоА-IV и апоЕ и отсутствовал апоВ. Остальные три фракции: ЛПВП2, ЛПВП3 и ЛПОВП содержали в основном апоА-I (28 кДа) и апоЕ (34кДа), и в меньшем количестве ап°С (6-8 кДа). Обнаруженные различия в содержании белка и распределении аполипопротеинов свидетельствуют о специфичности разделения фракций ЛПВП СМЖ на ЛПВП2, ЛПВП3 и ЛПОВП. В отличие от ЛП фракций, избавленная от липопротеинов СМЖ содержала только свой специфический белок: а1-антихимотрипсин.

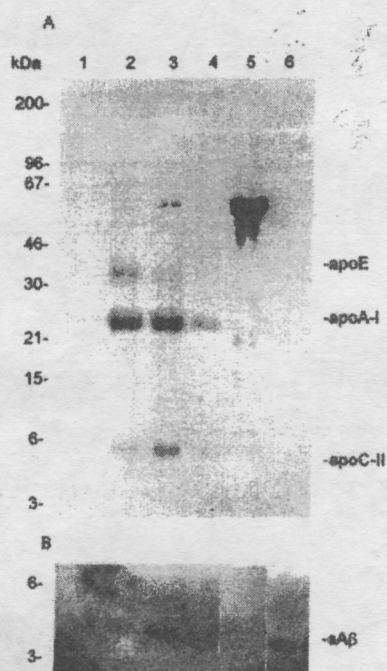


Рис. 3. Электрофорез в полиакриламидном геле (а) и иммуноблот-анализ с антителами против Аβ (б) различных фракций липопротеинов СМЖ.
1 — ЛПОНП +ЛПНП; 2 — ЛПВП2; 3 — ЛПВП3; 4 — ЛПОВП; 5 — избавленная от ЛП СМЖ; 6 — 10 нг синтетического пептида Аβ1-40. В кДа указаны маркеры мол. масс.

Таблица 2

Белково-липидный состав ЛПВП СМЖ

Белок	Фосфолипиды	Холестерин	Триглицериды
Концентрация мкг/мл в цельной СМЖ			
3,93±0,3	3,58±0,24	1,92±0,48*	0,847±0,065
Весовой процент			
38,2	34,8	18,8	8,2

Процент свободного холестерина составил 31,35%.

Следует отметить, что хотя липопротеины спинномозговой жидкости изучены недостаточно, наши результаты согласуются с немногими имеющимися в литературе данными [26, 27, 28, 29]. Так, Borghini и др. методом аффинной хроматографии показали существование трех различных подклассов ЛПВП СМЖ, отличающихся друг от друга по содержанию апоА-1, апоЕ, апоJ, апоА-IV и апоD [26]. Roheim и др. обнаружили, что нормальная СМЖ не содержит апоВ и что апоА-I и апоЕ являются основными аполипопротеинами СМЖ [29].

С целью выявления рА в ЛП СМЖ, фракции липопротеинов, выделенные из 6 мл цельной СМЖ, анализировали иммуноблотом с моноклональными антителами против Аβ (6E10), выявившем наличие рА преимущественно в ЛПВПЗ и ЛПОВП (Рис.3б, линии 3 и 4, соответственно). СМЖ, избавленная от липопротеинов (70 мкг по белку, представляющую 200 мкл цельной СМЖ) не содержала Аβ, что было доказано иммуноблот-анализом (Рис.3б, линия 5) и иммунопреципитацией 5 мг СМЖ, избавленной от липопротеинов (соответствующую 14-15 мл начальной СМЖ).

Присутствие рАβ в ЛПВПЗ было подтверждено анализом N-концевой аминокислотной последовательности белка, по электрофоретической подвижности соответствующего синтетическому пептиду A1-40, использованного как контроль (Рис.3б, линия 6). Полученная последовательность DAEFRXDXG совпадала с N-концевой аминокислотной последовательностью Аβ.

Для подтверждения ассоциации рАβ липопротеинами СМЖ, фракции ЛПВПЗ и ЛПОВП подвергались высокоэффективной жидкостной хроматографии в нативных условиях на гелифльтрационной колонке (Рис. 4). Полученные хроматографические фракции анализировали иммунохимически с антителами против различных апобелков: А-I, А-II, А-IV, Е, САА; все эти аполиппротеины были выявлены во фракции с молекулярной массой 200 кДа. Эта же фракция обнаружила иммунореактивность с антителами против Аβ. Таким образом, рАβ в нормальной СМЖ связан с высокомолекулярными липопротекновыми комплексами с молекулярной массой 200 кДа.

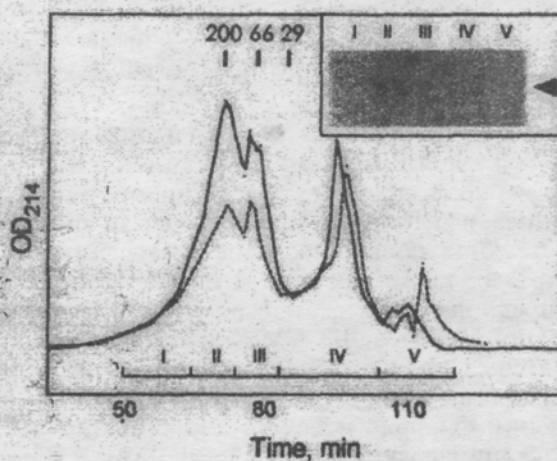


Рис. 4. Профиль гелифльтрации высокоэффективной жидкостной хроматографии липопротеинов СМЖ.

Сплошная линия — ЛПВПЗ; пунктирная линия — ЛПОВП; наверху указано положение стандартов мол. масс.

Вставка — иммуноблоттинг ЛПВПЗ с анти-Аβ антителами; стрелкой показано положение мономерной формы рАβ.

Ассоциация рАβ с ЛПВПЗ и ЛПОВП была подтверждена и на ультраструктурном уровне непосредственной визуализацией эпитопов Аβ на поверхности липопротеиновых частиц. Методом ЭМ было показано, что большинство Аβ-ассоциированных липопротеиновых частиц были сферическими с диаметром $16,8 \pm 3,2$ нм ($n=100$). Иммуноэлектронная микроскопия с использованием поликлональных антител SGY3160 против Аβ и последующей реакцией с протеином А, конъюгированного с микрочастицами золота, выявила ассоциацию рАβ с ЛПВП (Рис.5А). В качестве контроля использовали нормальную кроличью сыворотку (Рис.5В). Специфичность иммунной реакции была подтверждена также преабсорбцией антител с избытком синтетического пептида Аβ1-40 вследствие чего микрочастицы золота на поверхности липопротеиновых частиц не обнаруживалась (Рис.5С).

Таким образом, наши результаты показывают, что в плазме крови и спинномозговой жидкости здоровых доноров рАβ связан с липопротеинами, главным образом с ЛПВПЗ и ЛПОВП.

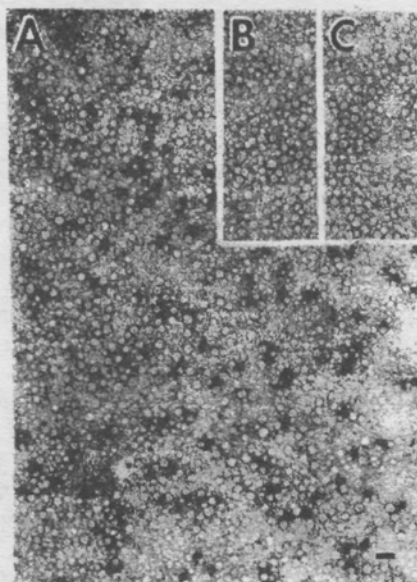


Рис. 5. Иммуноэлектронная микроскопия ЛПВПЗ СМЖ.

а — ЛПВПЗ, инкубированные с анти-А β антителами с последующей реакцией с Протеин А-золотом (10 нм); в — нормальная кроличья сыворотка; с — преабсорбция антител с избытком синтетического пептида А β 1-40.

Важно отметить, что в литературе высказывается предположение о возможности транспорта липопротеиновых частиц или аполипипропротеинов из плазмы в СМЖ [40]. Если это предположение верно, то наличие рА β в липопротеинах СМЖ можно объяснить его транспортом из плазмы. Недавно проведенные *in vivo* эксперименты на морских свинках свидетельствуют в пользу последнего [31]. Так, было обнаружено, что синтетический пептид А β 1-40, также как и апоJ может проникать через гемато-энцефалический барьер, что предполагает существование такой системы их транспорта [40].

Анализ белково-липидного состава ЛП СМЖ выявил интересные закономерности: ЛПВП содержали всего лишь 1% общего белка СМЖ и все ее липиды: фосфолипиды, холестерин и триглицериды (Таблица 3). Эти данные предполагают важность липидного окружения в обеспечении физиологической конформации А β . Однако в экспериментах по иммунопреципитации фракций ЛПВПЗ и ЛПОВП плазмы с анти-А β SGY2134 антителами вместе с амилоидом β копреципитировал целый ряд апобелков (Рис.6, линия 6). Два основных из них были представлены аполипипропротеинами А-I (мол. масса 28 кДа) и J (мол. масса 38-40 кДа), согласно анализу N-концевой аминокислотной последовательности соответствующих белковых полос. Это может отражать взаимодействие рА β и с АпоА-I, и с АпоJ в составе ЛПВП и таким образом объяснить факт иммунопреципитации рА β из цельной СМЖ антителами против АпоJ [7]. Однако общий патерн неденатурирующей иммунопреципитации (Рис. 6, линия 6) позволяет предположить, что ко-преципитация апоА-I, апоJ и других минорных не идентифицированных апобелков с анти-А β антителами может отражать специфическое осаждение определенного пула ЛПВП частиц, содержащих и АпоА-I, и АпоJ, и рА β .

Ассоциация ЛПВП плазмы и СМЖ с рА β не только поднимает вопрос о важности липидов в обеспечении нативных конформационных свойств последнего, но и ставит вопрос о его участии в метаболизме липидов. Подтверждением этому — наше недавнее исследование [20], выявившее ингибирующий эффект синтетических А β пептидов на этерификацию холестерина плазмы крови здоровых доноров, катализируемую еще одним компонентом ЛПВП, ферментом лецитин холестерин ацил трансферазой.

Следует отметить, что всем апобелкам присуще свойство амфипатичности, следствием чего является взаимодействие гидрофобных участков их молекул с липидами, в частности с неполярными хвостами фосфолипидов и свободным холестерином, а также с гидрофобными участками других апобелков. В работе Soreghan и др. было предположено, что А β , как и апобелки, является амфипатической молекулой [32]. Этот вывод

может служить структурной основой взаимодействия А β с липопротеинами. Одним из свойств всех амфипатичных молекул является их высокая тенденция к полимеризации, что составляет основу фибриллогенеза. Интересно заметить, что лишенные липидного окружения апобелки легко агрегируют и полимеризуются [33, 34, 35, 36, 37]. Это ставит вопрос о важности липидного окружения в поддержании и апобелков, и рА β в физиологической растворенной, а не агрегированной форме.

Существование определенной взаимосвязи между липопротеинами и амилоидогенезом известно давно. Так, в ранее опубликованных работах было продемонстрировано, что сывороточный амилоид А находится в составе ЛПВП как аполипопротеин [38]. Продукт его деградации амилоид А (АА), являющийся основным белком амилоидных фибрилл при вторичных амилоидозах [33], также был обнаружен в ЛПВП [34]. Другие аполипопротеины, в частности апоА-I, апоЕ и апо А-II, также могут образовывать амилоидоподобные фибриллы [39, 35, 36, 39]. Наличие рА β в ЛПВП плазмы крови и спинномозговой жидкости здоровых доноров, продемонстрированное в настоящем исследовании, может отражать существование общих механизмов амилоидогенеза апобелков, АА и А β , и открывает перспективу для исследования ЛПВП как носителей амилоидогенных молекул.

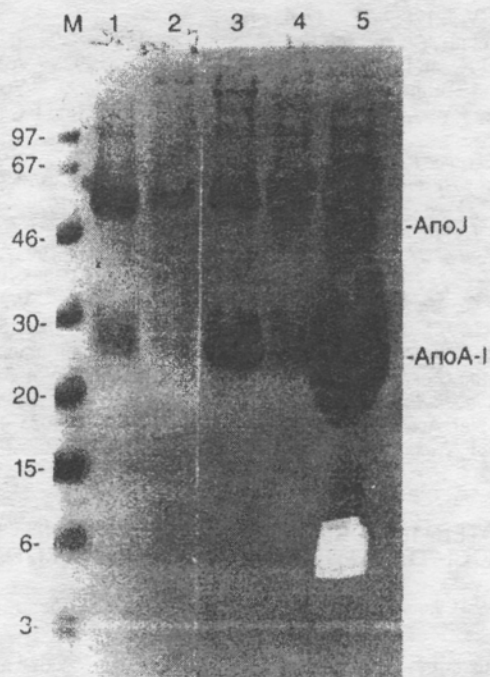


Рис. 6. Копреципитация апоJ и апоА-I из ЛПВП3 + ЛПОВП с антителами против А β . 1 — ЛПОНП; 2 — ЛПНП; 3 — ЛПВП2; 4 — избавленная от ЛП плазма; 5 — ЛПВП3 + ЛПОВП. М — маркеры мол. масс, кДа.

Обнаружение рА β в составе липопротеинов высокой плотности плазмы крови и СМЖ доказывает, что в биологических средах организма рА β циркулирует в составе липопротеиновых частиц. Эти липидно-белковые комплексы, по всей видимости, и представляют для рА β окружение, необходимое для поддержания его в растворимой физиологической конформации.

Настоящее исследование частично финансировалось грантами Национального Института Здоровья, США AG10953 Бласу Франкионе и AG08051 Стивену Ферцем. Работа была выполнена при содействии Джоржа Гисо и Ашока Кумара, сотрудников кафедры патологии Медицинского Центра Нью-Йоркского Университета.

Мы выражаем им глубокую признательность.

ЛИТЕРАТУРА

1. Katzman R // N. Engl. J. Med. — 1986 — Vol. 314 — P. 964-973

- 2 Гаврилова С.И. // Журнал невропатологии и психиатрии. — 1973. — N 9. — С. 1339-1345.
- 3 Selkoe D. // J. Neuropathology and Experimental Neurology. — 1994. — Vol. 53. — P. 438-447.
- 4 Haass C., Schlossmacher M., Hung A. et al. // Nature. — 1992. — Vol. 359. — P. 322-325.
- 5 Seubert P., Vigo-Pelfrey C., Esch F. et al. // Nature. — 1992. — Vol. 359. — P. 325-327.
- 6 Shoji M., Golde T., Ghiso J. et al. // Science. — 1992. — Vol. 258. — P. 126-129.
- 7 Hilbich C., Kisters-Woike B., Reed J. et al. // J. Mol. Biol. — 1991. — Vol. 218. — P. 149-163.
- 8 Levy E., Carman M., Fernandez-Madrid I. et al. // Science. — 1990. — Vol. 248. — P. 1124-1126.
- 9 Snyder 8., Lador U., Wade W. et al. // Biophys. J. — 1994. — Vol. 67. — P. 1216-1228.
- 10 Tomiyama T., Asano S., Furiya Y., Mori H. // J. Biol. Chem. — 1994. — Vol. 269. — P. 10205-10208.
- 11 Wisniewski T., Castano E., Ghiso J., Frangione B. // Ann. Neurol. — 1993. — Vol. 34. — P. 631-633.
- 12 Ghiso J., Matsubara E., Koudinov A. et al. // Biochem. J. — 1993. — Vol. 293. — P. 27-30.
- 13 Ma J., Yee A., Brewer H. et al. // Nature. — 1994. — Vol. 372. — P. 92-94.
- 14 Matsubara E., Frangione B., Ghiso J. // J. Biol. Chem. — 1995. — Vol. 270. — P. 7563-7567.
- 15 Schwarzman A., Gregori L., Vitek M. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1994. — Vol. 91. — P. 8368-8372.
- 16 Strittmatter W., Saunders A., Schmechel D. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1993. — Vol. 90. — P. 1977-1981.
- 17 Talafous J., Marcinowski K., Klopman G. and Zagorski M. // Biochemistry. — 1993. — Vol. 33. — P. 7788-7796.
- 18 Wisniewski T., Frangione B. // Neurosci. Lett. — 1992. — Vol. 135. — P. 235-238.
- 19 Schumaker V. and Puppione D. // Methods in Enzymology: Preparation of Plasma Lipoproteins. — Academic Press Inc., New York, 1986. — Vol. 128. — P. 155-17020.
- 20 Koudinov A., Koudinova N., and Berezov. T. // Biochem. Mol. Biol. Internat. — 1996. — in press.
- 21 Warnick G. R. (1986). // Methods in Enzymology: Measurement of Phospholipids. — Academic Press Inc., New York, 1986. — Vol. 129. — P. 120-123.
- 22 Forte T. and Nordhausen R. // Methods in Enzymology: Electron Microscopy of Plasma Lipoproteins. — Academic Press Inc., New York, 1986. — Vol. 128. — P. 442-4574.
- 23 Kim K., Wen G., Bancher C. et al. // Neurosci. Res. Commun. — 1988. — Vol. 2. — P. 121-130.
- 24 Ghiso J., Wisniewski T., Vidal R., and Frangione B. // Biochem. J. — 1992. — Vol. 282. — P. 517-522.
- 25 Choi N., Tobe T., Hara K., and Tomita M. // J. Immunol. Methods. — 1990. — Vol. 131. — P. 159-163.
- 26 Borghini I., Pometta D., James RW. // Schweizer Archiv fur Neurologie und Psychiatrie. — 1993. — Vol. 144. — P. 207-209.
- 27 Pitas R., Boyles J., Lee S., Weisgraber K. // J. Biol. Chem. — 1987. — Vol. 262. — P. 14352-14360.
- 28 Rebeck G., Chung H., Mendez A., Hyman B. // Soc. Neurosci. Abstr. — 1995. — Vol. 21. — P. 1008.
- 29 Roheim P.S., Carey M., Forte T., Vega G.L. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1979. — Vol. 76. — P. 4646-4649.
- 30 Zlokovic B., Martel C., Mackic J. et al. // Biochem. Biophys. Res. Commun. — 1994. — Vol. 205. — P. 1431-1437.
- 31 Zlokovic B., Ghiso J., Mackic J. et al. // Biochem. Biophys. Res. Commun. — 1993. — Vol. 197. — P. 1034-1040.
- 32 Soreghan B., Kosmoski J., Glabe C. // J. Biol. Chem. — 1994. — Vol. 269. — P. 28551-28554.
- 33 Husebekk A., Skogen B., Husby G., Marhaug G. // Scand. J. Immunol. — 1984. — Vol. 21. — P. 283-287.
- 34 Husebekk A., Skogen B., Husby G. // Scan. J. Immunol. — 1987. — Vol. 25. — P. 375-381.
- 35 Nichols W., Dwulet F., Liepnieks J., Benson M. // Biochem. Biophys. Res. Commun. — 1988. — Vol. 156. — P. 762-768.
- 36 Sparrow J., Sparrow D., Fernando G., Gatto A.M. // Biochemistry. — 1992. — Vol. 31. — P. 1065-1068.
- 37 Wisniewski T., Lalowski M., Golabek A., Frangione B. // Lancet. — 1995. — Vol. 345. — P. 956-957.
- 38 Benditt E., Eriksen N. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 1977. — Vol. 74. — P. 4025-4028.
- 39 Naiki H., Higuchi K., Shimada A., Nakakuki K. // Lab. Invest. — 1994. — Vol. 68. — P. 332-337.

THE AMYLOID BETA PROTEIN IN NORMAL HUMAN PLASMA AND CEREBROSPINAL FLUID IS ASSOCIATED WITH HIGH DENSITY LIPOPROTEINS.

N. V. Koudinova^{1,2}, A. R. Koudinov³ and T. T. Berezov¹.

Department of Biochemistry, Russian Peoples, Friendship University, Moscow¹ and Department of Medicine² and Pathology³, NYU Medical Center, USA.

Cerebrovascular and parenchymal amyloid deposits found in brains of Alzheimer's disease, Down's syndrome and normal aging are mainly composed of aggregated amyloid beta protein (A β), a unique peptide 39 to 44 amino acids long. A similar but soluble A β (sA β) has been identified in plasma, cerebrospinal fluid (CSF) and cell supernatants, indicating that it is a normal protein. We report here that sA β in normal human plasma and CSF is complexed to high density lipoprotein (HDL) 3 and very high density lipoprotein (VHDL). Biotinylated synthetic peptide A β 1-40 was traced in normal human plasma in *in vitro* experiments. Both tracer biotin-labeled A β 1-40 and native sA β were specifically recovered in HDL3 and VHDL as it was assessed in immunoprecipitation experiments of purified plasmalipoproteins and lipoprotein depleted plasma. This fact prompted us to ascertain whether the interaction of sA β with HDL does occur in normal human CSF *in vivo*. For this purpose normals human CSF was fractionated by means of sequential flotation ultracentrifugation. The presence of sA β in the resulting lipoprotein fractions as well as in the lipoprotein depleted CSF was analysed by immunoblot analysis, electron and immune-electron microscopy and native size exclusion chromatography. Immunoblot analysis with 6E10 monoclonal anti-A β antibodies revealed sA β association with all HDL subtypes of CSF, primarily HDL3 and VHDL and immunoelectron microscopy confirmed an association of sA β with CSF-HDL particles of 16,8 + 3,2 nm. Native size exclusion chromatography followed by immunoblot analysis with antibodies against A β and different apolipoproteins indicated an association of sA β with HDL complexes of ~200 kDa molecular weight. Soluble A β association with HDL3 and VHDL may be involved in maintaining the solubility of A β in biological fluids and points to a possible role of lipoproteins and lipoprotein lipid in the biology of aminoloidogenic peptides.