

УДК 577

Индукцированная конверсия мономерного α -синуклеина в реальном времени: новый подход к диагностике нейродегенеративных заболеваний из группы синуклеинопатий со слабо выраженной активностью в тесте RT-QuIC

Д. А. Орлова^{1*}, А. А. Кудряева¹, Н. А. Колотьева², Е. О. Иванова², Е. Ю. Федотова²,
П. П. Трегуб^{2,3}, А. Б. Салмина², С. Н. Иллариошкин², А. А. Белогуров^{1,4}

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Государственный научный центр Российской Федерации Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Москва, 117997 Россия

²Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научный центр неврологии», Москва, 125367 Россия

³Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский университет), Москва, 119048 Россия

⁴Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования Российский университет медицины Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, 127473 Россия

*E-mail: dorlova01@yandex.ru

Поступила в редакцию 06.10.2024

Принята к печати 07.02.2025

DOI: 10.32607/actanaturae.27530

РЕФЕРАТ Нейродегенеративные заболевания, составляющие группу синуклеинопатий (болезнь Паркинсона, деменция с тельцами Леви и мультисистемная атрофия), характеризуются формированием агрегатов aberrантного синаптического белка α -синуклеина в нейронах или глиальных клетках. Эти заболевания манифестируют клинически лишь спустя годы после появления первых следовых количеств патологических белковых агрегатов в мозге, что затрудняет их своевременную и корректную диагностику. В последние годы ведется разработка и апробация нового подхода, который основан на конверсии белков, индуцированной встряхиванием, в реальном времени – RT-QuIC (Real-Time Quaking-Induced Conversion): предполагается, что данная технология сможет предоставить врачам мощный инструмент для ранней и точной диагностики синуклеинопатий, открывая тем самым новые горизонты в изучении нейродегенеративных заболеваний. Этот подход позволяет обнаруживать неправильно свернутые агрегаты α -синуклеина в физиологических жидкостях человека путем добавления избытка рекомбинантного α -синуклеина, который в результате запускаемой экспоненциальной реакции принимает конформацию присутствующих aberrантных молекул. Получение чистого α -синуклеина критически важно для успешного применения технологии RT-QuIC, так как качество рекомбинантного белка сильно влияет на чувствительность и специфичность метода, что, в свою очередь, определяет его диагностическую ценность. С применением трехстадийной хроматографической очистки из периплазмы бактериальных клеток получен препарат рекомбинантного мономерного α -синуклеина с чистотой более 97%. Более высокая степень очистки препарата α -синуклеина увеличивает время ана-

лиза, но вместе с тем уменьшает фоновый сигнал и позволяет проводить более длительные инкубации для уверенной детекции таких синуклеинопатий, как мультисистемная атрофия мозжечкового типа со слабо выраженной активностью в тесте RT-QuIC. Представленные данные дают основания утверждать, что разработанные компоненты системы RT-QuIC позволят расширить диагностический потенциал данного метода в отношении нейродегенеративных заболеваний из группы синуклеинопатий.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА α -синуклеин, синуклеинопатии, мультисистемная атрофия, деменция с тельцами Леви, индуцированная конверсия в реальном времени (Real-Time Quaking-Induced Conversion), диагностика.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ БП – болезнь Паркинсона; ДТЛ – деменция с тельцами Леви; ИПТГ – изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид; МРТ – магнитно-резонансная томография; МСА – мультисистемная атрофия; МСА-М – мультисистемная атрофия мозжечкового типа; МСА-П – мультисистемная атрофия паркинсонического типа; ПААГ – электрофорез в полиакриламидном геле; СРЧ – синдром ригидного человека; ЦСЖ – цереброспинальная жидкость; EDTA – этилендиаминтетрауксусная кислота; FPLC – Fast Protein Liquid Chromatography (быстрая жидкостная хроматография белков); GF – Gel-filtration chromatography (гель-фильтрационная хроматография); HIC – Hydrophobic Interaction Chromatography (хроматография гидрофобного взаимодействия); IEX – Ion Exchange Chromatography (ионообменная хроматография); RT-QuIC – Real-Time Quaking-Induced Conversion (конверсия, вызванная дрожанием в реальном времени); SAA – Seed Amplification Assay (анализ амплификации семян); ThT – Thioflavin T (тиофлавин Т).

ВВЕДЕНИЕ

Синуклеинопатии представляют собой группу нейродегенеративных заболеваний, включающую болезнь Паркинсона, деменцию с тельцами Леви (ДТЛ) и мультисистемную атрофию (МСА). Ключевую роль в патогенезе этих заболеваний играет агрегация неправильно свернутого белка α -синуклеина в нейронах и/или глиальных клетках: установлено, что α -синуклеин с aberrантной конформацией обладает способностью трансинаптически распространяться по центральной нервной системе подобно прионам [1–4].

α -Синуклеин – это пресинаптический белок массой 14 кДа, кодируемый геном SNCA, локализованным на длинном плече 4-й хромосомы в локусе 4q21–22. Экспрессия α -синуклеина преимущественно наблюдается в черной субстанции среднего мозга, неокортексе и гиппокампе [5]. Физиологические уровни α -синуклеина необходимы для нормальной работы митохондрий, высвобождения нейротрансмиттеров и поддержания морфологической целостности клеток. Сверхэкспрессия α -синуклеина и изменения его агрегационных свойств приводят к митохондриальной дисфункции, нейровоспалению и нарушению синаптического высвобождения дофамина и других нейротрансмиттеров, что приводит к гибели нейронов [6, 7]. Отличительной особенностью семейства синуклеинов является их склонность к образованию агрегатов. В нативной форме α -синуклеин представляет собой неструктурированный, мономерный растворимый белок. При патологических состояниях он образует β -складчатые олигомеры (протофибриллы), которые впослед-

ствии трансформируются в амилоидные фибриллы и откладываются в нейронах в форме телец и нейритов Леви, а также других включений [8–10]. Предполагается, что механизм роста агрегатов α -синуклеина в каждом случае основан на затравочной полимеризации. При болезни Паркинсона и ДТЛ наблюдается трансинаптическое распространение aberrантных молекул от нейрона к нейрону, в то время как при МСА происходит их накопление и передача в клетках глиальной природы [11].

До настоящего времени не существует какой-либо общепринятой референсной технологии детекции агрегатов α -синуклеина в нервной системе, а известные методы иммуногистохимического определения α -синуклеина в биопсийном материале периферических тканей (кожи, слюнных желез и т.д.) сложны и весьма затратны [12], что затрудняет их массовое применение в клинической практике. Между тем, внедрение новых высокочувствительных методов определения патологических форм α -синуклеина и других церебральных белков имеет ключевое значение для совершенствования диагностики (в том числе на продромальной стадии болезни) и своевременной терапии нейродегенеративных заболеваний. Так, большое внимание привлекает метод амплификации белков на основе нуклеации (seed amplification assay, SAA), изначально разработанный для прионных болезней и позволяющий объективизировать цепную реакцию мисфолдинга белков при наличии в реакционной среде патологических белковых конформеров из биообразцов пациента. Применение прионной

гипотезы к α -синуклеину при болезни Паркинсона, МСА и ДТЛ позволило начать исследовать возможности метода SAA в обнаружении патологических конформеров α -синуклеина в различных тканях и жидкостях организма, таких как кожа, обонятельная слизистая оболочка, цереброспинальная жидкость, кровь [12, 13].

Современной разновидностью SAA является технология конверсии, индуцированной встряхиванием, в реальном времени (*Real-Time Quaking-Induced Conversion, RT-QuIC*) [14, 15]. В данной технологии в качестве субстрата используется рекомбинантный белок, в то время как биологический материал пациента служит «затравкой» для выявления мисфолдинга белков. RT-QuIC основан на способности патологической формы α -синуклеина индуцировать конформационные изменения нормального мономерного α -синуклеина, приводящие к образованию белковых агрегатов с неправильной укладкой. Принцип метода заключается в создании искусственных условий для «затравочной» амплификации α -синуклеина путем чередования циклов инкубации и интенсивного встряхивания, что способствует дополнительной фрагментации образовавшихся агрегатов и увеличению образования протофибрилл. Для детекции процесса агрегации α -синуклеина используется флуоресцентный краситель тиофлавин Т (ThT), который встраивается в агрегаты во время полимеризации, что приводит к увеличению флуоресценции с течением времени [14, 16]. Следует отметить, что чистота используемого субстрата – мономерного растворимого α -синуклеина – критически важна для обеспечения достоверности и воспроизводимости результатов, а также предотвращения ложноположительных реакций [17, 18].

Цель данной работы состояла в совершенствовании диагностической системы нейродегенеративных заболеваний из разряда синуклеинопатий, основанной на методе RT-QuIC, и в этой связи разработка метода очистки рекомбинантного мономерного α -синуклеина дикого типа особой чистоты для его дальнейшего применения в качестве субстрата в методе RT-QuIC.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Экспрессия рекомбинантного α -синуклеина в клетках *Escherichia coli*

Плаزمида pET33b+, содержащая последовательность гена α -синуклеина человека, была трансформирована в клетки *E. coli* One Shot BL21 (DE3) Star (Thermo Fisher Scientific, США). Клетки культивировали в 500 мл бактериальной среды LB, содержащей канамицин в концентрации 50 мкг/мл и глюкозу

в концентрации 0.1%, при постоянном перемешивании со скоростью 200 об/мин. Культуру выращивали до достижения значения оптической плотности 0.6 при длине волны 600 нм ($OD_{600} = 0.6$). Экспрессию целевого белка индуцировали, добавляя ИПТГ (изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид) до конечной концентрации 1 мМ, с последующей инкубацией клеток в течение 4 ч при температуре 37°C и интенсивном перемешивании. По завершении периода экспрессии клетки осаждали центрифугированием при 4000 *g* в течение 15 мин.

Периплазматический лизис

После центрифугирования клеточный осадок, полученный из 300 мл культуральной среды, ресуспендировали в 60 мл буфера для осмотического шока (30 мМ Трис, 40% сахарозы и 2 мМ EDTA pH 7.2) и инкубировали при комнатной температуре в течение 10 мин. Затем суспензию центрифугировали при 18000 *g* в течение 20 мин, после чего супернатант отделяли, а осадок ресуспендировали в 50 мл ледяной воды (dH_2O) с добавлением 20 мкл насыщенного раствора $MgCl_2$. Полученную суспензию выдерживали на льду в течение 3 мин перед последующим центрифугированием при 18000 *g* в течение 20 мин. Супернатант подвергали диализу в течение ночи против буферного раствора, содержащего 10 мМ Трис и 1 мМ EDTA (pH 7.2), при температуре 4°C.

Ионообменная хроматография

Ионообменную хроматографию (IEX) проводили с применением колонки C 10/10 Column (Cytiva, США), заполненной сорбентом Q Sepharose Fast Flow (Cytiva, США), с использованием системы быстрой жидкостной хроматографии белков (FPLC) BioLab 30 (Jiangsu Hanbon Science and Technology Co., Ltd, Китай). Перед нанесением образца белка колонку уравнивали буфером IEX A (10 мМ Трис pH 7.2). Перед проведением хроматографии все буферные растворы и образцы белка были подвергнуты дегазации и фильтрации через мембранный фильтр с диаметром пор 0.22 мкм. Элюцию проводили линейным градиентом, соответствующим 7 объемам колонки, с использованием буферов IEX A (10 мМ Трис pH 7.2) и IEX B (10 мМ Трис и 0.15 М $(NH_4)_2SO_4$ pH 7.2), после чего проводили финальную промывку колонки 100% буфером IEX B. Оптическую плотность элюата контролировали при длине волны 280 нм. Для определения времени десорбции α -синуклеина с хроматографической колонки полученные фракции собирали и анализировали методом электрофореза в 13% полиакриламидном геле в денатурирующих условиях (ПААГ)

с последующим окрашиванием Кумасси бриллиантовым синим. Фракции, содержащие белковые полосы, соответствующие молекулярной массе мономерного α -синуклеина, объединяли и диализовали в течение ночи против 20 мМ буферного раствора Трис, pH 7.0, и 0.15 мМ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Хроматография гидрофобного взаимодействия

Хроматография гидрофобного взаимодействия (HIC) была выполнена с использованием колонки C 10/10 Column (Cytiva), заполненной сорбентом Phenyl Sepharose High Performance (Cytiva). Перед нанесением образца белка колонка была уравновешена буфером HIC A (50 мМ бис-Трис и 1 М $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ pH 7.0). Концентрацию соли в образцах доводили до 1 М, постепенно добавляя $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ при перемешивании смеси при комнатной температуре; pH образца доводили до 7.0. Далее образец наносили на хроматографическую колонку и элюировали линейным градиентом, соответствующим 7 объемам колонки, с использованием буферов HIC A (50 мМ бис-Трис и 1 М $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ pH 7.0) и HIC B (50 мМ бис-Трис pH 7.0), после чего проводили финальную промывку колонки 100% буфером HIC B. Фракции, содержащие α -синуклеин, объединяли и подвергали диализу против 20 мМ буферного раствора Трис (pH 7.2) в течение ночи при температуре 4°C. Полученный раствор белка концентрировали в центробежных концентраторах с лимитом пропускания 5000 Да до концентрации 1.0–1.5 мг/мл и замораживали при -80°C до проведения дальнейших экспериментов.

Гель-фильтрационная хроматография

Гель-фильтрационную хроматографию (GF) выполняли с использованием колонки Superose 12 10/30 FPLC Column (GE Pharmacia, США). Перед нанесением белка колонку уравновешивали буфером (20 мМ Трис pH 7.2). На колонку наносили 500 мкл предварительно сконцентрированного образца со скоростью 1 мл/мин. Хроматографические фракции анализировали в 13% ПААГ в денатурирующих условиях с последующим окрашиванием Кумасси бриллиантовым синим. Изображение геля анализировали с помощью Image Lab Touch Software для денситометрического определения чистоты белка. Полученный рекомбинантный белок α -синуклеина аликвотировали до желаемого объема и хранили при температуре -80°C до проведения реакции RT-QuIC.

Взятие и пробоподготовка образцов

Для проведения пилотных исследований с применением технологии RT-QuIC были отобраны образцы

цереброспинальной жидкости (ЦСЖ) ($n = 3$) у пациентов в возрасте 58–69 лет с МСА (мозжечковый тип), ДТЛ и (в качестве контрольного образца) синдромом ригидного человека. Диагнозы были поставлены на основе данных анамнеза, клинического обследования, а также результатов специальных лабораторно-инструментальных тестов, включая высокопольную МРТ (3 Тл) в соответствующих исследовательских режимах. Все пациенты дали письменное согласие на обследование. Исследование было одобрено локальным этическим комитетом ФГБНУ «Научный центр неврологии» (протокол № 71/24). Люмбальную пункцию проводили утром, натощак. ЦСЖ отбирали стерильным способом в полипропиленовую пробирку, центрифугировали, аликвотировали по 500 мкл, подвергали быстрой заморозке, хранили при температуре -80°C.

RT-QuIC

Реакции RT-QuIC проводили в черных 96-луночных планшетах с непрозрачным дном. В каждую лунку были добавлены 37 ± 3 мг стеклянных шариков (600–800 мкм), реакционный буфер (100 мМ фосфатный буфер pH 8.2, 10 мкМ ThT), содержащий синтезированный рекомбинантный α -синуклеин в конечной концентрации 0.1 мг/мл, и образцы неразбавленной ЦСЖ. Планшет запечатывали клейкой пленкой и помещали в мультимодальный планшетный ридер ClarioStar (BMG Labtech). Образцы инкубировали при температуре 37°C в течение 125 ч с прерывистыми циклами встряхивания. Кинетику образования фибрилл визуализировали по накоплению флуоресценции ThT в режиме реального времени каждые 60 мин, при длине волны 450/480 нм. Измерения останавливали, когда сигналы флуоресценции ThT выходили на плато. Каждый образец анализировали в трех повторах.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Первым этапом хроматографической очистки рекомбинантного α -синуклеина была ионообменная хроматография. Для оценки чистоты и эффективности разделения белковых фракций, полученных в ходе хроматографии, применяли электрофоретический анализ в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия с последующим окрашиванием геля красителем Кумасси бриллиантовым синим. Анализ фракций позволил установить профиль элюции α -синуклеина с хроматографической колонки. Главная фракция, содержащая α -синуклеин, выделена цветом на хроматограмме (рис. 1А). Результаты электрофоретического анализа (рис. 1А, вставка) свидетельствуют о том, что элюция белка начиналась при достижении 60%

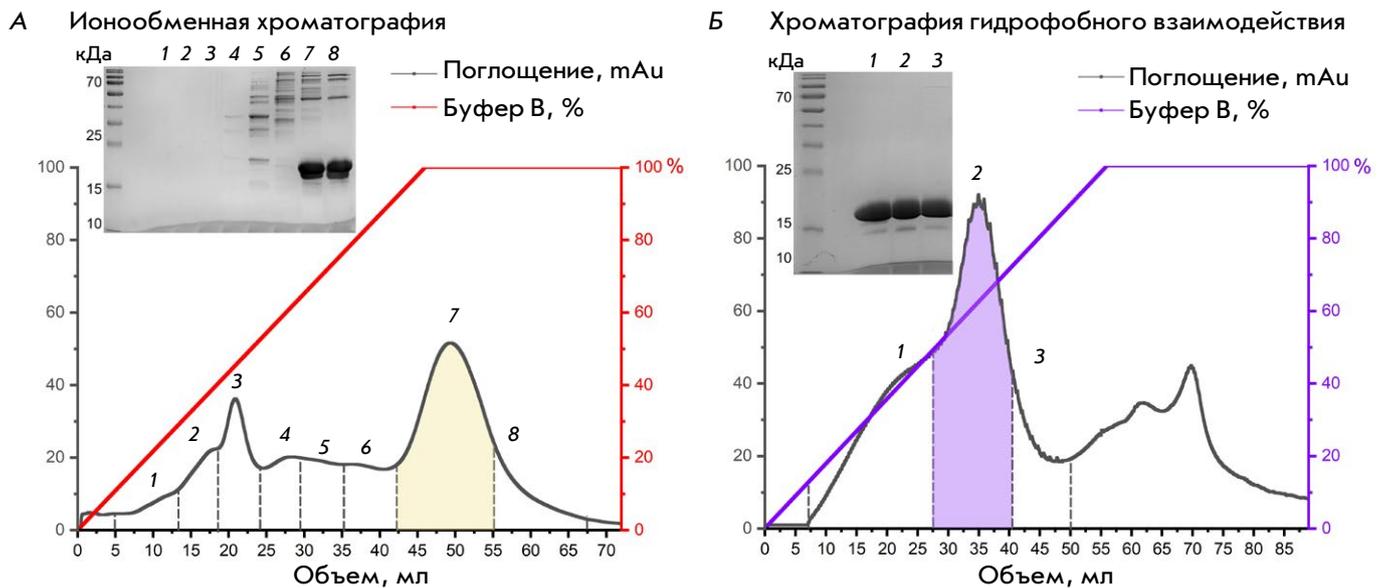


Рис. 1. А – ионообменная хроматография образцов после периплазматического лизиса. Пик, выделенный цветом, соответствует фракции, содержащей наибольшее количество α -синуклеина. На вставке вверху слева показаны результаты электрофореза белковых фракций после ионообменной хроматографии. Б – гидрофобная хроматография образцов после ионообменной хроматографии (mAu – единица оптической плотности). Пик, выделенный цветом, соответствует фракции, содержащей основное количество α -синуклеина. На вставке вверху слева показаны результаты электрофореза белковых фракций после хроматографии гидрофобного взаимодействия. Масса целевого белка соответствует 19 кДа (кажущаяся масса). Номера пиков на хроматографических профилях соответствуют номерам проб на ПААГ

концентрации буферного раствора ИЕХ В в элюенте с поправкой на объем колонки. Дальнейшее повышение концентрации буфера ИЕХ В до 80% привело к полной элюции α -синуклеина. Фракции 7–8, содержащие α -синуклеин, объединяли и использовали на дальнейших этапах очистки белка.

Препарат α -синуклеина, выделенного из периплазмы, содержит белковые примеси, поэтому для получения гомогенного продукта требуется дополнительная стадия очистки. С этой целью добавляли этап гидрофобной хроматографии. Анализ хроматографического профиля элюции α -синуклеина показал, что десорбция целевого белка с гидрофобного сорбента начиналась при достижении доли буферного раствора ИС В в составе подвижной фазы 15% и продолжалась до 65%. Фракция, содержащая наибольшее количество α -синуклеина, выделена цветом на хроматограмме (рис. 1Б). Эффективность очистки белкового препарата методом гидрофобной хроматографии оценивали при помощи электрофоретического анализа (рис. 1Б, вставка). Результаты ПААГ подтвердили удаление основных примесных белков после стадии гидрофобной хроматографии.

Для отделения от возможных ковалентных и нековалентных димеров была проведена заключительная очистка α -синуклеина с применением гель-фильтрационной хроматографии. Хроматографический профиль элюции α -синуклеина (рис. 2) свидетельствует, что время удержания белка на колонке составляло 12,5 мин. Это соответствует его ожидаемой массе в виде мономера. Дополнительные пики не содержали полипептидной составляющей и соответствовали колебаниям электропроводности, вызванным компонентами буферного раствора α -синуклеина. Электрофоретический анализ фракции 1–3 выявил дополнительные верхние полосы, тогда как четвертая фракция показала наивысшую степень чистоты по сравнению с остальными и была использована для проведения RT-QuIC.

Эксперименты по определению содержания aberrantного α -синуклеина в ЦСЖ пациентов проведены с использованием модифицированного протокола RT-QuIC [16]. В процессе анализа агрегаты патологического α -синуклеина подвергались частично денатурирующему воздействию в результате пе-

Препаративная гель-фильтрационная хроматография

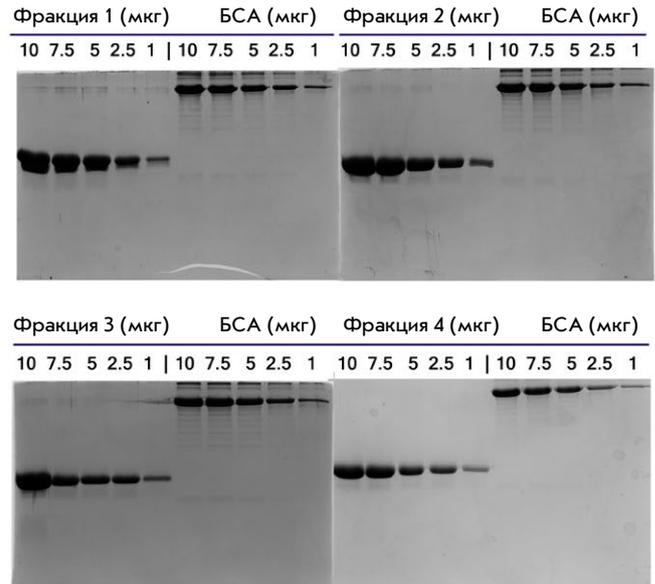
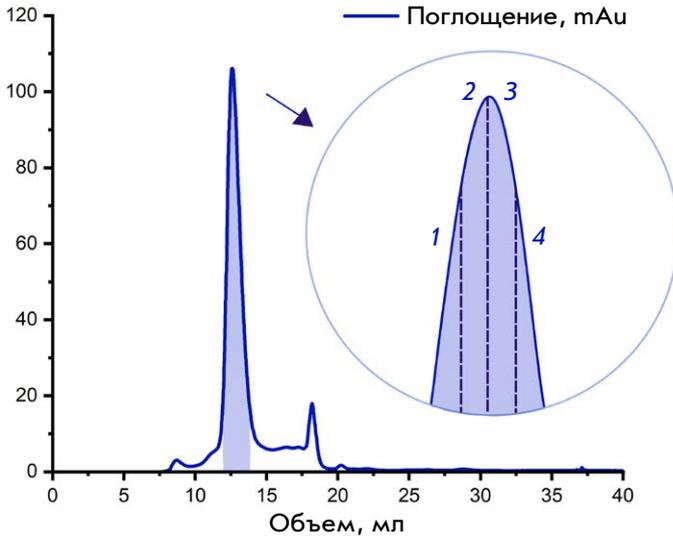


Рис. 2. Гель-фильтрационная хроматография белкового препарата α -синуклеина (mAu – единица оптической плотности). Пик, выделенный цветом, соответствует фракции, содержащей целевой белок. Справа показан денатурирующий электрофорез белковых фракций, где слева нанесена соответствующая фракция α -синуклеина в различной концентрации (10, 7.5, 5, 2.5 и 1 мкг), а справа в качестве калибратора нанесен бычий сывороточный альбумин (БСА) в тех же концентрациях. Номера фракций на хроматограмме соответствуют номерам проб на ПААГ

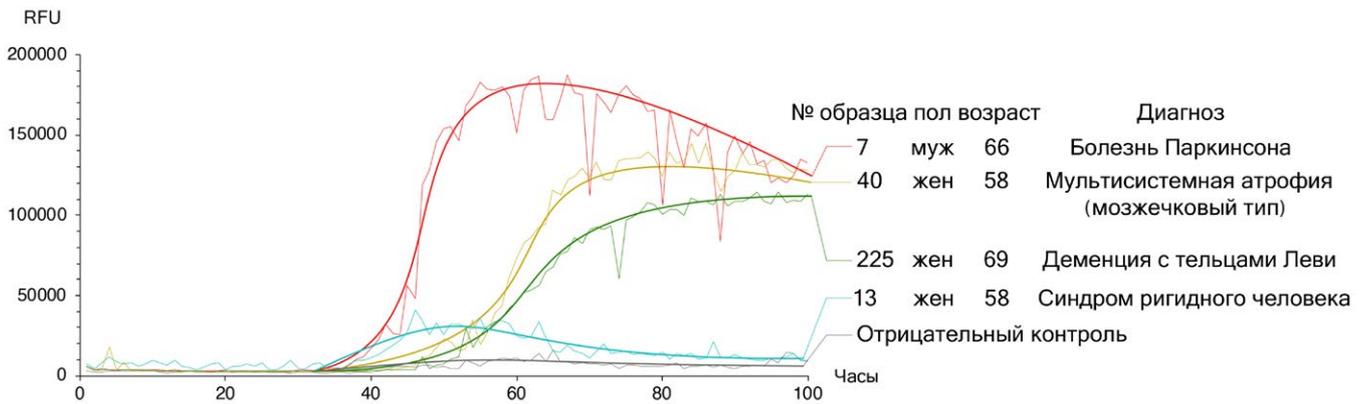


Рис. 3. Кривые амплификации патологического α -синуклеина у пациентов (RFU – относительные единицы флуоресценции). Анализ образцов от пациентов с синдромом ригидного человека (голубой), деменцией с тельцами Леви (зеленый), мультисистемной атрофией мозжечкового типа (желтый) и болезнью Паркинсона (красный)

риодического встряхивания. В условиях избытка в реакционной смеси рекомбинантного белка-мономера происходит амплификация и увеличение содержания неправильно свернутого агрегированного белка, связывающего ThT и, как следствие, рост уровня флуоресценции. Результаты приведены на рис. 3.

Образец 13 (синдром ригидного человека, СРЧ) не показал существенного увеличения флуорес-

ценции, в то время как в образцах 40 (мультисистемная атрофия, МСА) и 225 (деменция с тельцами Леви, ДТЛ) наблюдалось явное увеличение флуоресцентного сигнала в интервале 40–60 ч, достигающее значений 145000 и 120000 RFU соответственно. Образец номер 7 (болезнь Паркинсона) показал самый высокий сигнал флуоресценции 170000 RFU и самую большую скорость выхода на плато в интервале 32–45 ч. Таким образом, анализ кри-

вых RT-QuIC выявил повышение уровня флуоресценции до 120–150 тыс. RFU примерно через 75 ч наблюдения в образцах ЦСЖ от пациентов с МСА и ДТЛ и 170 тыс. RFU для БП через 55 ч наблюдения соответственно. В образце ЦСЖ от пациента с СРЧ не зафиксировано увеличение флуоресценции, что свидетельствует об отсутствии aberrантного белка α -синуклеина в биоматериале. В качестве отрицательного контроля использовали аналог цереброспинальной жидкости (NaCl 100 мМ, KCl 2 мМ, CaCl₂ 1 мМ, мочевины 5 мМ, БСА 300 мкг/мл, глюкоза 2.5 мМ, NaHCO₃, pH 7.3).

ОБСУЖДЕНИЕ

Представленные результаты свидетельствуют о том, что полученный рекомбинантный мономерный α -синуклеин является оптимальным субстратом для применения в технологии RT-QuIC. Ранее показали, что разнообразие методов очистки и составов буферов для экстракции может значительно влиять на конформацию, стабильность и агрегационное поведение α -синуклеина, что, в свою очередь, существенно осложняет интерпретацию результатов анализа [17, 18]. Кроме того, актуальной является стандартизация методов производства и очистки рекомбинантного α -синуклеина для его использования в диагностических целях. Последовательное сочетание методов ионообменной и гидрофобной хроматографии позволило нам получить высокоочищенный препарат целевого белка (более 97%), соответствующего рекомбинантному мономерному α -синуклеину, который может с успехом использоваться в дальнейших функциональных тестах. Подобная высокая чистота и однородность препаратов α -синуклеина являются ключевым фактором поддержания воспроизводимости результатов лабораторной диагностики синуклеинопатий. В будущем это позволит обеспечить большую надежность данных RT-QuIC и будет способствовать трансляции результатов, полученных в лабораторных условиях, в клинику.

Диагностика синуклеинопатий представляет собой сложную задачу, требующую высокой точности. В рамках нашего пилотного исследования с использованием метода RT-QuIC проанализированы образцы от пациентов с ДТЛ, а также с МСА мозжечкового типа (МСА-М), находящихся на стадии средней степени тяжести с нарушением когнитивного статуса. В качестве отрицательного контроля использовали образцы, полученные от пациентов с синдромом ригидного человека. Следует отметить, что МСА может быть диагностирована с 100% вероятностью только посмертно из-за пересечения клинической картины с проявлениями других синуклеинопатий.

Это редкое и быстро прогрессирующее нейродегенеративное заболевание делится на два основных подтипа: паркинсонический (МСА-П) и мозжечковый (МСА-М). Клинические проявления МСА-П включают симптомы, характерные для классического паркинсонизма, в то время как МСА-М характеризуется мозжечковой атаксией. Аналогично, диагностика ДТЛ осложняется смешением симптомов. ДТЛ часто ошибочно воспринимается за болезнь Альцгеймера из-за схожести клинических проявлений, при этом единственным надежным диагностическим маркером является наличие aberrантной формы α -синуклеина у пациента.

Результаты нашего исследования свидетельствуют, что начало значимой агрегации синуклеина начинается через 50 ч после смешивания образцов ЦСЖ и компонентов реакционной смеси. В то же время в аналогичных исследованиях подъем кривых агрегации начинался приблизительно после 12 ч инкубации [19]. Скорость агрегации α -синуклеина может зависеть от множества факторов и очевидно, что наиболее критический из них – это степень очистки. Олигомеры, от которых не удалось избавиться в процессе выделения рекомбинантного белка, могут индуцировать агрегацию наравне с вносимыми в реакционную смесь природными патологическими вариантами. С одной стороны, более высокая степень очистки нашего препарата α -синуклеина увеличивает время анализа, с другой стороны, уменьшает фоновый сигнал и позволяет проводить более длительную инкубацию для уверенной детекции таких синуклеинопатий, как МСА со слабо выраженной активностью в тесте RT-QuIC [19].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Раннее обнаружение aberrантных белков, которые участвуют в реализации механизмов нейротоксичности/нейровоспаления и циркулируют в системном кровотоке и ЦСЖ, признается сегодня одной из наиболее «горячих» точек нейронауки [20]. Серия пилотных исследований по определению уровня патологических агрегатов методом RT-QuIC в ЦСЖ пациентов с синуклеинопатиями с использованием особо чистого рекомбинантного α -синуклеина продемонстрировала большой потенциал этой методики в контексте развития лабораторной нейродиагностики. Дальнейшее развитие исследований будет посвящено разработке стандартизированного метода детекции патологических форм α -синуклеина, который должен быть информативным, высокочувствительным, специфичным, воспроизводимым и при этом простым в использовании для его последующего внедрения в клиническую практику. ●

Данная работа выполнена при поддержке гранта Минобрнауки России на проведение крупных научных проектов по приоритетным направлениям научно-технологического развития, соглашение № 075-15-2024-638.

Авторы выражают благодарность за предоставление плазмиды, кодирующей α -синуклеин, В.И. Муронцу (НИИ ФХБ имени А.Н. Белозерского, отдел биохимии животной клетки).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gai W.P., Pountney D.L., Power J.H.T., Li Q.X., Culvenor J.G., McLean C.A., Jensen P.H., Blumbergs P.C. // *Exp. Neurol.* 2003. V. 181. № 1. P. 68–78. doi: 10.1016/s0014-4886(03)00004-9.
2. Spillantini M.G., Schmidt M.L., Lee V.M.-Y., Trojanowski J.Q., Jakes R., Goedert M. // *Nature.* 1997. V. 388. № 6645. P. 839–840. doi: 10.1038/42166.
3. Tong J., Wong H., Guttman M., Ang L.C., Forno L.S., Shimadzu M., Rajput A.H., Muenter M.D., Kish S.J., Hornykiewicz O., et al. // *Brain.* 2010. V. 133. № 1. P. 172–188. doi: 10.1093/brain/awp282.
4. Ma J., Gao J., Wang J., Xie A. // *Front. Neurosci.* 2019. V. 13. P. 552. doi: 10.3389/fnins.2019.00552.
5. Goedert M. // *Science.* 2015. V. 349. № 6248. P. 1255555. doi: 10.1126/science.1255555.
6. Call T., Ottolini D., Negro A., Brini M. // *J. Biol. Chem.* 2012. V. 287. № 22. P. 1791417929. doi: 10.1074/jbc.M111.302794.
7. Longhena F., Faustini G., Missale C., Pizzi M., Spano P., Bellucci A. // *Neural Plast.* 2017. V. 2017. P. 5012129. doi: 10.1155/2017/5012129.
8. Eliezer D., Kutluay E., Bussell R., Browne G. // *J. Mol. Biol.* 2001. V. 307. № 4. P. 10611073. doi: 10.1006/jmbi.2001.4538.
9. Winner B., Jappelli R., Maji S.K., Desplats P.A., Boyer L., Aigner S., Hetzer C., Loher T., Vilar M., Campioni S., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2011. V. 108. № 10. P. 4194–4199. doi: 10.1073/pnas.1100976108.
10. Housmans J.A.J., Wu G., Schymkowitz J., Rousseau F. // *FEBS J.* 2023. V. 290. № 3. P. 554–583. doi: 10.1111/febs.16312.
11. Karpowicz R.J., Trojanowski J.Q., Lee V.M.-Y. // *Lab. Invest.* 2019. V. 99. № 7. P. 971981. doi: 10.1038/s41374-019-0195-z.
12. Rhoads D.D., Wrona A., Foutz A., Blevins J., Glisic K., Person M., Maddox R.A., Belay E.D., Schonberger L.B., Tatsuoka C., et al. // *Neurology.* 2020. V. 95. № 8. P. e1017–e1026. doi: 10.1212/WNL.00000000000010086.
13. Srivastava A., Alam P., Caughey B. // *Biomolecules.* 2022. V. 12. № 4. P. 576. doi: 10.3390/biom12040576.
14. Candelise N., Schmitz M., Thune K., Cramm M., Rabano A., Zafar S., Stoops E., Vanderstichele H., Villar-Pique A., Llorens F., et al. // *Transl. Neurodegener.* 2020. V. 9. № 1. P. 5. doi: 10.1186/s40035-019-0181-9.
15. Vascellari S., Orru C.D., Caughey B. // *Front. Aging Neurosci.* 2022. V. 14. P. 853050. doi: 10.3389/fnagi.2022.853050.
16. Okuzumi A., Hatano T., Fukuhara T., Ueno S., Nukina N., Imai Y., Hattori N. // *Methods Mol. Biol.* 2021. V. 2322. P. 3–16. doi: 10.1007/978-1-0716-1495-2_1.
17. Stephens A.D., Matak-Vinkovic D., Fernandez-Villegas A., Kaminski Schierle G.S. // *Biochemistry.* 2020. V. 59. № 48. P. 4563–4572. doi: 10.1021/acs.biochem.0c00725. doi: 10.3390/biom12020324.
18. Al-Azzani M., Konig A., Outeiro T.F. // *Biomolecules.* 2022. V. 12. № 2. P. 324. doi: 10.3390/biom12020324.
19. Rossi M., Candelise N., Baiardi S., Capellari S., Giannini G., Orru C.D., Antelmi E., Mammana A., Hughson A.G., Calandra-Buonaura G., et al. // *Acta Neuropathol. (Berl.)* 2020. V. 140. № 1. P. 49–62. doi: 10.1007/s00401-020-02170-6.
20. Morris H.R., Lees A.J. // *JAMA Neurol.* 2024. V. 81. № 9. P. 905–906. doi: 10.1001/jamaneurol.2024.2381.