



УДК 577.112.083.3

## ПРОТЕКТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ ФРАГМЕНТОВ ПРИОННОГО БЕЛКА ПРИ ИММУНИЗАЦИИ ЖИВОТНЫХ С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО ИНДУЦИРОВАННОЙ ФОРМОЙ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА

© 2015 г. О. М. Вольпина\*, Т. Д. Волкова\*<sup>#</sup>, Н. И. Медвинская\*\*,  
А. В. Камынина\*, Я. В. Запорожская\*, И. Ю. Александрова\*\*, Д. О. Короев\*,  
А. Н. Самохин\*\*, И. В. Нестерова\*\*, В. И. Дейгин\*, Н. В. Бобкова\*\*

\*ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН  
117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

\*\* ФГБУН Институт биофизики клетки РАН, 142290, Пущино, ул. Институтская, д. 3

Поступила в редакцию 05.08.2014 г. Принята к печати 13.08.2014 г.

Прионный белок является одной из мембранных мишеней бета-амилоида, основного нейротоксического агента при болезни Альцгеймера. Нами был осуществлен выбор и синтез фрагментов прионного белка 17–33, 23–33, 95–110 и 101–115, ответственных за связывание с бета-амилоидом. Было изучено влияние иммунизации пептидами на развитие признаков болезни у животных с экспериментально индуцированной формой болезни Альцгеймера. Показано, что иммунизация свободным пептидом 17–33 и белковыми конъюгатами пептидов 23–33 и 101–115 приводит к восстановлению состояния пространственной памяти животных. Также показано, что иммунизация пептидом 17–33 приводит к снижению уровня мозгового бета-амилоида и восстановлению морфофункциональных показателей мозга.

*Ключевые слова:* болезнь Альцгеймера, прионный белок, бета-амилоид, синтетические пептиды.

DOI: 10.7868/S0132342315020165

### ВВЕДЕНИЕ

Прионный белок (PrP<sup>c</sup>) – мембранный гликопротеин, наиболее высокая концентрация которого выявлена на поверхности нейронов, хотя его могут синтезировать и многие другие клетки организма. Резкое изменение конформации прионного белка, приводящее к формированию бета-складчатой структуры и отложениям депозитов нерастворимой формы белка (PrP<sup>Sc</sup>), служит причиной группы заболеваний различной этиологии, называемых прионными болезнями [1]. Также известно о его связи с болезнью Альцгеймера, причем различные исследования свидетельствуют как о патогенной, так и о протективной роли PrP<sup>c</sup> в развитии болезни. Было показано, что при патологии агрегаты прионного белка часто соседствуют с бляшками бета-амилоида – 40–42-членного пептида, растворимые олигомеры и нераствори-

мые агрегаты которого считают основным нейротоксическим агентом болезни Альцгеймера [2–4]. С другой стороны, установлена способность PrP<sup>c</sup> ингибировать гамма-секретазу BACE1, расщепляющую белок-предшественник бета-амилоида APP, и тем самым препятствовать продукции бета-амилоидных пептидов [5]. Предполагают, что протективная способность присуща только одному генетически определенному варианту белка, а полиморфизм нуклеотидной последовательности ДНК, приводящий к замене аминокислотного остатка Met на остаток Val в 129 положении белка PrP<sup>c</sup>, является фактором риска в развитии болезни Альцгеймера [6, 7]. Причина патогенной роли PrP<sup>c</sup> до недавнего времени оставалась невыясненной. Установлено, что нормальный прионный белок является одной из мембранных мишеней бета-амилоида [8]. В опытах *in vitro* показано высокоаффинное связывание синтетических растворимых олигомеров бета-амилоида с участком 95–110 мембранного PrP<sup>c</sup>. Введение моноклональных антител, направленных к этому участку PrP<sup>c</sup>, приводит к восстановлению когнитивных показателей у трансгенных мышей с признаками болезни Альцгеймера, по-видимому, в результате предотвраще-

Сокращения: БЭ – бульбэктомированные; ЛО – ложнооперированные; НАФ – неполный адьювант Фрейнда; ПАФ – полный адьювант Фрейнда; Fmoc – 9-флуоренилметоксикарбонил; KLH – гемоцианин улитки; OVA – овальбумин; PBS – фосфатно-солевой буфер.

<sup>#</sup> Автор для связи (тел.: +7 (495) 336-57-77; эл. почта: tdvol@mx.ibch.ru).

Таблица 1. Синтетические фрагменты прионного белка PrP<sup>c</sup>

Пептид	Фрагмент	Аминокислотная последовательность
(I)	17–33	SDLGLCKKRPKPGGWNT*
(II)	23–33	KKRPKPGGWNT
(III)	95–110	TNSQWNKPSKPKTNMK
(IV)	101–115	KPSKPKTNMKHMAGA

\* Подчеркнут потенциальный Т-хелперный эпитоп.

ния связывания агрегированной формы бета-амилоида с прионом [9, 10]. Ранее нами был показан протективный эффект как от активной иммунизации мышей с экспериментально индуцированной формой болезни Альцгеймера пептидом 95–123, так и от пассивного введения специфичных к нему антител [11]. Протективные свойства противопептидных антител подтверждены также *in vitro* в модели болезни Альцгеймера на культурах клеток [12].

Необходимо подчеркнуть, что этот же участок отвечает за превращение нормального белка PrP<sup>c</sup> в его патогенную изоформу PrP<sup>Sc</sup> [13–15]. В то же время, установлено, что участок 95–123 прионного белка не является единственным сайтом связывания с бета-амилоидом. В опытах *in vitro* с использованием рекомбинантного приона с делециями различных участков и перекрывающихся синтетических фрагментов было показано, что в связывании с олигомерами бета-амилоида участвует также N-концевой фрагмент 23–27 или 23–39 [16, 17].

Целью настоящей работы явилось изучение терапевтического эффекта иммунизации животных с экспериментально индуцированной формой болезни Альцгеймера синтетическими пептидами, соответствующими фрагментам N-концевой части прионного белка, при этом оценивали состояние пространственной памяти, биохимические показатели и морфофункциональное состояние мозга. Также для локализации участка, ответственного за протективную активность известного пептида 95–123, были изучены свойства его двух укороченных перекрывающихся фрагментов.

Таблица 2. Характеристики синтетических пептидов

Пептид	Время удерживания*, мин	M теор.	M <sup>+</sup> H
(I)	15.42	1857	1857
(II)	10.75	1268.5	1269
(III)	9.95	1913	1913
(IV)	9.47	1626	1627.6

\* Для аналитической ВЭЖХ этих пептидов (эксперим. часть).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Фрагменты PrP<sup>c</sup>, выбранные в настоящей работе для синтеза и изучения, перечислены в табл. 1. Пептиды 17–33 (I) и 23–33 (II) соответствуют фрагментам N-концевой неструктурированной части белка PrP<sup>c</sup> [18]. Они включают участок 23–27 и частично перекрывают участок 23–39, описанные в разных работах как сайт связывания с бета-амилоидом [16, 17]. Известно, что в результате посттрансляционных модификаций от молекулы предшественника прионного белка отщепляется фрагмент из первых 22-х а.о., поэтому нами был выбран для синтеза фрагмент, начинающийся с 23 а.о. 23–33 (II), и более протяженный пептид 17–33 (I). В пептиде (I) в положении 19 находится гидрофобный остаток Leu, а в положении 27 положительно заряженный остаток Lys, которые формируют потенциальный Т-хелперный эпитоп, необходимый для индукции антител при иммунизации свободным пептидом [19]. Для локализации участка, ответственного за протективную активность описанного ранее пептида 95–123 [11], были получены два перекрывающихся фрагмента этого пептида: 95–110 (III) и 101–115 (IV).

Пептиды были синтезированы твердофазным методом с использованием Fmoc-производных аминокислот. Степень гомогенности синтетических пептидов была подтверждена данными аминокислотного анализа, масс-спектрометрии, ВЭЖХ и составляла более 95% (табл. 2).

Влияние иммунизации синтетическими пептидами на состояние пространственной памяти изучали на мышах линии NMRI, которым удаляли обонятельные луковицы (бульбэктомированные мыши), в результате чего у мышей развивались поведенческие, биохимические и морфологические изменения альцгеймеровского типа. Данная модель, согласно литературным данным, является валидной моделью sporadicческой формы болезни Альцгеймера [20–22]. Для индукции антител мышей дважды иммунизировали пептидом (I) или конъюгатами пептидов (II), (III) и (IV) с гемодианином улитки (KLH). Пептид (I) использовали в свободном виде, так как он содержит теоретически рассчитанный Т-хелперный эпитоп, необходимый для индукции антител, а пептиды (II), (III) и (IV), не содержащие потенци-

альных Т-эпитопов, для придания им иммуногенности конъюгировали с высокомолекулярным носителем. Первую иммунизацию проводили до операции бульбэктомии, а вторую — после нее. Через 10 дней после второй иммунизации у мышей отбирали кровь для определения титров противопептидных антител, а затем проводили обучение животных в водном лабиринте Морриса и тестировали состояние их пространственной памяти. Все пептиды были способны стимулировать образование антител (табл. 3). Титры противопептидных антител измеряли индивидуально у каждого животного, в таблице для каждого иммуногена приведен диапазон значений титров. Наиболее высокие титры наблюдали в сыворотках мышей, иммунизированных пептидами (I) и (II), причем, пептид (I) был высокоиммуногенен в свободном виде, а пептид (II) стимулировал образование антител в виде конъюгата с KLH. У животных, иммунизированных KLH-конъюгатами пептидов (III) и (IV), титры противопептидных антител были существенно ниже, наиболее низкий уровень антител индуцировал конъюгат пептида (III).

Пространственную память оценивали по достоверному превышению времени нахождения и числа заходов мышей в сектор обучения над остальными индифферентными секторами водного лабиринта Морриса. В качестве контроля использовали неиммунизированных ложнопериорированных (ЛО) и бульбэктомированных (БЭ) животных. Все контрольные БЭ мыши характеризовались потерей пространственной памяти (ни одно животное не выделяло сектор обучения), в то же время все контрольные ЛО мыши демонстрировали высокий уровень пространственной памяти и достоверно выделяли отсек обучения (рис. 1, 2).

БЭ животные, иммунизированные пептидом (I) или конъюгатами пептидов (II) и (IV), были способны выделять сектор обучения путем более длительного нахождения в нем (рис. 1а, 2а). Эти же животные не выделяли контрольный сектор по числу заходов в него (рис. 1б, 2б). Данный факт свидетельствует о том, что предпочтительной моделью поведения обученных мышей является целевой заход в сектор обучения. Таким образом, получены достоверные результаты, демонстрирующие сохранение пространственной памяти у БЭ мышей в результате иммунизации пептидами (I), (II) и (IV). Иммунизация конъюгатом пептида (III) не индуцировала защитного эффекта. БЭ мыши, иммунизированные пептидом (III), не были способны выделять отсек обучения ни по времени нахождения в нем, ни по числу заходов в данный сектор. Возможно, отсутствие активности у пептида (III) обусловлено его низкой иммуногенностью, защитный эффект пептидов (I), (II) и (IV) согласуется с высокими титрами противо-

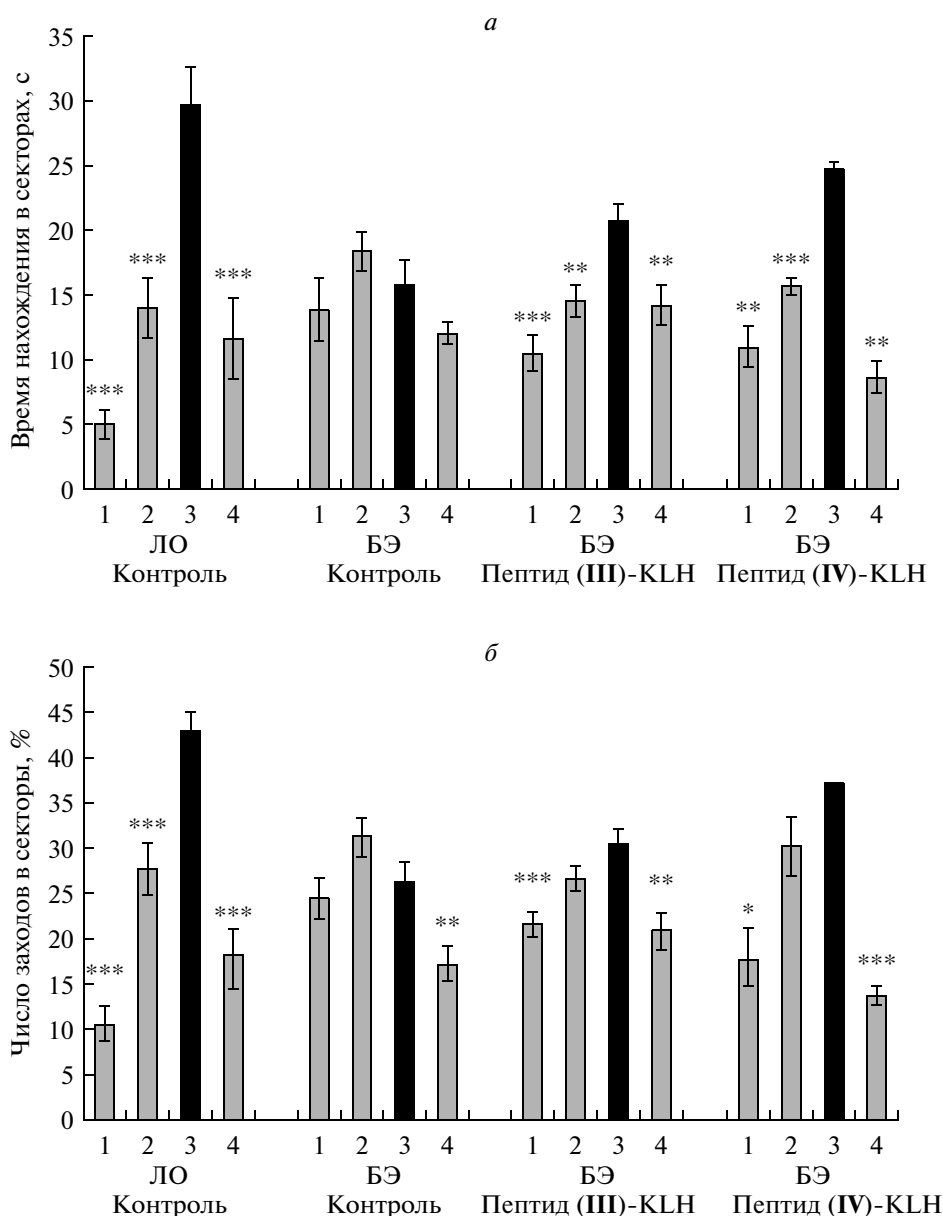
**Таблица 3.** Титры антител к пептидам (I–IV) в сыворотках мышей

Иммуноген	Титр антител (–lg)
(I)	3.1–3.7
(II)-KLH	3.1–3.7
(III)-KLH	1.9–2.8
(IV)-KLH	2.2–3.8
ЛО-контроль	<1.0
БЭ-контроль	<1.0

пептидных антител к данным иммуногенам в сыворотках животных (табл. 3).

Наибольший интерес для создания средств терапии представляет собой фрагмент (I), способный индуцировать протективный эффект в свободном виде. Иммунизация свободными пептидами имеет ряд преимуществ перед иммунизацией белковыми конъюгатами. В частности, известно, что при конъюгации пептидов с белковыми носителями образуется смесь различных продуктов, не поддающихся химической характеристике. Поэтому дальнейшие исследования были направлены на изучение эффекта иммунизации пептидом 17–33 (I), для сравнения использовали KLH-конъюгат более короткого фрагмента 23–33 (II).

Морфофункциональный анализ состояния нейронов в мозге животных показал (табл. 4), что иммунизация пептидом (I) значительно уменьшает, а в некоторых случаях и предотвращает развитие дегенеративного процесса, характерного для мозга контрольных БЭ мышей. Так, в большинстве нейронов височной коры и гиппокампа (поля CA1 и CA3) БЭ мышей развиваются патологические изменения, такие как пикноз, цитоллиз, кариолизис и вакуолизация, что происходит на фоне снижения числа нормально функционирующих нейронов. Иммунизация БЭ мышей пептидом (I) тормозила развитие дегенеративного процесса, что проявилось в достоверном снижении числа нейронов с разными видами патологических реакций. Число нормальных нейронов в трех исследуемых областях мозга у иммунных БЭ мышей приближалось к числу нормальных нейронов в мозге контрольных ЛО животных. Иммунизация БЭ мышей KLH-конъюгатом пептида (II) не оказывала столь значительного нейрорепротивного эффекта, а в нейронах височной коры и гиппокампа CA1 приводила даже к усилению кариолизиса. Число нормальных нейронов в мозге БЭ мышей, иммунизированных KLH-конъюгатом пептида (II), практически не отличалось от числа нормальных нейронов в мозге неиммунных БЭ животных и только в поле гиппокампа CA3 этот показатель немного превышал контрольные значения.

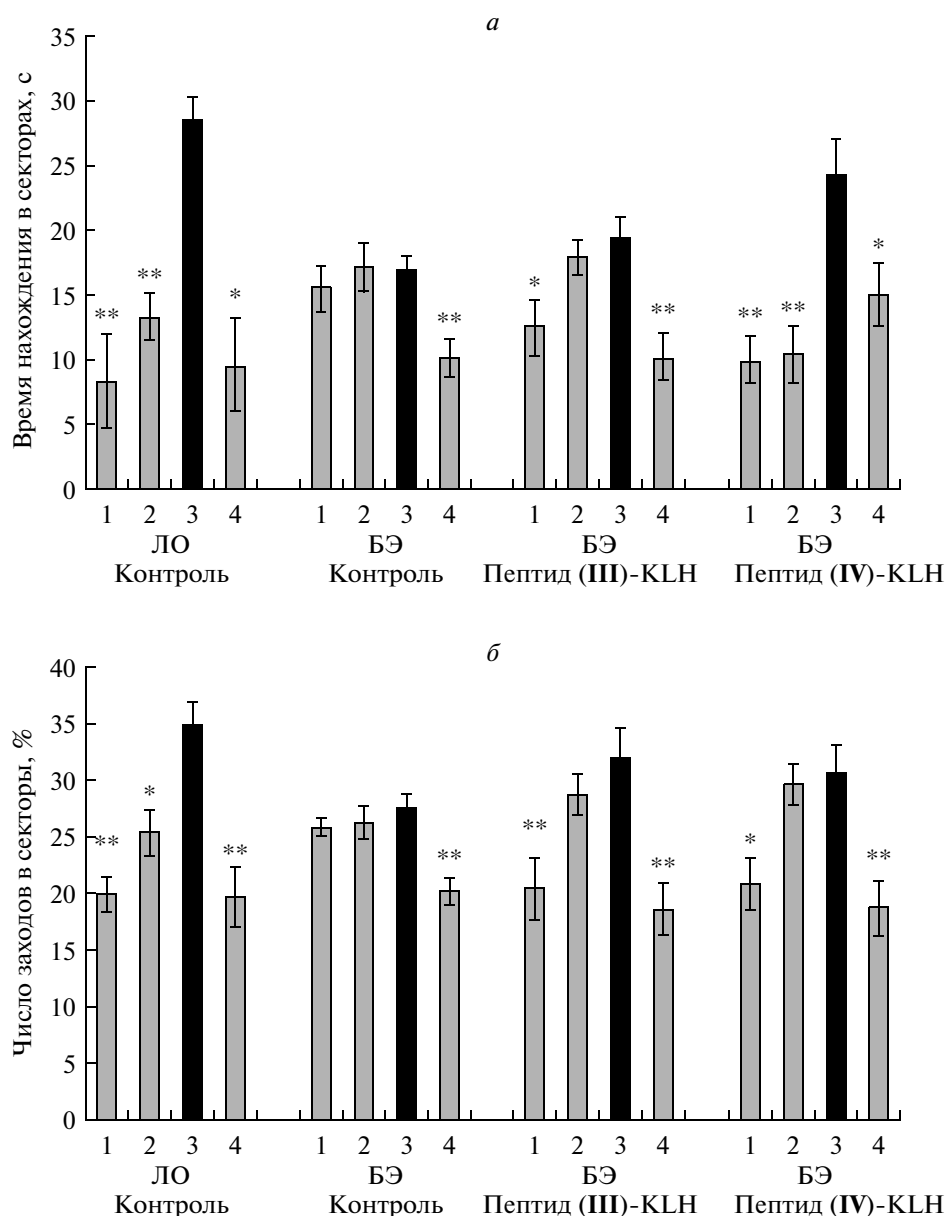


**Рис. 1.** Влияние иммунизации пептидами (I) и (II)-KLH на пространственную память бульбэктомированных мышей. 1–4 – секторы лабиринта Морриса, 3 – сектор обучения. \*  $p < 0.01$ ; \*\*  $p < 0.001$ ; \*\*\*  $p < 0.0001$ .

Одним из признаков развития болезни Альцгеймера является повышение содержания бета-амилоида в мозге больных, поэтому было изучено влияние иммунизации пептидами (I) и (II) на уровень бета-амилоида в мозге экспериментальных животных. Содержание бета-амилоида измеряли индивидуально в образцах мозга каждого животного, а затем подсчитывали среднее значение (табл. 5, рис. 3). В контрольной группе БЭ мышей уровень бета-амилоида в среднем составлял  $14.40 \pm 1.15$  нг на 1 г ткани мозга, в то время как в группе ЛО мышей –  $4.30 \pm 0.75$  нг/г (рис. 3). В группах БЭ мышей, иммунизированных как пептидом (I), так и KLH-конъюгатом пептида

(II), уровень бета-амилоида существенно снизился приблизительно до одного уровня:  $7.98 \pm 0.30$  нг/г для пептида (I) и  $7.29 \pm 0.35$  нг/г для KLH-конъюгата пептида (II).

Таким образом, было показано, что иммунизация синтетическими пептидами, соответствующими фрагментам N-концевой части прионного белка, оказывает защитное действие на животных с экспериментально индуцированной формой болезни Альцгеймера по всем основным признакам заболевания: изменению состояния пространственной памяти, состоянию нейронов мозга и содержанию бета-амилоида в тканях моз-



**Рис. 2.** Влияние иммунизации пептидами (III)-KLH и (IV)-KLH на пространственную память бульбектомированных мышей. 1–4 – секторы лабиринта Морриса, 3 – сектор обучения. \*  $p < 0.01$ ; \*\*  $p < 0.001$ ; \*\*\*  $p < 0.0001$ .

га. Эти результаты дополняют информацию, полученную ранее в опытах *in vitro*, о том, что *N*-концевой участок белка вовлечен в связывание с бета-амилоидом.

Необходимо отметить, что пептид 23–33 (II) применяли для иммунизации в виде конъюгата с белком KLH, а пептид 17–33 (I) в свободном виде, при этом они показали сопоставимые результаты в поведенческом тесте по сохранению пространственной памяти БЭ мышей, одинаково снижали уровень бета-амилоида в мозге, а морфофункциональный анализ состояния нейронов выявил более значительное предотвращение де-

генеративного процесса в мозге животных, иммунизированных фрагментом (I) по сравнению с его конъюгированным аналогом (II). Изучение иммунопротективных свойств укороченных перекрывающихся фрагментов описанного нами ранее протективного пептида 95–123 показало важную роль участка 101–115 (IV) в формировании иммунного ответа, приводящего к сохранению пространственной памяти животных. Фрагмент 95–110 (III), содержащий эпитоп для протективных моноклональных антител к PrP<sup>c</sup> [10], и описанный как участок, задействованный в связывании с бета-амилоидом [8], при использовании активной иммунизации проявил значительно

**Таблица 4.** Морфофункциональное состояние нейронов в коре мозга ЛО и БЭ мышей

Структура мозга	Группы животных	Повреждения нейронов, %				Число нормальных нейронов
		пикноз	кариолизис	цитоллиз	вакуолизация	
Височная кора	ЛО контроль	9.9 ± 0.7*	3.1 ± 0.2*	5.9 ± 0.5*	2.7 ± 0.4*	78.5 ± 0.8*
	БЭ контроль	13.5 ± 0.4	7.4 ± 0.2	23.8 ± 0.5	3.7 ± 0.3	51.5 ± 0.7
	БЭ пептид (I)	4.5 ± 0.5*	7.7 ± 0.4	15.5 ± 0.3*	1.7 ± 0.2*	70.8 ± 0.9*
	БЭ пептид (II)-KLH	7.8 ± 0.6*	11.3 ± 0.4*	20.6 ± 0.6*	4.1 ± 0.5*	56.3 ± 1.5
Гиппокамп СА1	ЛО контроль	6.3 ± 0.7*	2.9 ± 0.3*	5.9 ± 0.5*	2.2 ± 0.3*	82.6 ± 1.1*
	БЭ контроль	10.4 ± 0.4	6.6 ± 0.3	21.6 ± 0.4	3.2 ± 0.2	58.2 ± 0.7
	БЭ пептид (I)	2.1 ± 0.2*	5.9 ± 0.3	13.8 ± 0.4*	1.4 ± 0.2*	76.7 ± 0.4*
	БЭ пептид (II)-KLH	5.7 ± 0.3	9.4 ± 0.4*	21.2 ± 0.6	3.3 ± 0.3	60.6 ± 0.8
Гиппокамп СА3	ЛО контроль	4.6 ± 0.4*	2.5 ± 0.2*	5.9 ± 0.4*	1.2 ± 0.2*	85.8 ± 0.9*
	БЭ контроль	10.4 ± 0.4	7.3 ± 0.3	23.7 ± 0.5	2.5 ± 0.2*	56.1 ± 0.8
	БЭ пептид (I)	2.1 ± 0.2*	6.4 ± 0.2*	18.5 ± 0.6*	2.2 ± 0.2	71.0 ± 0.8*
	БЭ пептид (II)-KLH	4.3 ± 0.4*	8.5 ± 0.6	20.5 ± 0.5*	3.0 ± 0.3	63.8 ± 0.9*

\*  $p < 0.001$ .

меньшую активность по сравнению с фрагментом 101–115 (IV). Возможно, это обусловлено низкой иммуногенностью данного пептида даже в составе KLH-конъюгата.

Таким образом, получены новые данные об иммунопротективной активности двух ранее не описанных участков прионного белка – фрагментов 17–33 и 101–115. Наибольший интерес для разработки новых средств терапии болезни Альцгеймера представляет собой пептид 17–33, которому для проявления протективной активности не требуется конъюгация с белковым носителем.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Для синтеза пептидов использовали реактивы и производные аминокислот (Merck, ФРГ; Fluka, Швейцария). В иммунологических исследованиях применяли: PBS буфер, содержащий 2.7 мМ KCl, 140 мМ NaCl, 8.1 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.5 мМ KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4; раствор KLH в PBS в концентрации 5.8 мг/мл (Sigma-Aldrich, США); OVA

**Таблица 5.** Содержание бета-амилоида в тканях мозга мышей

Группа мышей	Среднее содержание бета-амилоида, нг/г
ЛО	4.30 ± 0.75*
БЭ	14.40 ± 1.15
БЭ пептид (I)	7.98 ± 0.30*
БЭ пептид (II)-KLH	7.29 ± 0.35*

\*  $p < 0.0001$ .

(РОСН, Польша); 25% водный раствор глутарового альдегида (Sigma, США), полный и неполный адьюванты Фрейнда (ПАФ, НАФ) (Difco laboratories, США), козы антитела против иммуноглобулинов мыши, конъюгированные с пероксидазой хрена (Имтек, Россия), 96-луночные планшеты Maxisorp (Nunc, Дания), бета-амилоид 1–40 (Invitrogen, Camarillo, CA), набор для определения бета-амилоида в мозге нетрансгенных мышей (Invitrogen, Camarillo, CA). Для иммунизации использовали десятидневных самцов NMRI мышей весом 25 ± 0.6 г (питомник “Пушино”).

ВЭЖХ проводили при помощи хроматографа Стайер (Аквилон, Россия) с использованием колонок Jupiter 5μ C18 300A 250 × 4.6 мм (Phenomenex, США) для аналитической хроматографии и Jupiter 10μ C18 300A 250 × 10 мм (Phenomenex, США) – для препаративной хроматографии. Масс-спектрометрию осуществляли методом MALDI на приборе VISION 2000 (Bioanalysis, Великобритания). Аминокислотный анализ проводили на приборе Biotronik LC-3000 (ФРГ) после гидролиза пептидов смесью 6 М HCl–TFA (2 : 1) в течение 45 мин при 170°C. Состояние нейронов в мозге анализировали с использованием микроскопа (Amplival, Karl Zeiss Jena, Germany).

**Твердофазный синтез и очистка пептидов.** Синтез пептидов проводили на *para*-алкоксибензильном полимере с содержанием гидроксильных групп 0.5 ммоль/г с применением Fmoc-группы в качестве временной N<sup>α</sup>-защиты. Нарастивание пептидной цепи выполняли последовательно с использованием 1-гидроксibenзотриазола и N,N'-диизопропилкарбодиимида либо тетрафторбората O-(бензо-

триазол-1-ил)-*N,N,N',N'*-тетраметилмочевины. Для выявления непрореагировавших аминогрупп после каждой конденсации применяли нингидриновый тест. Отщепление пептидов от полимера с одновременным деблокированием функциональных групп боковых цепей проводили смесью TFA (94%), триизопропилсилана (1%), этандитиола (2.5%) и воды (2.5%) из расчета 1–2 мл смеси на 100 мг пептидполимера. Очистку пептидов осуществляли с помощью обращеннофазовой ВЭЖХ в градиенте концентрации ацетонитрила 10–70% в 0.1% TFA за 1 ч при расходе элюента 3 мл/мин. Оптическое поглощение элюата измеряли при длине волны 226 нм.

Синтетические пептиды характеризовали данными аналитической ВЭЖХ, масс-спектрометрии MALDI и аминокислотного анализа. Аналитическую ВЭЖХ этих пептидов проводили в условиях, аналогичных их препаративной ВЭЖХ, при расходе элюента 1 мл/мин. Все синтезированные пептиды имели корректный аминокислотный состав и молекулярные массы  $m/z$  ( $M + H$ ) (табл. 2).

**Конъюгаты пептидов с KLH.** К раствору 2.4 мг пептида в 2.1 мл раствора KLH в PBS с концентрацией белка 5.8 мг/мл при перемешивании в течение 1 ч добавляли 1.2 мл 0.25% раствора глутарового альдегида в PBS. Полученный раствор перемешивали 15 ч, затем проводили диализ против PBS в течение 20 ч с двукратной сменой буфера [23].

**Конъюгаты пептидов с OVA.** К раствору 1 мг пептида и 2 мг OVA в 1 мл PBS при перемешивании в течение 1 ч добавляли 40 мкл раствора гидрохлорида 1-(3-диметиламинопропил)-3-этилкарбодиимида в PBS с концентрацией 5 мг/мл. Полученный раствор перемешивали 15 ч, затем проводили диализ против PBS в течение 20 ч с двукратной сменой буфера [23].

#### Схема эксперимента

Мышей иммунизировали четырьмя иммуногенами. В каждой группе было по 10 мышей, которых подвергали операции бульбэктомии. Контрольные группы состояли из 10 неиммунных БЭ мышей и 10 неиммунных ЛО мышей.

1 день – первая иммунизация, 25 день – операция бульбэктомии, 43 день – вторая иммунизация, 53 день – отбор крови и приготовление сывороток, начало обучения в водном лабиринте Морриса, 57 день – тестирование памяти животных.

**Иммунизация мышей и получение сывороток крови.** Раствор пептида (I) в PBS (1 мг/мл), и растворы конъюгатов пептидов (II)–(IV) с KLH в PBS (0.73 мг/мл в расчете на пептид) смешивали с равным объемом ПАФ (для первой иммунизации) или НАФ (для последующей иммунизации)

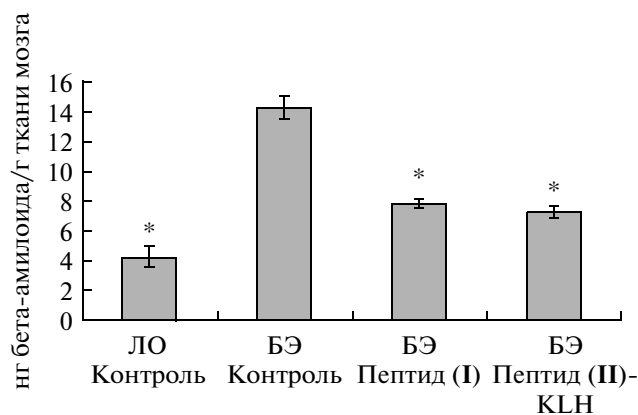


Рис. 3. Уровень бета-амилоида в мозге БЭ мышей, иммунизированных пептидами (I) и (II)-KLH. \*  $p < 0.0001$ .

и эмульгировали. Мышей иммунизировали два раза подкожно в основание хвоста в дозе 100 мкг пептида на животное. Отбор крови производили на 10-ый день после второй иммунизации из глазной вены. Образцы хранили при  $-20^{\circ}\text{C}$ .

**Определение титра противопептидных антител** осуществляли с помощью твердофазного ИФА, как описано в работе [23]. Конъюгаты пептидов с OVA вносили в лунки планшета в объеме 0.1 мл в концентрации 30 мкг/мл в расчете на свободный пептид. За титр антител принимали отрицательный десятичный логарифм ( $-\lg$ ) значения наибольшего разведения сыворотки, дающего окрашивание более 0.1 ОЕ при  $\lambda = 492$  нм и превышающего поглощение контрольных сывороток в таком же разведении в 2 раза. В качестве контроля при определении титров противопептидных антител в сыворотках использовали сыворотки мышей, иммунизированных KLH.

**Операцию бульбэктомии** проводили под нембуталовым наркозом (40 мг/кг, в/б) путем аспирации через трепанационное отверстие в черепе на 28 день после первой иммунизации, как описано в работе [22]. Контролем служили ЛО животные, которых подвергали аналогичной процедуре, но без удаления обонятельных луковиц. Всем животным по окончании операции в мышцы задней лапы вводили антибиотик “Бициллин 5” в дозе 6000 ед. для профилактики развития инфекции.

**Обучение и тестирование пространственной памяти животных.** Состояние пространственной памяти мышей оценивали после выработки у мышей пространственного навыка в водном лабиринте Морриса. Экспериментальная камера представляла собой круглый бассейн диаметром 80 см, заполненный на 30 см водой с температурой  $23^{\circ}\text{C}$ . Площадь бассейна условно делили на четыре равных сектора, в одном из которых находилась спасательная платформа диаметром 5 см, погружен-

ная на 0.5 см в воду. Воду закрашивали молоком, для того чтобы животные не могли визуально обнаружить спасательную платформу. До начала курса обучения проверяли способность всех животных плавать, а также сохранность зрения у БЭ животных. Обучение проводили в течение пяти дней по четыре сеанса ежедневно, при этом фиксировали латентный период обнаружения платформы. Через 24 ч после окончания обучения у животных тестировали уровень пространственной памяти в отсутствие спасательной платформы в течение одной минуты. При анализе полученных результатов были использованы два показателя: число заходов и время нахождения мышей в каждом секторе. Статистическую обработку результатов поведенческих данных проводили, используя двухфакторный анализ (general ANOVA) (пакет статистических программ "Statistica 6.0"). Достоверность результатов оценивали с использованием двустороннего критерия Стьюдента.

Для проведения **морфологических и биохимических исследований** проводили перфузию мозга охлажденным физиологическим раствором у глубоко анестезированных животных, получавших летальную дозу нембутала (60 мг/кг в/б). Мозг извлекали на холоду и рассекали на два полушария. Правое полушарие фиксировали в 4% пара-формальдегиде в течение 48 ч при 40°C, а затем хранили в 30% сахарозе до приготовления 20 мкм срезов мозга, которые затем хранили в гликолевом криопротекторном растворе при -200°C до проведения гистологического анализа. Навески коры и гиппокампа левого полушария хранили при температуре -80°C до проведения процедур по определению суммарного количества бета-амилоида.

**Морфологическое исследование** мозга животных проводили, как описано в работе [11]. Для выявления таких патологических изменений как пикноз, кариолизис, цитолиз, вакуолизация и количественной оценки состояния нейронов срезы мозга окрашивали крезил виолетом (Nissl). Анализировали каждый шестой срез, содержащий изучаемые структуры мозга, анализу подвергали 1000 клеток в каждой структуре (10–20 полей зрения, увеличение 40×) у каждого животного с использованием дигитайзерной компьютерной системы PDP-12 (Germany). Проводили количественную оценку патологических реакций нейронов в разных экспериментальных группах.

**Уровень бета-амилоида в ткани мозга** определяли иммуноферментным методом, как описано в работе [24]. Выявляли бета-амилоид 1–40, поскольку бета-амилоид 1–42 у мышей присутствует в крайне низких концентрациях, выходящих за рамки чувствительности метода определения.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ № 13-04-40106 КОМФИ и 13-04-00633.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Prusiner S.B. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1998. V. 95. P. 13363–13383.
2. Esiri M.M., Carter J., Ironside J.W. // Neuropathol. Appl. Neurobiol. 2000. V. 26. P. 273–284.
3. Ferrer I., Blanco R., Carmona M., Puig B., Ribera R., Rey M.J., Ribalta T. // Acta Neuropathol. 2001. V. 101. P. 49–56.
4. Kovacs G.G., Zerbi P., Voigtländer T., Strohschneider, M., Trabattoni G., Hainfellner J.A., Budka H. // Neurosci. Lett. 2002. V. 329. P. 269–272.
5. Parkin E.T., Watt N.T., Hussain I., Eckman E.A., Eckman C.B., Manson J.C., Baybutt H.N., Turner A.J., Hooper N.M. // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2007. V. 104. P. 11062–11067.
6. Dermaut B., Croes E.A., Rademakers R., Van den Broeck M., Cruts M., Hofman A., van Duijn C.M., Van Broeckhoven C. // Ann. Neurol. 2003. V. 53. P. 409–412.
7. Riemenschneider M., Klopp N., Xiang W., Wagenpfeil S., Vollmert C., Müller U., Förstl H., Illig T., Kretschmar H., Kurz A. // Neurology. 2004. V. 63. P. 364–366.
8. Laurén J., Gimbel D.A., Nygaard H.B., Gilbert J.W., Strittmatter S.M. // Nature. 2009. V. 457. P. 1128–1132.
9. Chung E., Ji Y., Sun Y., Kascsak R.J., Kascsak R.B., Mehta P.D., Strittmatter S.M., Wisniewski T. // BMC Neurosci. 2010. V. 11. P. 130.
10. Spinner D.S., Kascsak R.B., Lafauci G., Meeker H.C., Ye X., Flory M.J., Kim J.I., Schuller-Levis G.B., Levis W.R., Wisniewski T., Carp R.I., Kascsak R.J. // J. Leukoc. Biol. 2007. V. 81. P. 1374–1385.
11. Bobkova N.V., Medvinskaya N.I., Kamynina A.V., Aleksandrova I.Y., Nesterova I.V., Samokhin A.N., Korojev D.O., Filatova M.P., Nekrasov P.V., Abramov A.Y., Leonov S.V., Volpina O.M. // Neurobiology of Learning and Memory. 2014. V. 107. P. 50–64.
12. Kamynina A.V., Holmström K.M., Korojev D.O., Volpina O.M., Abramov A.Y. // Int. J. Biochem. Cell Biol. 2013. V. 45. P. 899–907.
13. Peretz D., Williamson R.A., Kaneko K., Vergara J., Leclerc E., Schmitt-Ulms G., Mehlhorn I.R., Legname G., Wormald M.R., Rudd P.M., Dwek, R.A., Burton D.R., Prusiner S.B. // Nature. 2001. V. 412. P. 739–743.
14. White A.R., Enever P., Tayebi M., Mushens R., Linehan J., Brandner S., Anstee D., Collinge J., Hawke, S. // Nature. 2003. V. 422. P. 80–83.
15. Oboznaya M.B., Gilch S., Titova M.A., Korojev D.O., Volkova T.D., Volpina O.M., Schätzl H.M. // Cell. Mol. Neurobiol. 2007. V. 27. P. 271–284.
16. Chen S., Yadav S.P., Surewicz W.K. // J. Biol. Chemistry. 2010. V. 285. P. 26377–26383.
17. Kang M., Kim S.Y., An S.S., Ju Y.R. // Exp. Mol. Med. 2013. V. 45. P. e34.



18. Stahl N., Baldwin M.A., Teplov, D.B., Hood L., Gibson B.W., Burlingame A.L., Prusiner S.B. // *Biochemistry*. 1993. V. 32. P. 1991–2002.
19. Вольпина О.М., Титова М.А., Жмак М.Н., Короев Д.О., Обозная М.Б., Волкова Т.Д., Иванов В.Т. // *Биоорганическая химия*. 2002. Т. 28. С. 387–395. (Vol'pina O.M., Titova M.A., Zhmak M.N., Koroev D.O., Oboznaya M.B., Volkova T.D., Ivanov V.T. // *Russ. J. Bioorgan. Chem.* 2002. V. 28. P. 349–356.)
20. Hozumi S., Nakagawasai O., Tan-No K., Nijijima F., Yamadera F., Murata A., Arai Y., Yasuhara H., Tadano T. // *Behav. Brain Res.* 2003. V. 138. P. 9–15.
21. Bobkova N.V., Nesterova I.V., Dana R., Dana E., Nesterov V.I., Aleksandrova Y., Medvinskaya N.I., Samokhin A.N. // *Neurosci. Behav. Physiol.* 2004. V. 34(7). P. 671–676.
22. Александрова И.Ю., Кувичкин В.В., Кашипаров И.А., Медвинская Н.И., Нестерова И.В., Лунин С.М., Самохин А.Н., Бобкова Н.В. // *Биохимия*. 2004. Т. 69(2). С. 176–180.
23. *Immunochemical Protocols*, 2<sup>nd</sup> ed., *Methods in Molecular Biology*. V. 80. Ed. John P. Sambrook. Humana Press. 1998.
24. Вольпина О.М., Медвинская Н.И., Камынина А.В., Запорожская Я.В., Александрова И.Ю., Короев Д.О., Самохин А.Н., Волкова Т.Д., Арсеньев А.С., Бобкова Н.В. // *Биоорганическая химия*. 2014. Т. 40. P. 451–457. (Vol'pina O.M., Medvinskaya N.I., Kamynina A.V., Zaporozhskaya Y.V., Aleksandrova I.J., Koroev D.O., Samokhin A.N., Volkova T.D., Arseniev A.S., Bobkova N.V. // *Russ. J. Bioorgan. Chem.* 2014. V. 40. P. 417–422.)

## Protective Activity of Prion Protein Fragments after Immunization of Animals with Experimentally Induced Alzheimer's Disease

O. M. Volpina\*, T. D. Volkova\*<sup>#</sup>, N. I. Medvinskaya\*\*, A. V. Kamynina\*,  
Y. V. Zaporozhskaya\*, I. J. Aleksandrova\*\*, D. O. Koroev\*, A. N. Samokhin\*\*,  
I. V. Nesterova\*\*, V. I. Deygin\*, N. V. Bobkova\*\*

<sup>#</sup>Phone: +7 (495)336-57-77; e-mail: tdvol@mx.ibch.ru

\*Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,  
ul. Miklukho-Maklaya, 16/10, Moscow, 117997 Russia

\*\*Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, ul. Institutskaya 3, Pushchino, 142290 Russia

The prion protein is considered as one of the membrane targets of neurotoxic beta-amyloid during Alzheimer's disease development. We have chosen and synthesized 17–33, 23–33, 95–110 and 101–115 prion fragments involved in beta-amyloid binding. The effect of immunization with the peptides on the features of Alzheimer's disease was investigated in animals with an experimentally induced form of the disease. It was shown that immunization either with peptide 17–33 or with protein conjugates of peptides 23–33 and 101–115 increases the level of brain beta-amyloid and improves morphofunctional state of the brain.

*Keywords: Alzheimer's disease, prion protein, beta-amyloid, synthetic peptides*