УДК 577.174.5
©Коллектив авторов

ВЛИЯНИЕ НЕЙРОПРОТЕКТОРА ИЗАТИНА НА СВЯЗЫВАНИЕ МОДЕЛЬНЫХ БЕЛКОВ С БЕТА-АМИЛОИДНЫМ ПЕПТИДОМ: БИОСЕНСОРНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

О.А. Бунеева[1], О.В. Гнеденко[1], М.В. Медведева[2], А.С. Иванов[1], А.Е. Медведев[1]*

[1]Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н.Ореховича, 119121, Москва, Погодинская ул. 10; эл. почта: professor57@yandex.ru;
[2]МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва

Бета-амилоидный пептид (1-42), образующийся в результате протеолитического процессинга трансмембранного белка-предшественника амилоида, рассматривается в качестве "ключевого игрока" в развитии болезни Альцгеймера (AD) и других патологических состояний, обусловленных образованием и накоплением белковых агрегатов в центральной нервной системе. В ходе протеомного профилирования препаратов мозга интактных крыс и мышей, проведенного ранее с использованием в качестве аффинного сорбента аффигеля-10 с иммобилизованным бета-амилоидным пептидом, было идентифицировано более 80 индивидуальных белков, специфически связывающихся с этим лигандом. Многие из них были обнаружены ранее как белки, связывающиеся с эндогенным нейропротектором изатином. Целью данного исследования была прямая экспериментальная проверка взаимодействия высокоочищенных интактных и окисленных препаратов пероксиредоксина, пируваткиназы мышечного типа и альфа-енолазы с иммобилизованным бета-амилоидным пептидом и влияние изатина на этот процесс. По данным биосенсорного анализа с использованием оптических SPR-биосенсоров Biacore 3000 и Biacore X100 все исследованные белки образовывали молекулярные комплексы с иммобилизованным бета-амилоидным пептидом. Значения K_d этих комплексов варьировали от $8{,}36\times10^{-8}$ М (у пероксиредоксина) до $1{,}97\times10^{-6}$ М (у альфа-енолазы). Окислительная модификация исследованных белков оказывала разнонаправленное влияние на прочность комплексов с бета-амилоидным пептидом, а эндогенный нейропротектор изатин повышал диссоциацию комплексов бета-амилоидного пептида с рядом интактных (пероксиредоксин, ГАФД) и/или подвергнутых окислительной модификации (пероксиредоксин, пируваткиназа) модельных белков.

Ключевые слова: бета-амилоидный пептид, белки, связывающиеся с бета-амилоидным пептидом, изатин, лиганд-рецепторные и белок-белковые взаимодействия, поверхностный плазмонный резонанс, оптический биосенсор

DOI 10.18097/PBMC20166206720

ВВЕДЕНИЕ

Бета-амилоидный пептид (1-42), образующийся в результате протеолитического процессинга трансмембранного белка-предшественника амилоида, рассматривается в качестве "ключевого игрока" в развитии болезни Альцгеймера (AD) и других патологических состояний, обусловленных образованием и накоплением белковых агрегатов в центральной нервной системе ([1, 2] и мн. др.). Большинство исследований в этой области сфокусировано на роли бета-амилоидного пептида в формировании внеклеточных амилоидных бляшек и белковых агрегатов, а также механизмах их токсичности (напр. [3-6]). Однако становится всё более очевидным, что бета-амилоидный пептид может накапливаться внутри нейронов и взаимодействовать с внутриклеточными белками-мишенями [1, 7, 8], причём внутриклеточные события, по-видимому, предшествуют образованию внеклеточных олигомеров/агрегатов бета-амилоидного пептида [7, 8]. Взаимодействие бета-амилоидного пептида с каталазой (ферментом, расщепляющим пероксид водорода с образованием воды и молекулярного кислорода) способствует накоплению внутриклеточного пероксида водорода, провоцирующего развитие оксидативного стресса [9]. В ходе протеомного профилирования препаратов мозга интактных крыс [10] и мышей [11], проведённого ранее с использованием в качестве аффинного сорбента аффигеля-10 с иммобилизованным бета-амилоидным пептидом, было идентифицировано более 80 индивидуальных белков, специфически связывающихся с этим лигандом. Среди них обнаружены белки, подвергающиеся окислительной модификации при AD и различных экспериментальных моделях этого заболевания (см. [11], а также приведенные там таблицу 2 и литературу). К их числу относятся пероксиредоксин, пируваткиназа мышечного типа, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (ГАФД), альфа-енолаза. Не менее четверти белков, связывающихся с бета-амилоидным пептидом, были ранее идентифицированы как белки, связывающиеся с эндогенным нейропротектором изатином [10, 12, 13]. Имитация окислительного стресса при инкубации гомогената мозга с пероксидом водорода существенно влияла на профиль белков, специфически связывающихся с бета-амилоидным пептидом [10].

Взаимодействия иммобилизованного лиганда (бета-амилоидного пептида) с потенциальными белками-мишенями, присутствующими в сложной биологической системе, могут отражать не только прямые взаимодействия предполагаемых белков-партнёров, но и включать более сложные, опосредованные типы взаимодействий [14]. В связи

* - адресат для переписки

с этим целью данного исследования была прямая экспериментальная проверка взаимодействия высокоочищенных интактных и окисленных препаратов пероксиредоксина, пируваткиназы мышечного типа и альфа-енолазы с иммобилизованным бета-амилоидным пептидом и влияние эндогенного нейропротектора изатина на этот процесс. Корректность такого подхода, предусматривающего использование оптического биосенсора, работающего на эффекте поверхностного плазмонного резонанса, была продемонстрирована в ряде наших предыдущих исследований, в том числе и с использованием другого модельного белка – глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (ГАФД) [10, 12-14].

МЕТОДИКА

В работе использовали электрофоретически гомогенные ГАФД и пируваткиназу (уд. акт. 140 мкмоль/мин на 1 мг белка и 260 мкмоль/мин на 1 мг белка), выделенные из скелетных мышц кролика [15], рекомбинантную альфа-енолазу (электрофоретическая чистота >90%) и пероксиредоксин (электрофоретическая чистота >90%), бета-амилоидный пептид (1-42) человека (“Sigma-Aldrich”, США).

HBS-буфер (150 мМ NaCl, 3 мМ ЭДТА, 0,005% детергента P20, 10 мМ HEPES (pH 7,4)); 10 мМ ацетатный буфер (pH 4,0); набор реагентов для ковалентной иммобилизации белков за первичные аминогруппы (1-этил-3-(3-диметиламинопропил)-карбодиимид-HCl (EDC), N-гидроксисукцинимид (NHS), 1 М этаноламин-HCl (pH 8,5)) были получены от “GE Healthcare” (США).

Для окислительной модификации исследуемые белки инкубировали в 50 мМ калий фосфатном буфере (pH 7,4) с добавлением 70 мкМ H_2O_2 в течение 30 мин при комнатной температуре [16].

Взаимодействие исследуемых белков с иммобилизованным бета-амилоидным пептидом исследовали, используя оптические SPR-биосенсоры Biacore 3000 и Biacore X100 и специальное программное обеспечение Biacore Control (“GE Healthcare”). Все измерения были выполнены при 25°C с использованием стандартных оптических чипов CM5 (“GE Healthcare”), покрытых слоем карбоксиметилированного декстрана. Молекулярные взаимодействия регистрировали в виде сенсограмм, представляющих зависимость сигнала биосенсора (в резонансных единицах, RU) от времени.

Иммобилизацию бета-амилоидного пептида выполняли в соответствии с разработанным протоколом [17] (рис. 1). Взаимодействие белков с иммобилизованным бета-амилоидным пептидом исследовали при скорости потока 10 мкл/мин в течение 5 мин. Перед повторным использованием поверхность чипа регенерировали промывкой 1 М NaCl в 50 мМ фосфатном буфере (pH 7,4) в течение 0,5 мин при скорости потока 50 мкл/мин. Для минимизации возможного образования олигомеров/агрегатов [18] иммобилизованного бета-амилоидного пептида оптические чипы использовали в экспериментах в течение 24 ч.

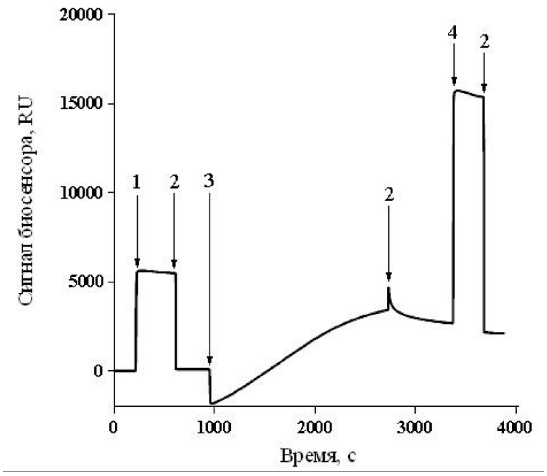

Рисунок 1. Иммобилизация бета-амилоидного пептида на поверхности оптического чипа CM5. Стрелками указаны следующие инжекции: 1 - EDC/NHS; 2 - HBS; 3 - бета-амилоидный пептид 100 мкг/мл в 10 мМ ацетатном буфере, pH 4,0; 4 - 1 М этаноламин-HCl. Время пропускания раствора этаноламина (4) не превышало 5 мин.

Полученные сенсограммы анализировали с помощью программы BIAevaluation Version 4.1 (“GE Healthcare”).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Инжекция растворов белков через канал оптического биосенсора с иммобилизованным бета-амилоидным пептидом приводила к появлению чёткого сигнала прибора, который зависел от концентрации добавленного белка (рис. 2). Это позволило рассчитать значения равновесной константы диссоциации, которые приведены в таблице 1. Они показывают, что интактные белки проявляли неодинаковое сродство к иммобилизованному лиганду, которое убывало в ряду пероксиредоксин = пируваткиназа > ГАФД > енолаза. В присутствии 100 мкМ изатина значение K_d заметно возрастало только в случае ГАФД (с $0{,}227\times10^{-6}$ М без изатина до $3{,}1\times10^{-6}$ М в присутствии изатина) и пероксиредоксина (с $8{,}36\times10^{-8}$ М без изатина до $25{,}7\times10^{-8}$ М в присутствии изатина) (см. табл. 1 и 2). Взаимодействие остальных исследованных белков с иммобилизованным бета-амилоидным пептидом изменялось незначительно (см. табл. 1, 2).

Окислительная модификация приводила к увеличению сродства пероксиредоксина и в меньшей степени пируваткиназы к иммобилизованному бета-амилоидному пептиду (табл. 1), в то время как величины K_d для енолазы и особенно ГАФД для комплексов с бета-амилоидным пептидом увеличивались (табл. 1). В условиях окислительной модификации 100 мкМ изатин более чем на порядок увеличивал значение K_d для комплексов пероксиредоксина и пируваткиназы с иммобилизованным пептидом. В соответствии с данными предыдущего исследования [10], связывание окисленной ГАФД с бета-амилоидным пептидом в присутствии изатина существенно не изменялось.

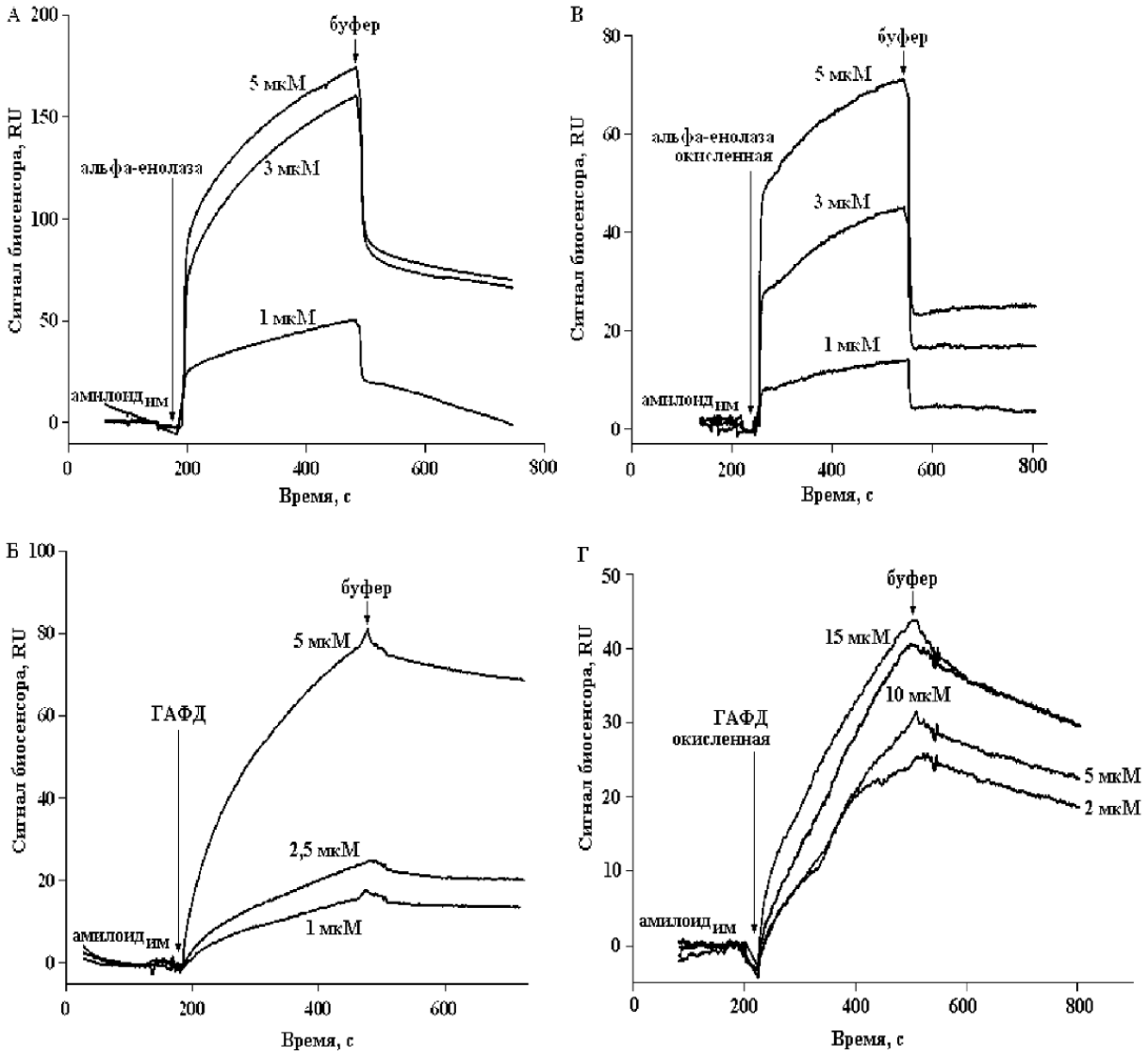

Рисунок 2. Типичные сенсограммы, полученные при инжекции растворов интактных и окисленных белков (ГАФД и альфа-енолазы) через канал оптического биосенсора с иммобилизованным бета-амилоидным пептидом.

Таблица 1. Влияние окисления модельных белков на их взаимодействие с иммобилизованным бета-амилоидным пептидом

Белок	Окисление H_2O_2	k_a, $M^{-1}c^{-1}$	k_d, c^{-1}	Рассчитанное значение K_d, M
Пероксиредоксин	–	$(2,8\pm0,06)\cdot10^{4}$	$(2,34\pm0,04)\cdot10^{-3}$	$8,36\cdot10^{-8}$
Пероксиредоксин	+	$(3,5\pm0,1)\cdot10^{4}$	$(4,6\pm3,7)\cdot10^{-6}$	$1,34\cdot10^{-10}$
Енолаза	–	$(3,3\pm0,2)\cdot10^{3}$	$(6,5\pm0,3)\cdot10^{-3}$	$1,97\cdot10^{-6}$
Енолаза	+	$(3,5\pm0,4)\cdot10^{3}$	$(1,39\pm0,07)\cdot10^{-2}$	$3,97\cdot10^{-6}$
Пируваткиназа	–	$(1,07\pm0,03)\cdot10^{4}$	$(5,97\pm0,1)\cdot10^{-4}$	$5,56\cdot10^{-8}$
Пируваткиназа	+	$(1,66\pm0,01)\cdot10^{4}$	$(1,87\pm0,3)\cdot10^{-4}$	$1,13\cdot10^{-8}$
ГАФД	–	$(2,08\pm0,04)\cdot10^{3}$	$(4,73\pm0,1)\cdot10^{-4}$	$2,27\cdot10^{-7}$
ГАФД	+	$(1,21\pm0,03)\cdot10^{3}$	$(3,37\pm0,08)\cdot10^{-3}$	$2,79\cdot10^{-6}$

Примечание: k_a - константа скорости образования белок-пептидного комплекса, k_d - константа скорости диссоциации комплекса, K_d - равновесная константа диссоциации комплекса. Здесь и в таблице 2 приведены средние значения 2-3 независимых экспериментов.

Таблица 2. Влияние 100 мкМ изатина на взаимодействие интактных и окисленных модельных белков с иммобилизованным бета-амилоидным пептидом

Белок	Окисление H_2O_2	K_d, М
Пероксиредоксин	–	$2{,}57\cdot10^{-7}$↑
Пероксиредоксин	+	$2{,}39\cdot10^{-9}$↑
Енолаза	–	$2{,}1\cdot10^{-6}$=
Пируваткиназа	–	$7{,}31\cdot10^{-8}$=
Пируваткиназа	+	$1{,}16\cdot10^{-7}$↑
ГАФД	–	$3{,}1\cdot10^{-6}$↑
ГАФД	+	$2{,}2\cdot10^{-6}$=

Примечание: Знак ↑ показывает увеличение K_d, а знак равенства (=) - отсутствие изменений в ответ на добавление изатина.

ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее проведённое протеомное профилирование гомогенатов мозга мышей и крыс выявило существование большой группы внутриклеточных белков, связывающихся с бета-амилоидным пептидом, который был использован в качестве аффинного лиганда [10, 11]. Протеомные профили существенно изменялись в условиях моделирования оксидативного стресса *in vitro* и в присутствии эндогенного нейропротектора изатина [10]. Результаты данного исследования, предпринятого с целью проверки прямого взаимодействия идентифицированных при протеомном профилировании белков с бета-амилоидным пептидом, подтверждают потенциальную возможность образования комплексов бета-амилоидного пептида с внутриклеточными мишенями *in vivo*. При этом комплексы бета-амилоидного пептида с различными исследованными белками различаются как по величине K_d, так и по чувствительности к изатину (табл. 1 и 2). С учётом данных о том, что различные модификации бета-амилоидного пептида влияют на профиль амилоид-связывающихся белков [11], влияние изатина на комплексообразование между индивидуальными внутриклеточными белками и мономерным бета-амилоидом будет, очевидно, определяться состоянием белка-мишени и бета-амилоида.

В контексте редокс-состояния исследованных в данной работе белков-мишеней (подвергающихся окислительной модификации при AD и её экспериментальных моделях), остаётся открытым вопрос о существовании единого сценария, определяющего их взаимодействия с бета-амилоидным пептидом. Последнее важно в связи с выдвинутым предположением о двояком эффекте комплексообразования между бета-амилоидным пептидом и его внутриклеточными мишенями [10]. С одной стороны, такое комплексообразование приводит к интактивации важных внутриклеточных белков [9], с другой – защищает бета-амилоидный пептид от возможного расщепления протеолитическими ферментами [10]. Поскольку в литературе есть данные о том, что аналоги и производные изатина ингибируют образование агрегатов бета-амилоидного пептида [19] и фибрилл транстиретина [20], данная гипотеза является вполне реалистичной.

Изатин – эндогенный индол, проявляющий нейропротекторные свойства *in vitro* и *in vivo* [21, 22]. С учётом того, что не менее 25% белков мозга (включая все использованные в данном исследовании), связывающихся в ходе протеомного профилирования с бета-амилоидным пептидом, ранее были идентифицированы в качестве изатин-связывающих белков [10], есть веские основания предполагать существование взаимосвязи между способностью белков связываться с бета-амилоидным пептидом и с изатином. На сегодняшний день такого рода взаимосвязь можно проследить только на примере ГАФД (для остальных белков такого рода исследования пока не проведены). Окисление этого белка приводило к увеличению K_d комплекса этого белка как с иммобилизованным аналогом изатина [16], так и с иммобилизованным бета-амилоидным пептидом (табл. 1 данной работы и [10]).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Таким образом, отобранные по результатам протеомного профилирования гомогенатов мозга [10, 11] модельные белки образуют молекулярные комплексы с иммобилизованным бета-амилоидным пептидом. Значения K_d этих комплексов варьировали в широком диапазоне: от $8{,}36\times10^{-8}$ М (у пероксиредоксина) до $1{,}97\times10^{-6}$ М (у альфа-енолазы). Окислительная модификация исследованных белков оказывала разнонаправленное влияние на прочность комплексов с бета-амилоидным пептидом, а эндогенный нейропротектор изатин повышал диссоциацию комплексов бета-амилоидного пептида с рядом интактных (пероксиредоксин, ГАФД) и/или подвергнутых окислительной модификации (пероксиредоксин, пируваткиназа) модельных белков.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант 15-04-01545а – в части окислительной модификациия ферментов и биосенсорного анализа их взаимодействия с иммобилизованным бета-амилоидным пептидом) и РНФ (грант 16-14-10327 – в части биосенсорного анализа эффекта изатина на белок-белковые взаимодействия).

ЛИТЕРАТУРА

1. *LaFerla F.M., Green K.N., Oddo S.* (2007) Nat. Rev. Neurosci., **8**, 499-509.
2. *Musiek E.S., Holtzman D.M.* (2015) Nat Neurosci., **18**, 800-806.
3. *Masters C.L., Selkoe D.J.* (2012) Cold Spring Harb Perspect Med., **2**(6), a006262.
4. *Kozin S.A., Cheglakov I.B., Ovsepyan A.A., Telegin G.B., Tsvetkov P.O., Lisitsa A.V., Makarov A.A.* (2013) Neurotox. Res., **24**, 370-376.

5. *Mitkevich V.A., Petrushanko I.Y., Yegorov Y.E., Simonenko O.V., Vishnyakova K.S., Kulikova A.A., Tsvetkov P.O., Makarov A.A., Kozin S.A.* (2013) Cell Death Dis., **4**, e939.
6. *Beraldo F.H., Ostapchenko V.G, Caetano F.A., Guimaraes A.L., Ferretti G.D., Daude N., Bertram L., Nogueira K.O., Silva J.L., Westaway D., Cashman N.R., Martins V.R., Prado V.F., Prado M.A.* (2016) J. Biol. Chem., **291**, 21945-21955.
7. *Wirths O., Multhaup G, Czech C., Blanchard V., Moussaoui S., Tremp G., Pradier L., Beyreuther K., Bayer T.A.* (2001) Neurosci. Lett., **306**, 116-120.
8. *Knobloch M., Konietzko U., Krebs D.C., Nitsch R.M.* (2007) Neurobiol. Aging, **28**, 1297-1306.
9. *Habib L., Lee M.T.C., Yang J.* (2010) J. Biol. Chem., **285**, 38933-38943.
10. *Medvedev A.E., Buneeva O.A., Kopylov A.T., Gnedenko O.V., Medvedeva M.V., Kozin S.A., Ivanov A.S., Zgoda V.G., Makarov A.A.* (2015) Int. J. Mol. Sci., **16**, 476-495.
11. *Medvedev A.E., Buneeva O.A., Kopylov A.T., Mitkevich V.A., Kozin S.A., Zgoda V.G., Makarov A.A.* (2016) Biochimie, **128-129**, 55-58.
12. *Buneeva O., Gnedenko O., Zgoda V., Kopylov A., Glover V., Ivanov A., Medvedev A., Archakov A.* (2010) Proteomics, **10**, 23-37.
13. *Бунеева О.А., Копылов А.Т., Тихонова О.В., Згода В.Г., Медведев А.Е., Арчаков А.И.* (2012) Биохимия, **77**, 1584-1599.
14. *Иванов А.С., Медведев А.Е.* (2015) Биомед. химия, **61**, 231-238. DOI: 10.18097/PBMC20156102231
15. *Scopes R.K., Stoter A.* (1982) Methods Enzymol., **90** Pt E, 479-490.
16. *Бунеева О.А., Гнеденко О.В., Медведева М.В., Иванов А.С., Медведев А.Е.* (2016) Биомед. химия, **62**, 160-163. DOI: 10.18097/PBMC20166202160
17. *Medvedev A., Buneeva O., Kopylov A., Gnedenko O., Ivanov A., Zgoda V., Makarov A.A.* (2015) Methods Mol. Biol., **1295**, 465-477.
18. *Stine W.B. Jr., Dahlgren K.N., Krafft G.A., LaDu M.J.* (2003) J. Biol. Chem., **278**, 11612-11622.
19. *Campagna F., Catto M., Purgatorio R., Altomare C.D., Carotti A., De Stradis A., Palazzo G.* (2011) Eur. J. Med. Chem., **46**, 275-284.
20. *Gonzalez A., Quirante J., Nieto J., Almeida M.R., Saraiva M.J., Planas A., Arsequell G., Valencia G.* (2009) Bioorg. Med. Chem. Lett., **19**, 5270-5273.
21. *Medvedev A., Igosheva N., Crumeyrolle-Arias M., Glover V.* (2005) Stress, **8**, 175-183.
22. *Medvedev A., Buneeva O., Glover V.* (2007) Biological Targets and Therapeutics, **1**, 151-162.

Поступила: 11. 07. 2016.
Принята к печати: 01. 09. 2016.

THE EFFECT OF NEUROPROTECTOR ISATIN ON BINDING OF SOME MODEL PROTEINS WITH BETA-AMYLOID PEPTIDE: A BIOSENSOR STUDY

O.A. Buneeva[1], O.V. Gnedenko[2], M.V. Medvedeva[1], A.S. Ivanov[1], A.E. Medvedev[1]

[1]Institute of Biomedical Chemistry,
10 Pogodinskaya str., Moscow, 119121 Russia; e-mail: professor57@yandex.ru
[2]Moscow State University, Moscow, Russia

The amyloid-beta peptide 1-42 formed during proteolytic processing of the amyloid precursor protein (APP) plays a key role in the development or progression of Alzheimer's disease (AD) and other pathologies associated with formation of protein aggregates in the central nervous system. Recent proteomic profiling of mouse and rat brain preparations by means of beta-amyloid peptide immobilized on Affigel-10 revealed a large group of amyloid-binding proteins (n>80). Many (about 25%) of these proteins were previously identified as isatin-binding proteins. The aim of this study was to validate direct interaction between beta-amyloid peptide and highly purified intact and oxidized peroxiredoxin, M-type pyruvate kinase, alpha-enolase, and the effect of isatin on this interaction. The study performed using SPR-based Biacore 3000 and Biacore X100 biosensors has shown that all the proteins form molecular complexes with immobilized beta-amyloid peptide. The K_d values for these complexes varied from 8.36×10^{-8} M (peroxiredoxin) to 1.97×10^{-6} M (alpha-enolase). Oxidative modification of investigated proteins caused opposite effects on complexes of these peptides with beta-amyloid. The endogenous neuroprotector isatin increased dissociation of complexes formed by beta-amyloid peptide with both intact proteins (peroxiredoxin, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) and/or oxidized proteins (peroxiredoxin, pyruvate kinase) used in this study.

Key words: beta-amyloid peptide, amyloid-beta binding proteins, isatin, ligand-receptor and protein-protein interactions, surface plasmon resonance, optical biosensor