



СИНТЕТИЧЕСКИЙ ФРАГМЕНТ РЕЦЕПТОРА КОНЕЧНЫХ ПРОДУКТОВ ГЛИКИРОВАНИЯ И ЕГО АНАЛОГ ПРЕПЯТСТВУЮТ УХУДШЕНИЮ ПАМЯТИ В ТРАНСГЕННОЙ МЫШИНОЙ МОДЕЛИ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА

© 2019 г. Д. О. Короев*^{*,#}, О. М. Вольпина*, Т. Д. Волкова*, А. В. Камынина*, А. Н. Самохин**, М. П. Филатова*, Н. В. Бобкова**

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

**ФГБУН Институт биофизики клетки Российской академии наук, Россия, 142290 Пущино, ул. Институтская, 3

Поступила в редакцию 05.03.2019 г.

После доработки 18.03.2019 г.

Принята к публикации 08.04.2019 г.

Мембранный рецептор конечных продуктов гликирования вовлечен в развитие ряда патологических состояний, в том числе болезни Альцгеймера, при которой наблюдается его гиперэкспрессия в клетках головного мозга и рост активности. Ранее нами было показано, что синтетический фрагмент (60–76) рецептора конечных продуктов гликирования при интраназальном введении способен препятствовать нарушению пространственной памяти ольфакторно бульбэктомированных мышей, развивающих признаки болезни Альцгеймера. Мы предположили, что защита *N*-концевой аминокислотной функции пептида ацетильной группой и превращение карбоксильной группы *C*-концевого аминокислотного остатка в амид повысит стабильность этого пептида в опытах *in vivo* и такой защищенный пептид проявит более высокую активность по сравнению с исходным свободным пептидом. В настоящей работе был синтезирован пептид Ac-(60–76)-NH₂, являющийся защищенным аналогом синтетического фрагмента RAGE (60–76). Активность пептида (60–76) и его защищенного аналога была изучена на трансгенных 5xFAD мышях, являющихся общепринятой моделью болезни Альцгеймера. Тестирование состояния памяти проводили в водном лабиринте Морриса. Показано, что интраназальное введение обоих пептидов в течение двух месяцев трансгенным 5xFAD мышам в одинаковой степени препятствует нарушению их пространственной памяти. Различие в активности изучаемых пептидов было выявлено через 7 дней после прекращения введения препаратов, когда только животные, ранее получавшие модифицированный пептид Ac-(60–76)-NH₂, проявили способность находить сектор обучения водного лабиринта Морриса. Животные, получавшие пептид (60–76), потеряли изначально выявленную способность находить сектор обучения и были полностью дезориентированы. Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что модифицированный фрагмент (60–76) с защищенными *N*- и *C*-концевыми функциональными группами имеет более выраженное протективное и пролонгированное действие по сравнению со свободным пептидом (60–76), и делает его перспективным для разработки лекарственного препарата для терапии болезни Альцгеймера.

Ключевые слова: синтетические пептиды, RAGE, болезнь Альцгеймера, 5xFAD мыши

DOI: 10.1134/S0132342319050051

ВВЕДЕНИЕ

Мембранный рецептор конечных продуктов гликирования (receptor for advanced glycation end-products, RAGE) в норме встречается и функционирует в разных тканях, однако при ряде патологических состояний, включая и болезнь Альцгеймера (БА), отмечают его гиперэкспрессию в клетках головного мозга и рост активности [1–4].

В организме RAGE существует в виде нескольких изоформ, среди которых особо выделяют растворимую изоформу sRAGE, состоящую только из внеклеточной части молекулы RAGE. Показано, что sRAGE, конкурируя с полноразмерным рецептором за связь с лигандами, подавляет его гиперактивность [5].

Нами ранее было выдвинуто предположение о том, что короткие фрагменты внеклеточной части RAGE, несущие сайты связывания с лигандами, подобно изоформе sRAGE будут способны

[#] Автор для связи: (тел: 7(495)336-57-77; эл. почта: koroevd@gmail.com).

блокировать активацию рецептора. Был синтезирован и изучен набор фрагментов внеклеточных доменов RAGE [6–8]. Активность пептидов изучали при интраназальном введении ольфакторно бульбэктомированным мышам, которые проявляли поведенческие и морфологические признаки, характерные для БА. В результате эксперимента был выявлен наиболее активный пептид, соответствующий последовательности 60–76 одной из экспонированных неструктурированных петель V-домена RAGE, который препятствовал ухудшению пространственной памяти и улучшал морфологические и биохимические характеристики нейронов головного мозга экспериментальных животных [8].

Целью настоящего исследования являлось создание модифицированного аналога RAGE (60–76) пептида с защищенными N- и C-концевыми функциональными группами и сравнение активности пептида (60–76) и его защищенного аналога на общепринятой модели БА – трансгенных 5xFAD мышах. Также задачей исследования явилось сопоставление протективной активности, проявляемой пептидом RAGE (60–76), на двух моделях БА *in vivo*: трансгенных и бульбэктомированных мышах, с целью доказательства валидности последней.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Синтетический фрагмент RAGE (60–76), проявляющий протективную активность на бульбэктомированных мышах [6, 8], имеет аминокислотную последовательность AWKVLSPQGGGPWDSVA (I). Наиболее широко распространенным способом повышения активности пептидных препаратов является синтез их аналогов, обладающих устойчивостью к протеолизу [9]. Мы предположили, что защита N-концевой аминокислотной группы пептида ацетильной группой и замена карбоксильной группы C-концевого аминокислотного остатка амидной повысит стабильность этого пептида в опытах *in vivo* и что такой защищенный пептид проявит более высокую активность, чем свободный. Модифицированный аналог пептида (60–76) имеет формулу Ac-AWKVLSPQGGGPWDSVA-NH₂ (II). Пептиды синтезировали по стандартным методикам твердофазного синтеза в автоматическом режиме. Очистку пептидов осуществляли методом обращенно-фазовой ВЭЖХ, индивидуальность пептидов (>98%) подтверждали методами аналитической ВЭЖХ и масс-спектрометрии.

Сравнительный анализ активности пептидов (I) и (II) был проведен на линии трансгенных мышей 5xFAD, характеризующихся оверэкспрессией предшественника амилоида APP(695), содержащего мутации K670N/M671L, I716V, V717I, и мутациями в гене пресенилина PS1: M146L, L286V, обнаруживаемыми при наследственной форме БА человека [10]. Данная модель на живот-

ных воспроизводит основные признаки амилоидоза, характерного для БА, и широко используется в экспериментах как модель нейродегенерации с гиперпродукцией β-амилоида (1–42), отложением амилоидных бляшек и гибелью нейронов коры и гиппокампа.

Пептиды (I) и (II) вводили интраназально трансгенным животным каждый день, начиная с двухмесячного возраста, в течение 70 дней. Контролем служили трансгенные и нетрансгенные мыши той же линии и возраста, получавшие физ. раствор. Спустя 65 дней после начала эксперимента, не прекращая введения пептидов, мышам в течение 5 дней обучали находить спасательную платформу в водном лабиринте Морриса (сектор 3), а затем тестировали состояние их памяти (1-е тестирование), оценивая время нахождения в 4 секторах водного лабиринта Морриса (рис. 1а) и число заходов в каждый из секторов (рис. 1б). Как видно из приведенных данных, трансгенные животные, получавшие исследуемые пептиды (I) и (II), достоверно выделяли сектор обучения (сектор 3) по времени нахождения в нем (рис. 1а), но не по числу заходов в этот сектор (рис. 1б). Контрольные нетрансгенные животные были способны узнать сектор обучения 3 как по числу заходов, так и по времени нахождения, в то время как трансгенные животные, не получавшие препарат, не выделяли сектор обучения ни по одному из изучаемых параметров. Таким образом, способность пептида (II) при длительном интраназальном введении защищать от нарушения пространственную память трансгенных животных по обоим параметрам оказалась сопоставима с эффективностью пептида (I). Оба пептида обладали способностью сохранять пространственную память трансгенных мышей только по одному из изучаемых параметров (время нахождения в секторе 3).

После первого тестирования состояния памяти мышам прекращали вводить пептиды и через 7 дней без дополнительного обучения проводили второе тестирование (рис. 2а, 2б). Трансгенные животные, ранее получавшие пептид (I), утратили способность выделять сектор обучения (сектор 3) лабиринта Морриса по времени нахождения (рис. 2а), и по числу заходов (рис. 2б). Животные, ранее получавшие пептид (II), не только сохранили выявленную при первом тестировании способность выделять сектор обучения по времени нахождения (рис. 2а), но и проявили способность выделять сектор 3 по числу заходов (рис. 2б). Активность контрольных животных не отличалась от активности, выявленной при первом тестировании (рис. 1а, 1б).

Сравнительный анализ активности свободного пептида (I) и его защищенного аналога Ac-(60–76)-NH₂ (II) позволил обнаружить важную особенность протективного действия пептида (II). Спустя 7 дней после прекращения введения только животные, получавшие пептид (II), сохранили способность находить сектор обуче-

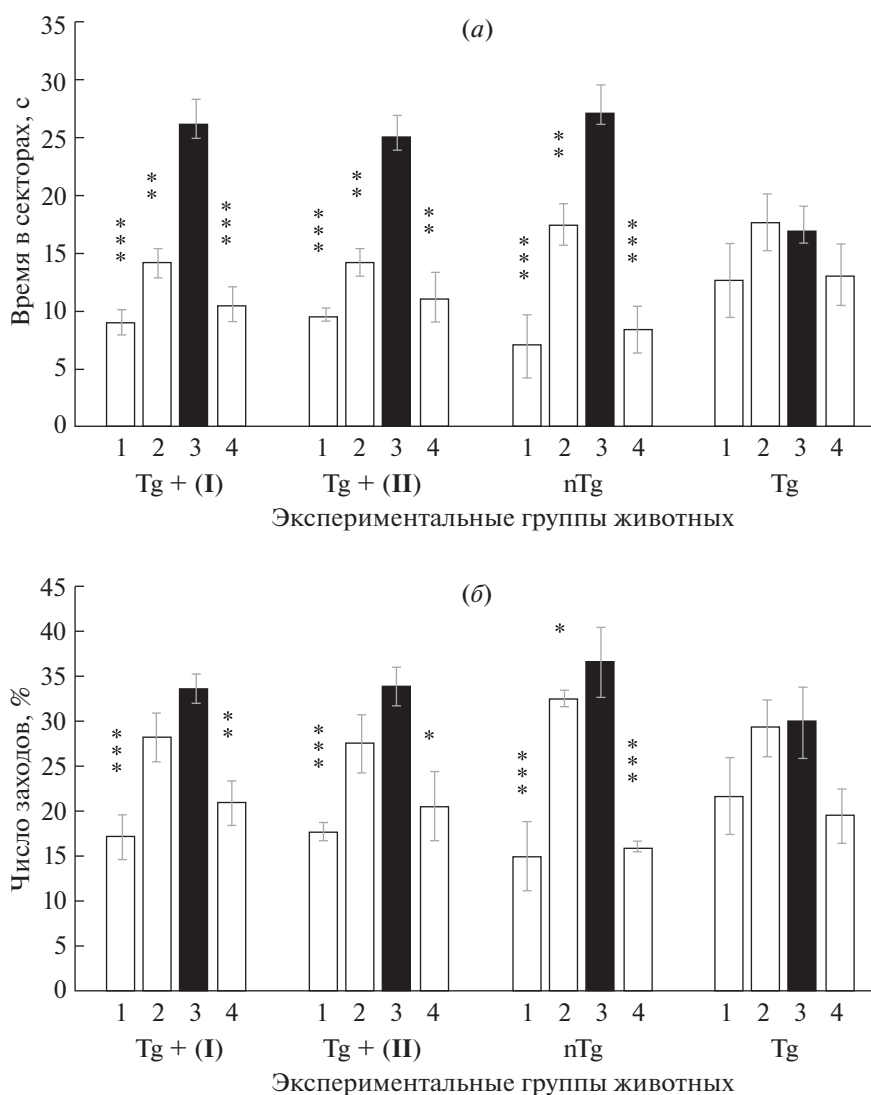


Рис. 1. Влияние интраназального введения пептидов – фрагментов RAGE (I) и (II) на пространственную память 5xFAD мышей после 70 дней введения препаратов (1-е тестирование). *a* – время нахождения животных в секторах водного лабиринта Морриса; *b* – число заходов в секторы (% от общего числа заходов). 1–4 – секторы лабиринта Морриса, 3 – сектор обучения. Экспериментальные группы животных: Tg + (I) или Tg + (II) – трансгенные мыши, получавшие интраназально пептид (I) или (II), nTg – нетрансгенные мыши, получавшие физраствор, Tg – трансгенные мыши, получавшие физ. раствор. * $p < 0.01$; ** $p < 0.001$; *** $p < 0.0001$.

ния водного лабиринта Морриса как по времени нахождения в секторе, так и по числу заходов в него. Животные же, получавшие пептид (I), способность к обучению полностью утратили. Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что модифицированный фрагмент Ac-(60–76)-NH₂ (II) имеет более высокую протективную активность по сравнению со свободным пептидом (I), причем очень важным является пролонгированное действие препарата (II), не только не прекращающееся, но и даже возрастающее после отмены его введения.

Кроме того, в результате проведенных исследований было показано, что синтетический фрагмент RAGE (60–76) (I) проявляет активность не

только на бульбэктомированных [6, 8], но и на трансгенных животных, моделирующих БА. Данный результат исследований важен для доказательства активности пептида (60–76) (I), а также для подтверждения валидности бульбэктомированных мышей как модели БА.

Таким образом, результаты проведенной работы позволяют сделать вывод о том, что защищенный пептид (II) перспективен для разработки на его основе лекарственного препарата для терапии БА.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали реактивы и производные аминокислот (Merck, ФРГ; Fluka, Швейца-

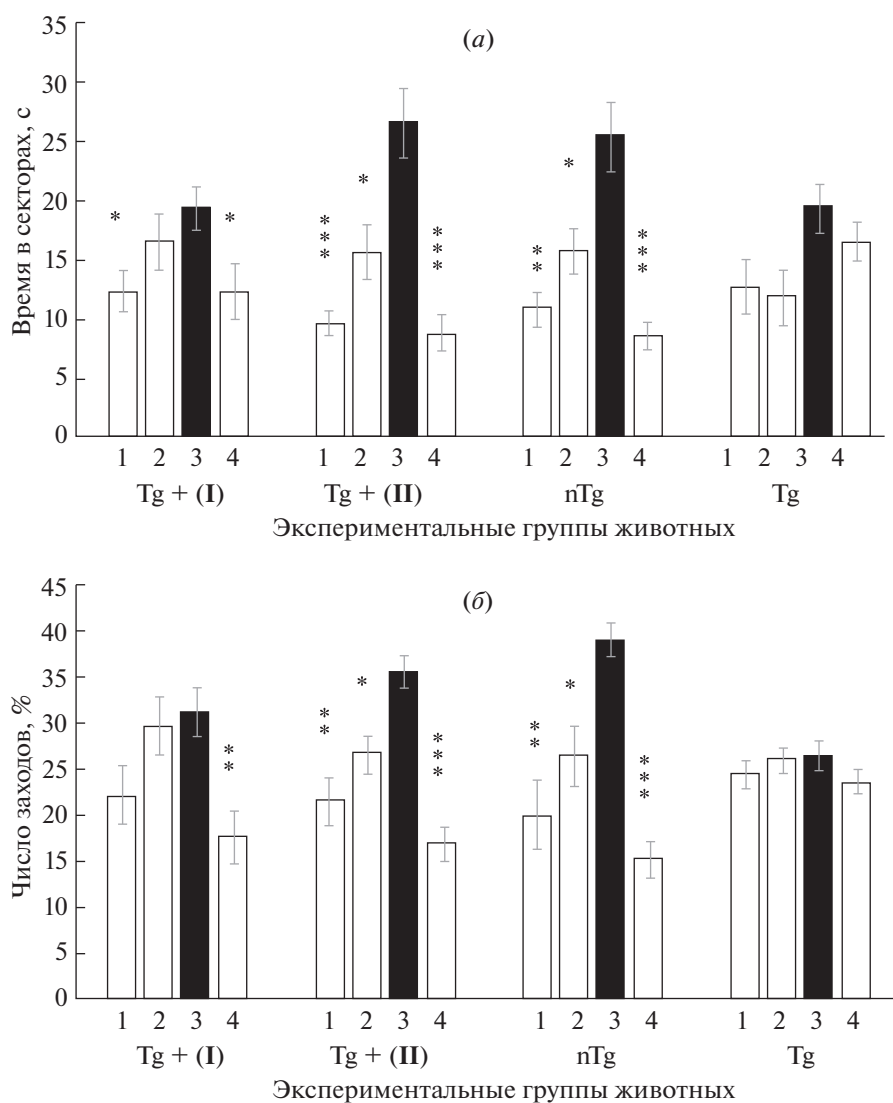


Рис. 2. Состояние пространственной памяти 5xFAD мышей через 7 суток после прекращения введения пептидов (I) и (II) (2-е тестирование). *a* – время нахождения животных в секторах водного лабиринта Морриса; *b* – число заходов в секторы (% от общего числа заходов). 1–4 – секторы лабиринта Морриса, 3 – сектор обучения. Экспериментальные группы животных: Tg + (I) или Tg + (II) – трансгенные мыши, ранее получавшие интраназально пептид (I) или (II), nTg – нетрансгенные мыши, получавшие физраствор, Tg – трансгенные мыши, получавшие физраствор. * $p < 0.01$; ** $p < 0.001$; *** $p < 0.0001$.

рия), Rink-AM полимер (GL Biochem, Китай). Твелофазный синтез пептида осуществляли на автоматическом синтезаторе SYRO-I (Biotage, Швеция). Для ВЭЖХ применяли хроматограф System Gold (Beckman, США), хроматограф Стайер (Аквилон, Россия), колонки Jupiter 5 μ C18 300A 250 \times 4.60 мм (Phenomenex, США) для аналитической хроматографии; Jupiter 10 μ C18 300A 250 \times 10.00 мм (Phenomenex, США) для полупрепаративной хроматографии. Масс-спектрометрию осуществляли методом MALDI на приборе VISION 2000 (Bioanalysis, Великобритания).

Животные

Эксперименты проводили на самцах мышей трансгенной линии 5xFAD возрастом 2 месяца, полученных, как описано в работе [10]. Животных содержали по 5–7 особей в клетке при температуре 21–23 $^{\circ}$ C, естественном режиме освещения, свободным доступом к питью и стандартном рационе питания. Мыши 5xFAD характеризуются сверхэкспрессией предшественника амилоида и несут мутации K670N, M671L, I716V и V717I в гене APP(695) человека и мутации по пресенилину PS1: M146L, L286V. Контролем служат нетрансгенные мыши той же линии и возраста. Трансген-

ность мышей определялась путем их генотипирования методом ПЦР-анализа ДНК, выделяемого из образца ткани уха. Наличие трансгенной каскады определялось с использованием праймеров (5'-3') AGGACT GACCACTCGACCAAG и CGGG-GGTCTAGTTCTGCAT и электрофоретической визуализации 377bp-фрагмента.

Исследование выполнено в соответствии с «Правилами работы с экспериментальными животными» (Постановление Министерства здравоохранения России, август 12, 1997, № 755).

Твердофазный синтез и очистка пептидов

Синтез пептидов проводили на 4-(2',4'-диметоксифенил-*Fmoc*-аминометил)-феноксиацетамидоаминометильном полимере (Rink-AM) с содержанием аминогрупп 0.7 ммоль/г в автоматическом режиме с применением *Fmoc*-группы в качестве временной N^α -защиты. *Fmoc*-группу удаляли 20% раствором 4-метилпиперидина в диметилформамиде. Для защиты боковых функций остатков *Seg* использовали *Bu*'-группу, для *Asp* – *OBu*'-группу, для *Lys* – *Woc*-группу. Нарастивание пептидной цепи выполняли последовательно с использованием тетрафторбората *O*-(бензотриазол-1-ил)-*N,N,N',N'*-тетраметилмочевины (TBTU). Отщепление пептидов от полимера с одновременным деблокированием функциональных групп боковых цепей проводили смесью TFA (81.5%), тиоанизола (5%), фенола (5%), воды (5%), этандитиола (2.5%) и триизопропилсилана (1%) из расчета 1–2 мл смеси на 100 мг пептидил-полимера. Очистку пептидов осуществляли с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ в градиенте концентрации ацетонитрила 10–70% в 0.1% водной 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 и масс-спектрометрии MALDI. Аналитическую ВЭЖХ этих пептидов проводили в градиенте концентрации ацетонитрила 10–70% в 0.1% водной TFA за 15 мин при расходе элюента 1 мл/мин. Характеристики синтетических пептидов (t_R – время удерживания в условиях аналитической ВЭЖХ, $[M + H]^+/M$ – масса молекулярного иона по данным MS/теоретическая молекулярная масса): (I) – t_R 10.8 мин, $[M + H]^+$ 1755.84/1753.87; (II) – t_R 11.89, $[M + H]^+$ 1795.91/1794.89.

Интраназальное введение пептидов

Животным ежедневно вводили интраназально по 4 мкл раствора пептида в стерильном физиологическом растворе в концентрации 5 мг/мл. Для этого каждой мышце с помощью микропипетки наносили каплю раствора в непосредственной близости от ноздри так, чтобы капля попадала в

носовую проход в процессе нормального дыхания. В период обучения и тестирования памяти раствор вводили за 1 ч до проведения экспериментов в лабиринте Морриса.

Обучение животных и тестирование их пространственной памяти

Состояние пространственной памяти мышей оценивали после выработки у них пространственного навыка в водном лабиринте Морриса. Экспериментальная камера представляла собой круглый бассейн диаметром 80 см, заполненный на 30 см водой с температурой 23°C. Площадь бассейна условно делили на четыре равных сектора, в одном из которых (сектор 3) находилась спасательная платформа диаметром 5 см, погруженная на 0.5 см в воду. Воду окрашивали молоком, для того чтобы животные не могли визуально обнаружить спасательную платформу. До начала курса обучения проверяли способность всех животных плавать, а также сохранность зрения. Обучение проводили в течение пяти дней по четыре сеанса ежедневно, при этом фиксировали латентный период обнаружения платформы. Через 24 ч после окончания обучения и еще через 7 сут у животных тестировали уровень пространственной памяти в течение одной минуты в отсутствие спасательной платформы. При анализе полученных результатов были использованы два показателя: число заходов и время нахождения мышей в каждом секторе. Статистическую обработку результатов поведенческих данных проводили с использованием пакета статистических программ “Statistica 6.0”, результаты представлены как $x \pm SEM$. Достоверность различий данных оценивали с использованием двустороннего критерия Стьюдента.

Схема эксперимента

В каждой исследуемой группе было по шесть трансгенных мышей, которым интраназально вводили пептиды. Контрольные группы состояли из шести трансгенных и десяти нетрансгенных мышей, которым интраназально вводили физиологический раствор.

– 1–70 дни – ежедневное интраназальное введение пептидов

– 65–69 дни – обучение в водном лабиринте Морриса;

– 70 день – первое тестирование пространственной памяти;

– 77 день – второе тестирование пространственной памяти.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ 19-015-00064.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей в качестве объектов исследований.

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Neeper M., Schmidt A.M., Brett J., Yan S.D., Wang F., Pan Y.C., Elliston K., Stern D., Shaw A. // *J. Biol. Chem.* 1992. V. 267. P. 14998–15004.
2. Yan S.D., Chen X., Fu J., Chen M., Zhu H., Roher A., Slatery T., Zhao L., Nagashima M., Morser J., Migheli A., Nawroth P., Stern D., Schmidt A.M. // *Nature.* 1996. V. 382. P. 685–691.
3. Lue L.F., Walker D.G., Brachova L., Beach T.G., Rogers J., Schmidt A.M., Stern D.M., Yan S.D. // *Exp. Neurol.* 2001. V. 171. P. 29–45.
4. Leclerc E., Sturchler E., Vetter S.W. // *Cardiovasc. Psychiatry Neurol.* V. 2010. Article ID 539581. <https://doi.org/10.1155/2010/539581>
5. Yan S.F., Ramasamy R., Schmidt A.M. // *Biochem. Pharmacol.* 2010. V. 79. P. 1379–1386.
6. Вольпина О.М., Короев Д.О., Волкова Т.Д., Камынина А.В., Филатова М.П., Запорожская Я.В., Самохин А.Н., Александрова И.Ю., Бобкова Н.В. // *Биоорган. химия.* 2015. Т. 41. С. 709–716. (Volpina O.M., Koroev D.O., Volkova T.D., Kamynina A.V., Filatova M.P., Zaporozhskaya Ya.V., Samokhin A.N., Aleksandrova I.Yu., Bobkova N.V. // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2015. V. 41. P. 638–644).
7. Короев Д.О., Вольпина О.М., Волкова Т.Д., Камынина А.В., Филатова М.П., Баласанянц С.М., Самохин А.Н., Бобкова Н.В. // *Биоорган. химия.* 2017. Т. 43. С. 174–179. (Koroev D.O., Volpina O.M., Volkova T.D., Kamynina A.V., Filatova M.P., Balasanyants S.M., Samokhin A.N., Bobkova N.V. // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2017. V. 43. P. 150–154).
8. Volpina O.M., Samokhin A.N., Koroev D.O., Nesterova I.V., Volkova T.D., Nekrasov P.V., Tatarnikova O.G., Kamynina A.V., Balasanyants S.M., Voronina T., Bobkova N.V. // *J. Alzheimers Dis.* 2018. V. 61. P. 1061–1076.
9. Bogachouk A.P., Storozheva Z.I., Solovjeva O.A., Sherstnev V.V., Zolotarev Y.A., Azev V.N., Rodionov I.L., Surina E.A., Lipkin V.M. // *J. Psychopharmacol.* 2016. V. 30. P. 78–92.
10. Oakley H., Cole S.L., Logan S., Maus E., Shao P., Craft J., Guillozet-Bongaarts A., Ohno M., Disterhoft J., Van Eldik L., Berry R., Vassar R. // *J. Neurosci.* 2006. V. 26. P. 10129–10140.

Synthetic Fragment of the Receptor for Advanced Glycation Endproducts and Its Analogue Improve Memory in Transgenic Alzheimer's Disease Mouse Model

D. O. Koroev*.,#, O. M. Volpina*, T. D. Volkova*, A. V. Kamynina*, A. N. Samokhin**, M. P. Filatova*, and N. V. Bobkova**

*Phone: +7(495)336-57-77; e-mail: koroevd@gmail.com

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

**Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, Institutskaya st., 3, Pushchino, Moskovskaya obl., 142290 Russia

The membrane receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) is involved in the development of a number of pathological conditions, including Alzheimer's disease (AD), in which the receptor overexpression in brain cells and its increasing activity is observed. We have previously shown that the synthetic fragment RAGE (60–76), administered intranasally, could prevent the disturbance of the spatial memory of olfactory bulbectomized mice, that develop features of AD. We suggested that N-terminal amino function of the peptide protected with acetic group and C-terminal carboxyl group replaced with amide, would increase the stability of this peptide in *in vivo* experiments, and this protected peptide would show higher activity compared to the original free one. In the current study the protected peptide analog Ac-(60–76)-NH₂ was synthesized. The activity of the peptide (60–76) and its protected analog has studied in transgenic 5xFAD mice, which represent a generally accepted model of AD. The memory testing was performed in the Morris water maze. It was shown that intranasal administration of these peptides to transgenic 5xFAD mice for two months preserved the spatial memory of animals, and both peptides exhibited the same ability to prevent the spatial memory. The difference in the activity of the tested peptides was revealed 7 days after drug administration had been over, and only animals, previously received the modified peptide Ac-(60–76)-NH₂, showed the ability to find the Morris water maze learning sector. The animals received the peptide (60–76) lost their ability to find the learning sector after 7 days and were completely disoriented. The data obtained allow us to conclude that the modified fragment (60–76) with protected N- and C-terminal functional groups has a more pronounced and long lasting protective effect compared to the free peptide (60–76). Thus, Ac-(60–76)-NH₂ is a promising candidate for development of the drug for the treatment of Alzheimer's disease.

Keywords: synthetic peptides, RAGE, Alzheimer's disease, 5xFAD mice