

УДК 577.3

ОБ АКТИВАЦИИ СИСТЕМЫ КОМПЛЕМЕНТА АМИЛОИДНЫМИ АГРЕГАТАМИ ПЕПТИДОВ А β (1-40) И А β (1-42): ФАКТЫ И ПРЕДПОЛОЖЕНИЯ

© 2020 г. Э.И. Якупова*, Л.Г. Бобылёва*, И.М. Вихлянцев*, **, А.Г. Бобылёв*. **

*Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН,
142290, Пущино Московской области, ул. Институтская, 3

**Пущинский государственный естественно-научный институт,
142290, Пущино Московской области, просп. Науки, 3

E-mail: yakupova.mira@mail.ru

Поступила в редакцию 20.11.2019 г.

После доработки 20.11.2019 г.

Принята к публикации 29.11.2019 г.

В статье поднят вопрос о способности активации системы комплемента амилоидными агрегатами, в частности амилоидными фибриллами пептидов А β (1-40) и А β (1-42), обнаруживаемых при болезни Альцгеймера в головном мозге. В 1992 г. на основании данных о колокализации амилоидных включений и белков системы комплемента в мозгу пациентов с болезнью Альцгеймера было высказано предположение о прямой активации этой системы амилоидами. Впоследствии был опубликован еще ряд работ в пользу такого предположения. В ходе наших исследований эти данные не подтверждаются. Так активируют ли амилоиды систему комплемента, а если нет, то что же ее активирует? На эти вопросы авторы пытаются ответить в данной статье.

Ключевые слова: система комплемента, амилоиды, амилоидозы, болезнь Альцгеймера.

DOI: 10.31857/S0006302920010032

С описания в XVII веке увеличенной селезенки женщины началась история изучения амилоидозов — заболеваний, связанных с отложением в тканях органов амилоидных включений [1]. В дальнейшем были описаны амилоидозы таких органов, как печень, почки и ряда других, что послужило началом исследования природы данных заболеваний [1,2].

К настоящему времени известно, что амилоиды представляют собой агрегаты/фибриллы пептида или белка, который претерпел частичное или полное разворачивание своей аминокислотной цепи и впоследствии дальнейшее сворачивания сформировал неправильную конформацию. В конечном счете пептидные цепи формируют сложную кросс- β -структуру, наделяющую амилоиды такими свойствами, как нерастворимость и устойчивость к протеолизу [3]. Из-за этого происходит накопление/отложение амилоидов и связанные с этим серьезные изменения в метаболизме тканей и органов [4], что, как считается, приводит к развитию амилоидозов.

Более тридцати различных амилоидогенных белков на сегодняшний день причисляют к тем или иным заболеваниям у людей [1–3]. Наибольшую известность среди амилоидозов приобрела

болезнь Альцгеймера, которую связывают с накоплением в головном мозге амилоидных отложений пептидов А β (1-40) и А β (1-42) [1–3]. Известно, что для этого заболевания также характерно интенсивное нейровоспаление, в котором задействована и система комплемента [5].

Система комплемента является частью врожденной иммунной системы и состоит из большого количества различных белков плазмы, которые реагируют друг с другом, чтобы опсонизировать патогены, и вызывают ряд воспалительных реакций, которые помогают бороться с инфекцией [4]. Существуют три пути активации комплемента: 1) классический путь, который запускается антителом или напрямую связыванием компонента комплемента C1q с поверхностью патогена; 2) лектиновый (маннозный) путь, который инициируется маннансвязывающим лектином, нормальным компонентом сыворотки, связывающимся с некоторыми инкапсулированными бактериями; 3) альтернативный путь, запускающийся непосредственно на поверхности патогена [4]. Заключительный итог любого из трех путей активации комплемента — это образование мембранного атакующего комплекса C5b-9, макромолекулы, состоящей из C5-, C6-, C7-, C8- и

множественных C9-фрагментов системы [4]. Комплекс C5b-9 связывается с клеточной мембраной, формируя трансмембранный канал, провоцируя свободную диффузию ионов и малых молекул в клетку и из нее, нарушая клеточный гомеостаз, что в конечном итоге приводит к лизису клетки, если на клетке собирается достаточное количество мембранного атакующего комплекса [4]. Примечательно, что мембранный атакующий комплекс также может вызывать лизис соседних здоровых клеток организма [6].

В 1992 г. были проведены иммуногистохимические исследования, которые показали, что белок C1q колокализуется с амилоидными отложениями A β -пептидов в мозге пациентов с болезнью Альцгеймера [7]. Было сделано предположение, что A β -амилоиды активируют систему комплемента. Последующие исследования, проведенные *in vitro*, подтвердили возможность прямой активации системы комплемента амилоидными фибриллами по классическому пути при отсутствии антител [7–14]. Прямая анти тело-независимая активация системы комплемента фибриллами A β -пептидов была продемонстрирована и для альтернативного пути [15–17]. Кроме того, было показано, что активация комплемента фибриллами A β -пептидов *in vitro* приводит к образованию C5a — мощного цитокин-подобного продукта расщепления C5, а также к сборке провоспалительного мембранного атакующего комплекса C5b-9 [12, 15]. Показано, что многие белки, входящие в состав системы комплемента, включая C1q, C4, C3, C5, C6, C7, C8, C9, фрагменты активации C3, C4 и C5b-9, также колокализуются с отложениями A β и нейрофибрилярными клубками в головном мозге пациентов с болезнью Альцгеймера [10, 12, 18–20]. Исходя из этих данных, считается, что при данном заболевании активация системы комплемента усиливает нейровоспалительный процесс вследствие непосредственного связывания системы комплемента с амилоидными фибриллами. Разрабатываются даже новые терапевтические подходы для уменьшения повреждения при нейровоспалении от воздействия системы комплемента при развитии болезни Альцгеймера [21].

Учитывая все вышесказанное и проводя собственные исследования амилоидной агрегации мышечного белка титина [22], мы заинтересовались вопросом о возможной анти тело-независимой активации системы комплемента амилоидами этого белка. В ходе наших экспериментов не было обнаружено активации системы комплемента аморфными амилоидными агрегатами титина [23], что, по-видимому, исключает его роль в развитии воспаления при мышечных амилоидозах. В этих экспериментах в качестве положительного контроля мы пытались использовать амилоидные фибриллы пептидов A β (1-40) и A β (1-42),

которые должны были активировать систему комплемента. Однако они также не активировали систему комплемента. Полученные результаты легли в основу дискуссии о способности активации системы комплемента амилоидными агрегатами, в частности амилоидными фибриллами пептидов A β (1-40) и A β (1-42), обнаруживаемых в головном мозге при болезни Альцгеймера.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В ходе настоящей работы использовали стандартную методику формирования амилоидных фибрилл пептидов A β : синтетические пептиды A β (1-40) и A β (1-42) (Sigma, США) были растворены в 100%-м диметилсульфоксиде до концентрации 10 мг/мл, после чего разводились бидистиллированной H₂O до концентрации 1 мг/мл, а затем до 0.3 мг/мл буферным раствором, содержащим 0.1 М трис-HCl, pH 7.4. В таком разведении образцы двое суток инкубировали при температуре 37°C. Далее амилоидные фибриллы с различной концентрацией инкубировали в течение ночи в 96-луночных планшетах при температуре 4°C. Выявление факта формирования амилоидных фибрилл происходило при помощи поликлональных LOC-антител (Millipore, США), специфически связывающихся с амилоидными фибриллами и фибриллярными олигомерами белков. Процедура проведения твердофазного иммуноферментного анализа для исследования связывания амилоидных фибрилл с белками системы комплемента представлена на рис. 1. Для этого использовали следующие материалы: бычий сывороточный альбумин, белки системы комплемента C1q (Sigma, США) и C3b (Millipore, США), сыворотка крови человека (Millipore, США); первичные поликлональные антитела кролика против C1q (Thermo Scientific, США) (1 : 1000) и моноклональные антитела мыши против C3 (ab11871; Abcam, Великобритания) (1 : 1000); вторичные антитела козла, конъюгированные с щелочной фосфатазой против антител кролика или мыши (ab6722/ab6790 (1:3000); Abcam, Великобритания), раствор NBT/BCIP (Roche, Швейцария).

РЕЗУЛЬТАТЫ

В ходе нашего эксперимента были сформированы амилоидные фибриллы пептидов A β (1-40) и A β (1-42), что подтверждается их связыванием с амилоидо-специфическими антителами LOC (рис. 2а). Исследования по связыванию фибрилл A β -пептидов с белками системы комплемента (см. схему на рис. 1) как при использовании отдельных белков C1q (рис. 2б) и C3b (рис. 2в), так и сыворотки крови, содержащей эти белки

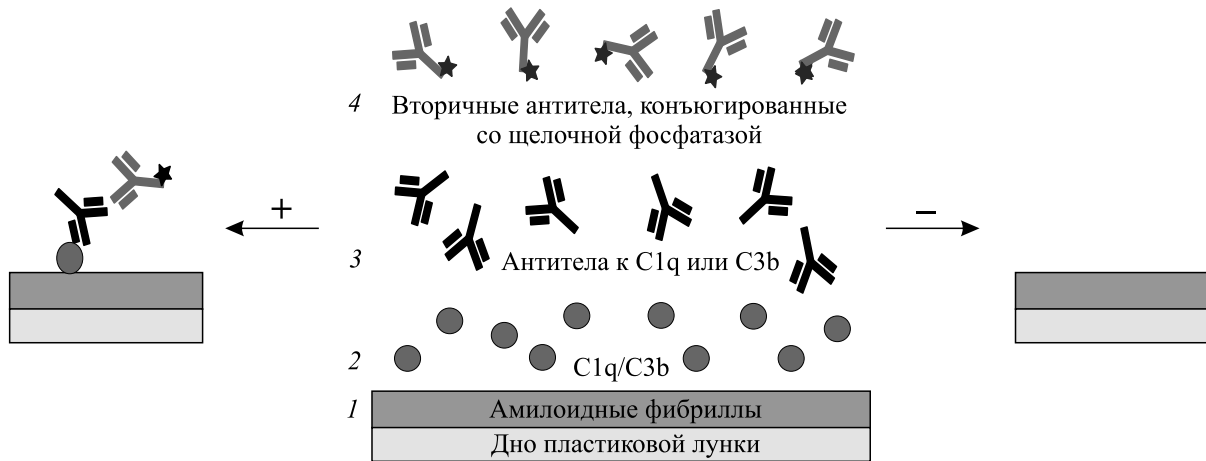


Рис. 1. Схема твердофазного иммуноферментного анализа для исследования связывания системы комплемента с амилоидными фибриллами. Этапы: 1 – фиксация амилоидных фибрилл на пластиковых стенках 96-луночных планшетов (инкубация в лунках в течение ночи при 4°C); 2 – после блокировки свободных участков планшетов сухим молоком, разведенным в фосфатном буферном растворе, в течение часа при 37°C в лунки добавляли либо отдельные белки системы комплемента C1q или C3b в фосфатном буферном растворе, либо содержащую их сыворотку крови человека, на 2 ч при 37°C; 3 – после трехкратной промывки фосфатным буферным раствором на 1 ч при 37°C добавляли первичные антитела против белков C1q или C3b; 4 – после трехкратной промывки фосфатным буферным раствором на 1 ч при 37°C добавляли вторичные антитела против первичных антител. Для визуализации связывания (стрелка влево) или демонстрации отсутствия связывания (стрелка вправо) исследуемых амилоидных фибрилл с белками системы комплемента добавляли раствор NBT/BCIP и проводили спектрофотометрическое исследование. В качестве отрицательного контроля вместо амилоидных фибрилл использовали бычий сывороточный альбумин.

(рис. 2г,д), не выявили положительной реакции. Таким образом, в наших экспериментах не выявлена способность амилоидных фибрилл пептидов A β (1-40) и A β (1-42) активировать систему комплемента.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты наших экспериментов поднимают вопрос о противоречивости данных, полученных в разных лабораториях, при исследовании активации системы комплемента амилоидными агрегатами. Мы не подвергаем сомнению то, что белки системы комплемента действительно колокализуются с амилоидными отложениями/бляшками. Однако стоит помнить, что в состав амилоидных включений в тканях органов помимо A β -пептидов входят и другие компоненты, например гликозаминогликаны, аполипопротеин E, амилоидный компонент сыворотки P [3]. Но связь с активацией системы комплемента была выявлена только в случае A β -пептидов. Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что амилоидные агрегаты титина и пептидов A β (1-40) и A β (1-42) не участвуют в активации системы комплемента. Тогда что же может ее активировать? Возможно, что непосредственно микроорганизмы. В подтверждение этому имеются следующие данные. В мозге больных болезнью Альцгеймера

было обнаружено увеличение популяций бактерий в сравнении с мозгом здоровых людей [24]. Авторы высказали предположение о возможном вкладе таких микроорганизмов, как *Firmicutes*, *Actinobacteria* и в особенности *P. acnes*, в развитие нейровоспаления в мозге больных [24]. Учитывая предположение об антимикробных свойствах амилоидных агрегатов [25], колокализация амилоидов и системы комплемента, выполняющих одну и ту же роль, не кажется неожиданной. Таким образом, вполне вероятно, что не фибриллы A β -пептидов или другие компоненты амилоидных включений, а в большей мере микроорганизмы участвуют в активации системы комплемента при развитии нейровоспаления у больных болезнью Альцгеймера.

В контексте обсуждаемых результатов также необходимо упомянуть следующие данные. В проведенных недавно исследованиях с помощью криоэлектронной микроскопии было продемонстрировано, что выделенные и очищенные амилоидные фибриллы A β -пептидов из ткани мозга пациентов с болезнью Альцгеймера полиморфны и структурно отличаются от фибрилл, которые формируются *in vitro* [5]. В частности, полученные из мозга амилоидные фибриллы A β -пептидов являются, как отмечают авторы работы, правозакрученными, а их *in vitro* аналоги – левоза-

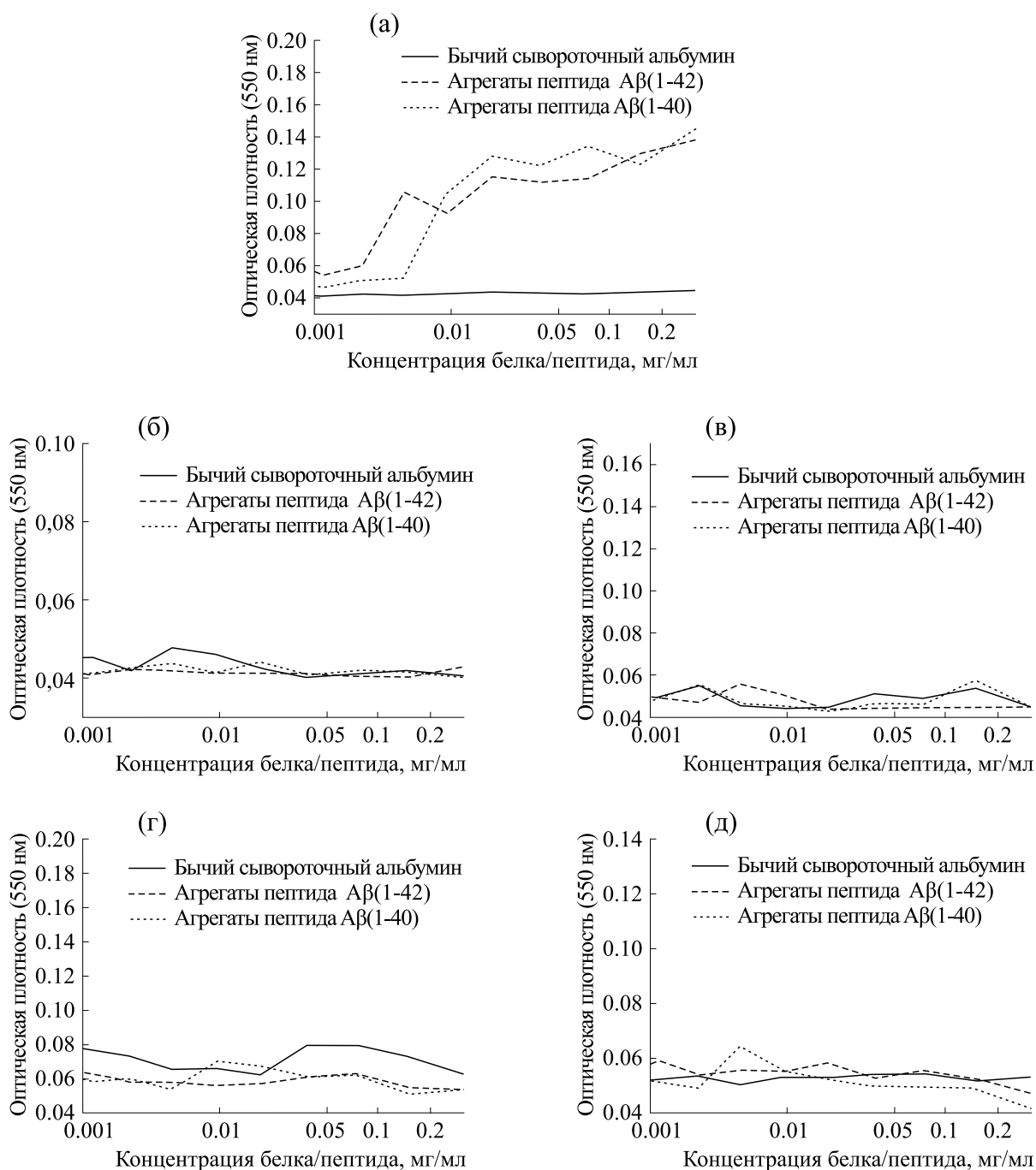


Рис. 2. Результаты экспериментов с использованием твердофазного иммуноферментного анализа: (а) – твердофазный иммуноферментный анализ с использованием LOC-антител, детектирующих наличие амилоидных фибрилл в образцах; (б) – исследование связывания амилоидных фибрилл Аβ-пептидов с изолированным компонентом С1q; (в) – исследование связывания амилоидных фибрилл Аβ-пептидов с изолированным компонентом С3b; (г) – исследование активации системы комплемента по классическому пути с использованием сыворотки крови человека; (д) – исследование активации системы комплемента по альтернативному пути с использованием сыворотки крови человека.

крученными [5]. Эти результаты поднимают актуальный вопрос о целесообразности экстра-

поляции результатов исследований амилоидов, полученных *in vitro*, на *in vivo* системы.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант №18-315-00012).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания каких-либо исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. A. A. Nizhnikov, K. S. Antonets, and S. G. Inge-Vechtomov, *Biochemistry (Moscow)* **80** (9), 1127 (2015).
2. R. Kyle, *Br. J. Haematol.* **114**, 529–538 (2001).
3. P. Westermark, M. D. Benson, J. N. Buxbaum, et al., *Amyloid* **14** (3), 179–183 (2007).
4. C. A. Janeway, Jr., P. Travers, M. Walport, et al., *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*, 5th ed. (Garland Science, N.-Y., 2001).
5. M. Kollmer, W. Close, L. Funk, et al., *Nature Commun.* **10**, 4760 (2019).
6. M. Cedzyński, N. M. Thielens, T. E. Mollnes, et al., *Front. Immunol.* **10**, 1869 (2019).
7. J. Rogers, N. R. Cooper, S. Webster, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 10016 (1992).
8. S. Chen, R. C. Frederickson, and K. R. Brunden, *Neurobiol. Aging* **17**, 781 (1996).
9. H. Jiang, D. Burdick, C. G. Glabe, et al., *J. Immunol.* **152**, 5050 (1994).
10. A. Afagh, *Exp. Neurol.* **138**, 22 (1996).
11. S. Webster, B. Bradt, J. Rogers, et al., *J. Neurochem.* **69**, 388 (1997).
12. S. Webster, L. F. Lue, and L. Brachova, *Neurobiol. Aging* **18**, 415 (1997).
13. R. Veerhuis, M. J. Van Breemen, and J. M. Hoozemans, *Acta Neuropathol.* **105** (2), 135 (2003).
14. P. Tacnet-Delorme, S. Chevallier, and G. J. Arlaud, *J. Immunol.* **167** (11), 6374 (2001).
15. B. M. Bradt, W. P. Kolb, and N. R. Cooper, *J. Exp. Med.* **188**, 431 (1998).
16. R. Strohmeyer, Y. Shen, and J. Rogers, *Brain Res. Mol. Brain Res.* **81** (1–2), 7 (2000).
17. M. D. Watson, A. E. Roher, K. S. Kim, et al., *Amyloid* **4**, 147 (1997).
18. P. Eikelenboom and F. C. Stam, *Acta Neuropathol.* **57**, 239 (1982).
19. P. L. McGeer, H. Akiyama, S. Itagaki, et al., *Neurosci. Lett.* **107**, 341 (1989).
20. Y. Shen, R. Li, E. G. McGeer, et al., *Brain Res.* **769**, 391 (1997).
21. C. Landlinger, L. Oberleitner, P. Gruber, et al., *J. Neuroinflammation* **12**, 150 (2015).
22. E. I. Yakupova, I. M. Vikhlyantsev, L. G. Bobyleva, et al., *J. Biomol. Structure and Dynamics* **36** (9), 2237 (2018).
23. E. I. Yakupova, A. G. Bobylev, L. G. Bobyleva, and I. M. Vikhlyantsev, *J. Immunoassay Immunochem.* (2019). DOI:10.1080/15321819.2019.1694943
24. D. C. Emery, D. K. Shoemark, T. E. Batstone, et al., *Front. Aging Neurosci.* **9**, 195 (2017).
25. D. K. Kumar, S. H. Choi, K. J. Washicosky, et al., *Sci. Transl. Med.* **8** (340), 340ra72 (2016).

On Complement System Activation by Amyloid Aggregates of A β (1-40) and A β (1-42) Peptides: Facts and Assumptions

E.I. Yakupova*, L.G. Bobyleva*, I.M. Vikhlyantsev*, **, and A.G. Bobylev*, **

**Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences, ul. Institutskaya 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

***Pushchino State Institute of Natural Sciences, prosp. Nauki 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

In this paper, the question has arisen of whether the complement system can be activated by amyloid aggregates, in particular, by the amyloid fibrils of A β (1-40) and A β (1-42) peptides found in the brains of patients with Alzheimer's disease. In 1992, based on data on colocalization of amyloid inclusions with proteins of the complement system in the brains of patients with this disease, it was suggested that this system was directly activated by amyloids. Then, this assumption had been supported by a number of subsequent studies. In our research, there is no confirmation of it. Indeed, do amyloids activate the complement system, and if no, what activates it? We try to answer these questions in this paper.

Keywords: complement system, amyloids, amyloidoses, Alzheimer's disease