



突变和修饰 β 淀粉样蛋白与阿尔茨海默病

郝秀萍* 武林芝

(太原学院材料与化学工程系, 太原 030032)

摘要 淀粉样蛋白级联假说是阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 病因学的核心, 但在过去几年中, 靶向淀粉样斑块并未实现成功的免疫治疗。最近几年, 不同形式的 β 淀粉样蛋白 ($A\beta$) 引起人们的关注。本文总结了关于早发性AD患者大脑中不同 $A\beta$ 突变体和散发性AD患者大脑中已经鉴定出的经过酶切及修饰产生的不同形式 $A\beta$ 的研究进展, 重点阐述了这些 $A\beta$ 的聚集特性和在AD发展中的影响, 并对目前报道的 $A\beta$ 变体检测分析方法进行了概述。本文旨在为今后深入研究不同形式的 $A\beta$ 及相关分子在AD病理过程中的作用、开发诊断和治疗AD新方法提供参考。

关键词 阿尔茨海默病, 突变 $A\beta$, 修饰 $A\beta$, 聚集特性, 病理特性, 检测方法

中图分类号 Q4, R338

DOI: 10.16476/j.pibb.2021.0242

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是痴呆症的主要类型, 是一种渐进性脑部疾病, 它逐渐破坏人的记忆和思维能力, 最终导致日常行为能力的丧失。在影响病人生活质量的同时, 还带来源源不断的社会问题, 是目前最受关注的神经和精神疾病之一^[1]。AD的两大病理特征包括由tau蛋白形成的细胞内神经原纤维缠结和由 β 淀粉样蛋白 ($A\beta$) 形成的细胞外老年斑^[2-3]。人们认为 $A\beta$ 的错误积累在AD的病理学中起着核心作用^[4]。以 $A\beta$ 为靶标的疗法主要针对的是单体或寡聚体的 $A\beta$ 40 和 $A\beta$ 42, 但以 $A\beta$ 40 和 $A\beta$ 42 为靶标的临床治疗结果并不理想, 人们对此进行了分析并提出了多靶标策略^[5]。淀粉样前体蛋白 (amyloid precursor protein, APP) 的水解加工过程会产生一系列不同长度的截短 $A\beta$ 种类。此外, $A\beta$ 肽还会受到广泛的翻译后修饰。虽然大多数AD病例是散发性的, 但已经确定了许多家族性阿尔茨海默病 (familial AD) 和相关的脑淀粉样血管病会导致AD的早发和严重程度的增加, 许多FAD的 $A\beta$ 会发生单个氨基酸突变。大量的研究表明, 这些突变 $A\beta$ 、截短 $A\beta$ 、被修饰的 $A\beta$ 会加快聚集动力学, 改变聚集体构象, 并具有更高的细胞毒性。这些 $A\beta$ 种类可能破坏了脑内稳态并加速了AD神经变性。我们调查了大量的文献, 对这些 $A\beta$ 种类的聚集特性及在AD发展过程中可能产生的影响进行分类总结, 并

评述了检测分析这些 $A\beta$ 种类的方法。

1 $A\beta$ 变体

大多数AD病例是散发的, 但一小部分称为FAD的AD病例与早老素1、早老素2或APP的突变有关。根据这些FAD首次发现的地域, 分别命名为英国型 (English, H6R)、日本鸟取型 (Tottori, D7N)、佛兰德型 (Flemish, A21G)、大阪型 (Osaka, E22 Δ)、荷兰型 (Dutch, E22Q)、意大利型 (Italian, E22K)、北极型 (Arctic, E22G)、爱荷华型 (Iowa, D23N)、皮尔蒙特型 (Piedmont, L34V) 等。位于淀粉样蛋白序列内部的APP突变会导致多种疾病表型, 包括早发性痴呆、脑淀粉样血管病、出血性中风等。这些氨基酸取代改变了 $A\beta$ 的产生量, 增加了 $A\beta$ 42 与 $A\beta$ 40 的比率, 改变了突变 $A\beta$ 变体的聚集潜力, 有的还促进了有毒聚集体的形成。表1列出了不同 $A\beta$ 变体肽的聚集特性及其影响。

1.1 突变 $A\beta$ 肽的影响及相应临床表现

A2T突变是一种保护性的突变, A2T突变能减少 β 分泌酶1 (BACE1) 对APP的裂解。体外研究

* 通讯联系人。

Tel: 18322694344, E-mail: haoxiuping0128@163.com

收稿日期: 2021-08-18, 接受日期: 2021-11-09

表明, 它使淀粉样蛋白聚集物的形成减少约40%, 可以预防AD和老年人的认知能力下降^[6], 但A β 42A2T肽的体外细胞毒性高于野生型A β 42, 并且在聚集的早期与模型膜相互作用^[7]。A2V变异在纯合子个体中是致病的, 杂合子的亲属没有受到影响, 隐性A2V突变能增加A β 的产生^[8], A2V A β 的沉积物很大, 主要存在血管周围, 在影响小脑的同时会减少新纹状体^[9]。English (H6R) A β 的细胞毒性更强^[10], H6R突变导致His6结构域不能参与锌离子的螯合, 而由(EVHH14)-E-11片段配位的锌离子能促进其形成稳定的二聚体^[11]。

人们在一个可能患AD的日本家系中, 发现了D7N错义突变^[12]。A β D7N突变增强了寡聚体的细胞毒性^[10]。Chen等^[13]在一个具有早发性AD的台湾家庭中, 鉴别出了位于A β 序列内的新型APP突变——D7H, 这种突变增加了A β 的产生, 提高了A β 42/A β 40的比率, 具有更高的神经毒性。由于D7H突变型A β 具有一个额外的金属离子配位残基组氨酸, 它与Zn²⁺/Cu²⁺具有更高的亲和力, 这可能促使A β D7H具有高致病性。BACE1酶是A β 产生过程中一种非常重要的切割酶, 它有两个切割位点, β 位点(1号位点)和 β' 位点(11号位点), E11K突变使得BACE1切割位点移向了 β 位, 导致A β 40和A β 42的水平含量增加了2~3倍, A β 42/A β 40的比率也略微升高。

APP 687位的赖氨酸-天冬酰胺取代(根据A β 编号称为K16N), 导致早期具有常染色体显性遗传模式的痴呆。K16N突变位于 α 分泌酶切割位点, 使得APP的分泌受到影响, 产生了更多的A β 肽。带有K16N突变的A β 肽的独特之处在于该肽本身对神经元细胞无害, 然而野生型和突变体肽的等摩尔混合物则显示出很强的毒性。此外, A β 42 K16N抑制野生型A β 42原纤维的形成。A β 42 K16N不易被主要的A β 降解酶脑啡肽酶清除^[14]。

Flemish (A β A21G) AD是在一个具有早发性痴呆和脑淀粉样血管病引起的脑出血家族中发现的遗传突变类型^[15]。与其他以脑A β 42为主的FAD病例相反, Flemish AD病人主要沉积A β 40, 而且大脑中的老年斑主要集中在血管上。Yagi-Utsumi和Dobson^[16]的研究表明, A21G突变改变了A β 40形成淀粉样蛋白原纤维的初始成核过程, 从而影响了A β 的膜结合特性。A β A21G肽被脑啡肽酶降解的速度明显比野生型A β 或任何其他突变体肽慢^[17]。A β 42 A21G和A β 42野生型都能诱导神经元细胞凋

亡, 特别是N端截短肽毒性更强^[18], 但Wang等^[19]对A β 42 A21G的体外细胞实验表明, 从细胞形态、生存力或细胞增殖来判断, A β A21G和A β 野生型对两种类型的平滑肌细胞均未引起明显的毒性。

在一个患有痴呆症及AD的日本家系中确定了A β E22 Δ , 即缺少22号谷氨酸的变体A β ^[20]。该突变显著降低了总A β 的分泌, 但变体A β 对蛋白质水解的抵抗力更高, 并且比野生型A β 更有效地抑制大鼠海马长时程增强。与无毒A β 40野生型相比, A β 40 E22 Δ 在大鼠原代神经元培养物中具有神经毒性, 而A β 42 E22 Δ 的毒性低于A β 42野生型, 但在神经元原代培养物中, 每个细胞的神经突生长明显减少^[21]。E22G是在患有AD的瑞典家庭中发现的突变类型, 这种突变的携带者显示血浆中A β 42和A β 40水平降低^[22], 聚集过程早期形成的中间物会从神经突开始引发细胞功能障碍, 从而导致神经元损伤, 并引起中度的神经胶质和炎症组织反应^[23-24]。A β E22G突变使其对脑啡肽酶具有抵抗力, 因此, A β E22G不仅可以通过促进原纤维形成, 而且可以通过延长A β 在大脑中的半衰期来致病^[25]。Bugiani等^[26]对患有淀粉样变性与A β E22K突变相关的遗传性脑出血患者的临床研究显示, 受影响的个体表现为反复发作的头痛和多发性中风, 大多数患者随后出现癫痫和认知能力下降。A β E22K突变使其对脑啡肽酶也具有抵抗力^[25]。在患有淀粉样变性的遗传性脑出血的荷兰患者, 即淀粉样变性-荷兰型(HCHWA-D)中, A β 22位的氨基酸发生谷氨酰胺(Q)取代谷氨酸(E), 导致了A β 在这些患者的脑血管壁中沉积, 从而导致脑出血和过早死亡^[27]。A β E22Q对脑啡肽酶也具有抵抗力^[25], A β 40 E22Q会在培养的人脑血管平滑肌细胞中诱导强大的病理反应, 包括提高APP水平和细胞死亡^[28]。在APP Dutch小鼠和HCHWA-D人脑中, A β 40与A β 42的比率显著高于APP野生型小鼠或AD人脑中的比率^[29]。野生型A β 容易从脑转运到血浆中, 但荷兰型突变体A β 不容易清除出去, 这可能导致其在脑血管系统中的大量积累^[30]。另外, A β E22Q刺激基质金属蛋白酶2(MMP-2)的表达和激活, 而MMP-2的表达和激活增加可能会导致人脑血管平滑肌(HCSM)细胞因致病性A β 而死亡^[31]。

Grabowski等^[32]报告了爱荷华州三代家庭中APP的一个新突变位点, 694位(对应于A β 的23

号)天冬氨酸被天冬酰胺取代(D23N),是常染色体显性痴呆。患者伴有进行性失语性痴呆,白质脑病和枕骨钙化,神经病理学检查发现严重的脑淀粉样血管病,广泛的神经原纤维缠结和斑块中A β 40的异常分布。研究表明,D23N突变显著增加了神经元和内皮细胞的肽毒性^[33]。

Obici等^[34]报道了一个常染色体显性遗传、复发性脑出血的家庭中A β 序列内的新型突变(L34V),病理检查发现该突变导致了严重的脑淀粉样血管病,但没有实质性淀粉样斑块或神经原纤维缠结。L34V A β 形成的寡聚体或原纤维能诱导人脑微血管内皮细胞和平滑肌细胞凋亡^[35]。

Table 1 A compilation of aggregation characteristics and effects of amyloid β mutant peptides

表1 β 淀粉样蛋白突变体肽的聚集特性及其影响

类型	突变点	聚集特性	影响	参考文献
A2T	A2T	延迟A β 的聚集;改变 β 折叠的量	减少BACE1对APP的裂解及淀粉样蛋白聚集物的形成;细胞毒性高于野生型A β	[6-7, 36]
A2V	A2V	加速A β 聚集	细胞毒性高于野生型A β ;在纯合子个体中是致病的,杂合子无影响,隐性A2V突变能增加A β 的产生;形成的沉积物很大,影响小脑的同时会减少新纹状体	[7-9, 36]
English	H6R	聚集动力学加快;生成尺寸更大的寡聚体,具有有效的成核能力	细胞毒性更强,导致早发性FAD	[10-11, 37]
Tottori	D7N	促进原纤维形成,具有更高的成核效率	增强了寡聚体的细胞毒性	[10, 12, 37-38]
D7H	D7H	延长了A β 42的寡聚体状态	增加了A β 的产生,提高了A β 42/A β 40的比率;具有更高的神经毒性;与Zn ²⁺ /Cu ²⁺ 具有更高的亲和力	[13]
E11K	E11K	与野生型未见明显差异	A β 的水平含量增加了2~3倍,A β 42/A β 40的比率也略微升高	[39]
K16N	K16N		早发性痴呆;增加了A β 的生成量;与野生型A β 混合后显示很强的细胞毒性;不易被A β 降解酶清除	[14]
Flemish	A21G	促进淀粉样蛋白原纤维形成过程中各种二级结构之间的相互转化;降低了原纤维的延伸速率	主要沉积A β 40,老年斑集中在血管上;被脑啡肽酶降解的速度慢;细胞毒性不明确	[15-19, 40-41]
Osaka	E22 Δ	具有异常的 β 折叠形成倾向,能更快地形成寡聚体和原纤维,并且原纤维的稳定性有所增加;A β 40 E22 Δ 具有成核能力,A β 42 E22 Δ 对野生型A β 具有很弱的成核能力	显著降低了总A β 的分泌,但变体A β 对蛋白水解的抵抗力更高;具有神经毒性	[20-21, 42-45]
Dutch	E22Q	比野生型A β 聚集更快	导致脑出血和过早死亡;对蛋白水解酶的降解具有抵抗力;诱导人脑血管平滑肌细胞发生病理反应;提高A β 40与A β 42的比率;刺激基质金属蛋白酶2(MMP-2)的表达和激活,导致人脑血管平滑肌细胞因致病性A β 而死亡	[25, 27-31, 46]
Italian	E22K	E22K A β 42低聚物和原纤维显示出反向平行的 β 折叠结构	受影响的个体表现为反复发作的头痛和多发性中风,大多数患者随后出现癫痫和认知能力下降;对脑啡肽酶具有抵抗力	[25-26, 47]
Arctic	E22G	形成原纤维的速率和数量比野生型A β 高	血浆中A β 42和A β 40水平降低;聚集体导致神经元损伤,并引起中度的神经胶质和炎症组织反应;对脑啡肽酶具有抵抗力	[22-25]
Iowa	D23N	形成原纤维的速度比野生型肽快;形成的原纤维呈多种形态,呈反平行 β 折叠结构	常染色体显性痴呆,引起严重的脑淀粉样血管病,广泛的神经原纤维缠结和斑块中A β 40的异常分布	[32-33, 48-49]
Piedmont	L34V		导致严重的脑淀粉样血管病,但没有实质性淀粉样斑块或神经原纤维缠结;形成的寡聚体或原纤维能诱导人脑微血管内皮细胞和平滑肌细胞凋亡	[34, 39]

1.2 突变 $A\beta$ 肽的聚集特性

A2T 突变是一种保护性的突变, 能够延迟 $A\beta$ 肽的聚集^[36], 显著改变 β 发夹的量并打破其转变为其他结构的平衡^[7], 而 A2V 突变会加速 $A\beta$ 肽的聚集, 使其更快地演变为 β 折叠构象^[7, 36]。H6R 突变能在淀粉样原纤维形成的延伸阶段促进原纤维的形成^[37], H6R 突变 $A\beta$ 加快了聚集动力学, 使得 $A\beta$ 的二级结构更快地由无规则卷曲结构转变为 β 折叠结构, 并生成尺寸更大的寡聚体, 这些寡聚体具有有效的成核能力。D7N 突变体能在淀粉样原纤维形成的延伸阶段促进原纤维的形成^[37], 并且具有更高的成核效率^[38]。E11K $A\beta$ 与野生型 $A\beta$ 的聚集动力学、聚集体形态及细胞毒性未见明显差异^[39]。

A21G 突变可以增加 $A\beta$ 的分泌, 并改变其结构^[40], 促进富含 β 折叠的淀粉样蛋白原纤维形成过程中各种二级结构之间的相互转化^[41]。Betts 等^[17] 的研究表明, A21G 突变降低了原纤维的延伸速率。E22 Δ $A\beta$ 表现出增强的寡聚特性但没有原纤维化的聚集特性^[20], Inayathullah 和 Teplow^[42] 对 E22 Δ $A\beta$ 40 和 E22 Δ $A\beta$ 42 的研究结果阐明了这些突变体肽的构象动力学、原纤维形成动力学、原纤维形态和原纤维稳定性, 表明两种 E22 Δ $A\beta$ 肽均具有异常的 β 折叠形成倾向, 能更快地形成寡聚体和原纤维, 并且原纤维的稳定性有所增加。此外, E22 Δ $A\beta$ 42 低聚物似乎与野生型 $A\beta$ 42 低聚物的大小、形状均不同^[43]。E22 Δ $A\beta$ 40 具有成核能力, 诱导野生型 $A\beta$ 40 形成原纤维, 这些原纤维比同源接种的 $A\beta$ 40 原纤维的稳定性差, 但是, E22 Δ $A\beta$ 42 对野生型 $A\beta$ 具有很弱的成核能力^[44-45]。E22G $A\beta$ 形成原纤维的速率和数量都比野生型 $A\beta$ 高得多^[22]。体外聚集实验表明, 野生型和 E22K $A\beta$ 均形成了以交叉 β 结构为特征的原纤维, 但具有明显不同的 β 折叠结构, 与野生型原纤维的平行 β 折叠结构相比, E22K $A\beta$ 42 低聚物和原纤维均显示出反向平行的 β 折叠结构^[47]。分子动力学模拟研究表明, E22Q $A\beta$ 比野生型 $A\beta$ 聚集更快^[46]。D23N $A\beta$ 40 形成原纤维的速度比野生型快得多, 电子显微镜显示, D23N $A\beta$ 40 形成具有多种形态的原纤维, 并且大多数原纤维呈反平行 β 折叠结构^[48-49]。

2 $A\beta$ 修饰肽

根据淀粉样蛋白级联假说, $A\beta$ 的聚集在 AD

的发展过程中起关键作用。在 FAD 患者中, $A\beta$ 的聚集是由遗传突变引起的, 但是大约 90% 的 AD 患者是散发性的, 什么原因导致了散发性 AD 患者中 $A\beta$ 的聚集, 目前还不明确。对老年斑组成的分析表明, 聚集的 $A\beta$ 以不同的方式被修饰, 主要是通过 $A\beta$ 的截短和后修饰, 其中, 截短肽包括从氨基酸残基 A2 和焦谷氨酰化 E3、F4、R5、H6、焦谷氨酰化 E11 开始的 N 端截短肽, 以及长度为 16、24、34、37~43 的 C 端截短肽。我们之前的研究总结了 $A\beta$ 截短肽的生理和病理特性^[50]。 $A\beta$ 的修饰主要包括焦谷氨酰化、天冬氨酸异构化、氧化、磷酸化、硝化、瓜氨酸化等。过多的修饰表现出致病特征, 如聚集增加、神经毒性增加、抑制海马体长时程增强的能力等。表 2 列出了不同 $A\beta$ 修饰肽的聚集特性及其影响。

2.1 $A\beta$ 修饰肽的产生与鉴定

从 3 号或 11 号谷氨酸开头的 N 端截短 $A\beta$ 肽容易发生焦谷氨酰化。从 AD 患者的神经斑和脑血管壁中, 纯化并定量了以焦谷氨酰基 ($A\beta$ pE3) 形式从 E3 残基开始的 $A\beta$ 肽, N 端截短的 $A\beta$ pE3 占神经斑块中 $A\beta$ 的 51%^[51-52]。Sullivan 等^[53] 使用特异性抗体在老年痴呆症大脑皮层的老年斑中识别到了 $A\beta$ pE3 和 $A\beta$ pE11, 并且 $A\beta$ pE11 是最内层核心的主要形式。蛋白质或肽中天冬氨酸和天冬酰胺的异构化通过在生理条件下经由琥珀酰亚胺作为中间体的非酶促反应产生 L-异天冬氨酸。已经在体内多种胞内蛋白以及神经退行性脑组织中病理沉积的蛋白中鉴定出了异天冬氨酸^[54-55]。在 7 位或 23 位异构化的 $A\beta$ 肽差异性地沉积在 AD 大脑的老年斑和血管淀粉样蛋白中。氧化应激和淀粉样斑块的形成是 AD 的两个关键标志。 $A\beta$ 中 35 位的一部分甲硫氨酸 (Met) 在 AD 大脑斑块中被氧化成甲硫氨酸亚砷 (Met(OX))。在 AD 大脑中发现了磷酸化淀粉样蛋白, 使用反义肽方法, 确定了人类细胞周期蛋白依赖性激酶 1 (CDK-1) 负责 $A\beta$ 的磷酸化^[56]。细胞外的 $A\beta$ 在细胞表面和人脑的脑脊液中被蛋白激酶磷酸化。Kumar 等^[57] 开发了新的抗体来根据 S26 的磷酸化状态特异性区分 $A\beta$ 肽, 利用新抗体, 在神经元内和脑血管中发现大量的磷酸化 $A\beta$ 。AD 的部分炎症反应是诱导型一氧化氮合酶 NOS 的上调, 导致 NO 产生增加, NO 通过诱导翻译后蛋白质修饰促进细胞信号传导。在病理条件下, 信号转导作用转变为过氧亚硝酸盐和二氧化氮

等副产物形成蛋白质酪氨酸硝化作用。A β 是NO靶标之一,其在Y10处被硝化^[58]。瓜氨酸化和脱酰胺是衰老相关的蛋白质翻译后修饰,在中性pH值下会增加A β 上的负电荷数量^[59]。在AD大脑所有已识别的蛋白质翻译后修饰类型中,乙酰化仅影响总修饰肽的约10%,但乙酰化的A β 和tau聚集体水平增加最高^[60]。A β 肽有两个潜在的乙酰化位点,K16和K28。

2.2 A β 修饰肽的聚集特性

含焦谷氨酰的肽比相应的全长A β 肽更容易形成 β 折叠结构,并且更稳定,聚集倾向更高,诱导的细胞毒性更强^[61-62]。体外实验表明,23位的异构化修饰大大增强了A β 的聚集。23位的自发异构化诱导A β 发生构象变化形成 β 转角, β 转角结构在A β 肽的聚集和神经毒性中起着至关重要的作用^[63-64]。Met35侧链氧化成Met35(OX)显著阻碍了生理pH下A β 42的原纤维形成的速率,减少了两种主要形式的A β 产生的纤维总量,Met35(OX)还可以改变A β 原纤维的形态并阻止原纤维的形成。甲硫氨酸氧化的A β 40和A β 42的纤维形态发生了明显的变化,纤维长度明显减少^[65]。也有研究显示Met(OX)的存在减少了A β 40纤维形成的滞后时间,但延长了A β 42的滞后时间^[66]。8号丝氨酸残基的磷酸化促进了寡聚A β 组装体的形成^[67]。Jamasbi等^[68]研究了磷酸化A β 42合成肽的二级结构、聚集特性以及与初级皮层神经元质膜的相互作用,结果表明在合成脂质环境中,磷酸化A β 42增加了 β 折叠形成,能快速形成聚集体。A β 的硝化加速了其聚集,并在APP/PS1小鼠和AD大脑的A β 斑块核心中检测到硝化A β ^[58]。也有研究表明,酪氨酸硝化显著降低了A β 40的聚集^[69]。这种积极作用可能是由于在生理pH值下硝化引起带负电荷的Y10与E11和H6或H13之间的盐桥相互作用并阻断Y10周围的扭结,从而防止A β 纤维化和聚集^[70]。Osaki等^[59]研究了瓜氨酸化和脱酰胺对A β 纤维化特性的影响,结果表明A β 40的R5 $\rightarrow$ Cit修饰不影响原纤维化率,并形成与A β 40原纤维不同的 β 折叠结构。A β 40的N27 $\rightarrow$ D修饰阻碍了原纤维化并诱导了反平行 β 折叠聚集体的形成。具有R5 $\rightarrow$ Cit修饰的A β 42在水性介质中的溶解度增加,其原纤维形成速度比A β 42慢,但没有改变原纤维的

平行 β 折叠结构。带有N27 $\rightarrow$ D修饰的A β 42部分形成了包含平行 β 折叠结构的原纤维。K28的乙酰化(K28Ac)减慢了A β 42原纤维化速率但不影响原纤维形态。另一方面,K16残基的乙酰化(K16Ac)大大降低了A β 42肽的原纤维化特性,也影响了其毒性^[71]。

2.3 A β 修饰肽的影响

A β pE3的存在具有重要的结构意义,因为它比其他形式的A β 更具疏水性,因此增加了A β 的不溶性。此外,A β pE3的N端受普通氨基肽酶作用的阻断,可能导致A β 在AD的神经斑块中大量积累。A β pE3的细胞毒性更强,A β pE3-42对A β 42原纤维的形成具有抑制作用,与其已知的更大感染力相一致^[72]。Youssef等^[73]进行的小鼠实验表明,A β pE3-42可以介导在临床前AD阶段发生的神经退行性过程和随后的认知改变。Met35的氧化态会影响先前存在的淀粉样蛋白原纤维和噬斑的稳定性,导致细丝、原纤维和成熟原纤维的形态发生变化^[74]。与未氧化肽的神经毒性相反,氧化的A β 在皮质神经元培养物中完全缺乏神经毒性作用^[75],这可能是由于氧化态的A β 增强了甲硫氨酸亚砷还原酶A型(MsrA)基因的表达和功能来减少活性氧ROS的生成^[76]。磷酸化的A β 肽显示出增加的神经毒性和降低的形成刚果红阳性原纤维的能力^[55]。在转基因小鼠和AD患者大脑中检测到磷酸化A β ,在果蝇模型中,磷酸化A β 显示出更高的毒性^[67]。A β 的磷酸化可以在A β 代谢中发挥双重作用,一方面它降低了其蛋白水解清除率,另一方面促进了其聚集^[77]。细胞毒性实验证实野生型A β 40比A β 40Y10(3N)T更具细胞毒性^[69]。对A β 42的研究也表明Y10的硝化可能会阻止A β 42的 π - π 堆积相互作用,从而抑制其聚集和神经毒性^[78]。Zhao等^[79]还研究了A β 42硝化与有毒Cu(II)的相互作用,结果表明尽管硝化没有改变A β 42与Cu(II)的结合或A β 42-Cu(II)复合物的过氧化活性,但硝化改善了Cu(II)诱导的A β 42聚集和神经毒性。与单独的野生型或K28Ac肽聚集体相比,K16Ac和双乙酰化(KKAc)肽聚集体显示出更高的细胞毒性。然而,野生型和乙酰化A β 42肽聚集体的异质混合物表现出更高的自由基形成和细胞毒性^[71]。

Table 2 A compilation of aggregation characteristics and effects of modified amyloid β peptides

表2 β淀粉样蛋白修饰肽的聚集特性及其影响

修饰位点	修饰类型	聚集特性	影响	参考文献
E3、E11	焦谷氨酸化	更容易形成β折叠结构, 并且更稳定, 聚集倾向更高	增加了Aβ的不溶性; 不易被普通氨基肽酶降解, 造成Aβ的大量积累; 细胞毒性更强; 介导在临床前AD阶段发生的神经退行性过程和随后的认知改变	[51-53, 61-62, 72-73]
D7、D23	天冬氨酸异构化	增强了Aβ的聚集; 诱导Aβ发生构象变化形成β转角	沉积在老年斑以及淀粉样蛋白血管中	[54-55, 63-64]
Met35	氧化	降低了Aβ42的原纤维形成的速率, 减少了两种主要形式的Aβ产生的纤维总量, 纤维长度明显减少	影响先前存在的淀粉样蛋白原纤维和老年斑的稳定性, 导致纤维的形态发生变化; 无神经毒性	[56, 65-66, 74-76]
S8、S26	磷酸化	促进了寡聚 Aβ 组装体的形成	神经毒性增加、形成刚果红阳性原纤维的能力降低; 蛋白水解清除率降低	[57, 67-68, 77]
Y10	硝化	加速了其聚集; 也有研究显示降低了Aβ40的聚集	抑制聚集和神经毒性; 改善了Cu(II)诱导的 Aβ42 的聚集和神经毒性	[58, 69-70, 78-79]
R5	瓜氨酸化	Aβ40的瓜氨酸化不影响原纤维化率, 形成与Aβ40原纤维不同的β折叠结构; 瓜氨酸化的Aβ42在水性介质中的溶解度增加, 其原纤维形成速度比Aβ42慢, 但没有改变原纤维的平行β折叠结构		[59]
N27	脱酰胺	Aβ40的N27→D修饰阻碍了原纤维化并诱导了反平行 β折叠聚集体的形成; 带有N27→D修饰的 Aβ1-42部分形成了包含平行β折叠结构的原纤维		[59]
K16、K28	乙酰化	减慢 Aβ42 原纤维化速率但不影响原纤维形态	K16Ac 和双乙酰化 (KKAc) 肽聚集体显示出更高的细胞毒性; 野生型和乙酰化 Aβ42 肽聚集体的异质混合物表现出更高的自由基形成和细胞毒性	[60-61]

3 Aβ变体的检测

近年来, 关于Aβ的分析检测方法研究取得了诸多进展, 研究者从不同的角度对其进行了评述^[80-82]。由于Aβ40和Aβ42是人体内Aβ的主要存在形式, 目前建立发展的检测分析方法主要针对单体状态或聚集状态下的Aβ40和Aβ42, 关于Aβ变体的检测方法报道的比较少。随着人们对AD病理特征的深入研究, 发现了越来越多的Aβ变体起着重要作用, 可作为AD的生物标志物。针对这些Aβ变体, 开发出了一些分析检测方法, 包括常见的质谱法、免疫学法和电化学法等。

3.1 质谱法 (MS)

质谱法因其准确度和精密度而成为一种可靠的检测 Aβ 方式。由于 Aβ 的疏水性、高分子质量 (>4 ku) 和低丰度, 使用传统 MS 方法 (尤其是在血浆中) 对 Aβ 进行定量仍然是一个挑战, 因此,

对 Aβ 的质谱分析通常与其他分析处理方法如免疫沉淀 (IP) 法、固相萃取 (SPE) 法、毛细管等电聚焦 (CIEF) 法并结合使用。

Domingo 等^[83]开发了一种基于固相萃取和电喷雾电离液相色谱质谱 (ESI-LC-MS) 的无抗体方法, 用于在人脑脊液 (hCSF) 中同时鉴定和定量 19 种 Aβ 亚型 (Aβ1-42、1-40、1-38 和 16 种 Aβ N 端截短和翻译后修饰形式 (包括焦谷氨酸形式) 的肽。Portelius 等^[84]描述了一种方法, 它采用免疫沉淀结合基质辅助激光解吸/电离飞行时间质谱来确定脑脊液中 C 端截短的 Aβ 肽的模式, 使用与磁珠偶联的抗体, 在脑脊液中检测到 18 个 C 端和 2 个 N 端截短的 Aβ 肽, 其中 3 个最强的峰对应于 Aβ1-40、Aβ1-17 和 Aβ1-38。Murayama 等^[85]生成了一种新的单克隆抗体, 该抗体对 Aβ5-40/42 的 N 端具有特异性。蛋白质印迹证实该抗体识别 Aβ5-40 但不识别 Aβ1-40。用抗体进行免疫沉淀,

然后进行质谱分析,进一步检测到来自表达半胱天冬酶切割的APP的神经母细胞瘤细胞的条件培养基中的A β 5-40。Kaneko等^[86]通过串联质谱法(基质辅助激光解吸/电离飞行时间质谱)对人血浆中进行鉴定,检测到22种A β 相关肽,开发了A β 相关肽的定量分析,并证明了血浆稀释线性和定量所需的精确度。Haußmann等^[87]提出了一种通过毛细管等电聚焦免疫测定、分离和检测A β N端截短肽的新方法。CIEF免疫测定和免疫沉淀质谱分析确定,从残基R5开始的肽是在细胞培养模型中存在BACE1抑制剂的情况下产生的主要氨基末端A β 变体。Pannee等^[88]开发了一种基于免疫沉淀的方法,用于从人血浆中富集A β 肽。使用基质辅助激光解吸/电离飞行时间/飞行时间质谱法分析肽段以进行A β 分析和选择反应监测,进行A β 1-38、A β 1-40和A β 1-42的MS定量。在Sargaeva^[89]的研究中,电子捕获解离(ECD)傅里叶变换离子回旋共振质谱(FTICR MS)被应用于检测A β 肽中的天冬氨酸的异构化。

3.2 免疫学方法

基于抗原抗体特异性反应的免疫检测方法是定性、定量分析A β 肽的最常用、可靠和灵敏的方法之一。酶联免疫吸附分析(ELISA)、蛋白质印迹法、免疫组织化学法、免疫荧光标记、免疫染色法也常用来鉴别和检测A β 变体。

针对不同的A β 变体,人们获得了不同的抗体(表3)。Caillava等^[90]获得了针对人A β 34 C端最后14个氨基酸的兔多克隆抗体(称为 α 34)。蛋白质印迹实验表明, α 34血清的整个纯化IgG片段仅识别A β 34,而不识别其全长对应物A β 40。ELISA证实了 α 34对A β 34的特异性,并且具有高灵敏度(检测下限约为1 μ g/L)。Sullivan等^[91]生成了两种针对A β pE物种的多克隆抗体,并使用它们来观察人淀粉样斑块的A β pE谱。通过蛋白质印迹分析和免疫组织化学对这些抗体的评估表明,它们在低浓度下(5 μ g/L)与靶标特异性结合。Albertini等^[92]设计了一种免疫蛋白质组学检测方法,该检测在预活化表面的芯片阵列上使用单克隆抗体混合物(6E10+4G8),然后使用表面增强激光解吸电离-飞行时间质谱(SELDI-TOF MS)分析检测到15个A β 亚型。Acero等^[93]生成并表征了一种抗A β pE3小鼠单克隆抗体(3B8),可识别AD患者脑组织和3xTg-AD转基因小鼠脑组织中的淀粉样蛋白聚集体。针对不同A β 片段的ELISA分析结果表明,无

论焦谷氨酸修饰如何,都可以识别A β pE3和A β 3-42中存在的两个构象表位。在AD转基因小鼠模型中,A β 4-x先于A β pE(3-x)在神经元内积累。新型A β 4-x免疫反应性抗体NT4X-167^[94]可以检测到来自截短A β 物种的高分子质量聚集体,并且与其他常见神经退行性疾病典型的聚集体没有交叉反应。Liu等^[95]使用与辣根过氧化物酶连接的抗体(P82, M11),利用ELISA在血管淀粉样沉积物中检测到未修饰的游离A β 11-40和焦谷氨酸修饰的A β 11-40。Mehta等^[96]生成和部分表征了针对A β pE3的兔单克隆抗体(Rab mAb),发现生成的Rab mAb对A β pE3具有特异性,因为它与A β 16、A β 40、A β 42、A β 3-11和A β pE(11-17)在ELISA中没有反应性。在蛋白质印迹中,A β pE3的最佳检测条件是抗体浓度为0.5 mg/L,该抗体的灵敏度足以在夹心ELISA中检测10 ng/L的A β pE3。Mohamadi等^[97]提出了一种用于检测A β 肽的集成微流控芯片,该设备利用免疫捕获和微芯片电泳分析不同截短的A β 肽(1-37、1-39、1-40和1-42),并且能够检测低至25 ng的加在未稀释的脑脊液中的合成A β 肽。Klafki等^[98]对针对A β (-3-x)N端的两种抗体进行了表征,开发了用于测量A β (-3-40)的夹心免疫测定方法,并通过毛细管等电聚焦免疫测定、蛋白质印迹分析和免疫组织化学评估了抗体选择性。两种单克隆抗体都检测到A β (-3-40),与A β 1-40或N端截短的A β 变体没有明显的交叉反应。免疫测定对A β (-3-40)显示出高选择性,定量测定范围为22 ng/L~7.5 μ g/L。除了针对A β 截短肽的抗体外,研究者还开发了针对A β 修饰肽的抗体,如针对磷酸化的S8(pS8 A β)的特异性抗体1E4E11^[99],针对磷酸化的S26(pS26 A β)的单克隆抗体5H11C10^[100],针对硝化的Y10(3NTyr10A β)的3NTyr10A β 抗血清^[101],针对焦谷氨酸化的E3(pE3A β)的抗体337.48及针对异天冬氨酸化的IsoD-A β 的抗体22C8^[102]。

3.3 电化学法

电化学方法通常采用生物传感器将生化反应转变为可定量的物理/化学信号,由于其高效性、成本低、高特异性和快速性,成为目前最广泛使用的技术之一。基于酪氨酸或丝氨酸的磷酸化和酪氨酸的硝化对肽分子电化学活性的影响,Suprun等^[103]在碳丝网印刷电极上记录了带有未修饰残基、O-磷酸化Y10或S8、3-硝化Y10的A β 16的氧化和还原的方波伏安图,结果表明这些氨基酸残基的磷酸

Table 3 Comparison of immunoassay methods for detection of Aβ isoforms
表3 Aβ变体免疫检测方法的比较

Aβ变体种类	检测方法	抗体种类	检出限	参考文献
Aβ1-34	酶联免疫吸附分析 (ELISA)	多克隆抗体α34	1 μg/L	[90]
Aβ截短肽 (15种)	免疫蛋白质组学	活化芯片阵列+单克隆抗体 (6E10+4G8)		[92]
Aβ pE3和Aβ3-42	酶联免疫吸附分析 (ELISA)	单克隆抗体 (3B8)		[93]
Aβ4-40/42	蛋白质印迹分析	单克隆抗体NT4X-167	7 nmol/L	[94]
Aβ11-40/42, Aβ pE11-42/42	酶联免疫吸附分析 (ELISA)	与辣根过氧化物酶连接的P82, M11		[95]
Aβ截短肽 (1-37、1-39、1-40和1-42)	微流控芯片+微芯片电泳	包被在磁珠上的抗体		[97]
Aβ (-3-x)	毛细管等电聚焦免疫测定、蛋白质印迹分析和免疫组织化学	单克隆抗体	22 ng/L	[98]
焦谷氨酸化Aβ	蛋白质印迹分析	多克隆抗体	5 μg/L	[91]
Aβ pE3、Aβ pE11	免疫组织化学			
焦谷氨酸化Aβ pE3	酶联免疫吸附分析 (ELISA)	兔单克隆抗体 (Rab mAb)	10 ng/L	[96]
焦谷氨酸化Aβ (pE3 Aβ)	免疫染色	抗体337.48		[102]
磷酸化Aβ (pS8 Aβ)	免疫组织化学染色	抗体1E4E11		[99]
磷酸化Aβ (pS26 Aβ)	酶联免疫吸附测定 (ELISA) 和蛋白质印迹 (WB)	单克隆抗体5H11C10	25 μg/L	[100]
硝化Aβ (3NTyr10-Aβ)	夹心ELISA	3NTyr10-Aβ抗血清		[101]
异天冬氨酸化Aβ (IsoD-Aβ)	免疫染色	抗体22C8		[102]

化和硝化都显著改变了Aβ16肽的电化学行为，利用电化学方法可以直接检测Aβ中的翻译后修饰。Lu等^[104]通过TiO₂纳米刷(TiO₂ NB)基于溶液的水热生长来构建光电化学(PEC)传感器用于检测Aβ1-28，表现出极大灵敏度，检测限为26.3 μg/L，促进了一种简单、无标记、快速、灵敏和无创的方法，以克服用于AD诊断的常规技术的局限性。表面修饰、蛋白质纳米结构作为新兴的生物纳米技术平台，为构建生物传感器提供了强大的工具^[105]，基于该平台的电化学检测方法将为Aβ变体的检测提供更多的可能。

4 结论与展望

位于Aβ序列内的FAD突变似乎具有不同的生化特性和病理效应，并导致不同临床表现和发展。除了A2T是一种保护性突变外，其他大多数突变会增加向寡聚体或原纤维的聚集率，更具神经毒性和病理性。FAD点突变会改变Aβ肽的聚集动力学，形成形态、构象上不同的淀粉样蛋白结构，这可能解释了与Aβ突变相关的疾病表型的异质性。

除了FAD中存在的Aβ突变体外，散发性AD中还有大量的其他Aβ种类，有些是在APP加工过程中产生的，有些是经过翻译后修饰产生的，或者

是在某些细胞或细胞外区室中发现或产生的。Aβ的特定区域显然对其生理特性有不同的贡献，如Aβ的N端区域及某些氨基酸是翻译后修饰的热点。Aβ后修饰是一个广阔的但并未深入研究的领域，有可能对理解AD的发病机制做出重大贡献。酶切和修饰过程导致致病性Aβ种类的形成，其水平可能随着年龄增加而增加，并和遗传因素相关。这些Aβ的酶切和修饰可能是散发性AD的主要贡献者，靶向这些肽或相关的酶可以作为一种新的治疗机制或提供一种新的诊断方法。目前已经成功开发了多种检测Aβ变体的方法，但没有一个黄金标准，为了实现对Aβ及Aβ变体的临床检测，还需要做大量的工作来开发简单、可靠、准确和便宜的技术。这些方法与用于生物传感的新纳米材料或探针的进一步整合将有助于获得高灵敏度和高选择性的Aβ检测。对全长Aβ的检测不足以获得关于AD进展的明确诊断结论，通过高通量分析可以方便地对不同标志物进行多重检测。随着对AD发病机理的深入认识和纳米技术、设备制造方法的进步，应该会找到一种早期诊断AD的方法。

参 考 文 献

[1] Fang F, Hu H. Recent progress on mechanisms of human cognition and brain disorders. Sci China Life Sci, 2021, 64(6):843-846

- [2] Tiraboschi P, Hansen L A, Thal L J, *et al.* The importance of neuritic plaques and tangles to the development and evolution of AD. *Neurology*, 2004, **62**(11):1984-1989
- [3] Waldemar G, Dubois B, Emre M, *et al.* Recommendations for the diagnosis and management of Alzheimer's disease and other disorders associated with dementia: EFNS guideline. *Eur J Neurol*, 2007, **14**(1):e1-e26
- [4] Scheltens P, De Strooper B, Kivipelto M, *et al.* Alzheimer's disease. *Lancet*, 2021, **10284**(397):1577-1590
- [5] Sun B, Chen Y, Fan D, *et al.* Critical thinking on amyloid-beta-targeted therapy: challenges and perspectives. *Sci China Life Sci*, 2021, **64**(6):926-937
- [6] Jonsson T, Atwal J K, Steinberg S, *et al.* A mutation in APP protects against Alzheimer's disease and age-related cognitive decline. *Nature*, 2012, **488**(7409):96-99
- [7] Colombo L, Gamba A, Cantù L, *et al.* Pathogenic A β A2V versus protective A β A2T mutation: early stage aggregation and membrane interaction. *Biophys Chem*, 2017, **229**:11-18
- [8] Di Fede G, Catania M, Falcone C, *et al.* A recessive mutation in the app gene with dominant-negative effect on amyloidogenesis. *Science*, 2009, **323**(5920):1473-1477
- [9] Giaccone G, Morbin M, Moda F, *et al.* Neuropathology of the recessive A673V APP mutation: Alzheimer disease with distinctive features. *Acta Neuropathol*, 2010, **120**(6):803-812
- [10] Ono K, Condrón M M, Teplow D B. Effects of the English (H6R) and Tottori (D7N) familial Alzheimer disease mutations on amyloid beta-protein assembly and toxicity. *J Biol Chem*, 2010, **285**(30):23186-23197
- [11] Kozin S A, Kulikova A A, Istrate A N, *et al.* The English (H6R) familial Alzheimer's disease mutation facilitates zinc-induced dimerization of the amyloid- β metal-binding domain. *Metallomics*, 2015, **7**(3):422-425
- [12] Wakutani Y, Watanabe K, Adachi Y, *et al.* Novel amyloid precursor protein gene missense mutation (D678N) in probable familial Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2004, **75**(7):1039-1042
- [13] Chen W, Hong C, Lin Y, *et al.* Amyloid-beta (A β) D7H mutation increases oligomeric A β 42 and alters properties of A β -zinc/copper assemblies. *PLoS One*, 2012, **7**(4):e35807
- [14] Kaden D, Harmeier A, Weise C, *et al.* Novel APP/Abeta mutation K16N produces highly toxic heteromeric Abeta oligomers. *EMBO Mol Med*, 2012, **4**(7):647-659
- [15] Hendriks L, van Duijn C M, Cras P, *et al.* Presenile dementia and cerebral haemorrhage linked to a mutation at codon 692 of the β -amyloid precursor protein gene. *Nature Genetics*, 1992, **1**(3):218-221
- [16] Yagi-Utsumi M, Dobson C M. Conformational effects of the A21G Flemish mutation on the aggregation of amyloid beta peptide. *Biol Pharm Bull*, 2015, **38**(10):1668-1672
- [17] Betts V, Leissring M A, Dolios G, *et al.* Aggregation and catabolism of disease-associated intra-A β mutations: reduced proteolysis of A β A21G by neprilysin. *Neurobiol Dis*, 2008, **31**(3):442-450
- [18] Demeester N, Mertens C, Caster H, *et al.* Comparison of the aggregation properties, secondary structure and apoptotic effects of wild-type, Flemish and Dutch N-terminally truncated amyloid beta peptides. *Eur J Neurosci*, 2001, **13**(11):2015-2024
- [19] Wang Z, Natte R, Berliner J A, *et al.* Toxicity of Dutch (E22Q) and Flemish (A21G) mutant amyloid beta proteins to human cerebral microvessel and aortic smooth muscle cells. *Stroke*, 2000, **31**(2):534-538
- [20] Tomiyama T, Nagata T, Shimada H, *et al.* A new amyloid beta variant favoring oligomerization in Alzheimer's-type dementia. *Ann Neurol*, 2008, **63**(3):377-387
- [21] Ovchinnikova O Y, Finder V H, Vodopivec I, *et al.* The Osaka FAD mutation E22Delta leads to the formation of a previously unknown type of amyloid beta fibrils and modulates Abeta neurotoxicity. *J Mol Biol*, 2011, **408**(4):780-791
- [22] Nilsberth C, Teplow D B, Lannfelt L, *et al.* The 'Arctic' APP mutation (E693G) causes Alzheimer's disease by enhanced A β protofibril formation. *Nature Neurosci*, 2001, **4**(9):887-893
- [23] Whalen B M, Selkoe D J, Hartley D M. Small non-fibrillar assemblies of amyloid β -protein bearing the Arctic mutation induce rapid neuritic degeneration. *Neurobiol Dis*, 2005, **20**(2):254-266
- [24] Kalimo H, Lalowski M, Bogdanovic N, *et al.* The Arctic A β PP mutation leads to Alzheimer's disease pathology with highly variable topographic deposition of differentially truncated A β . *Acta neuropathol Commun*, 2013, **1**(1):60
- [25] Tsubuki S, Takaki Y, Saido T C. Dutch, Flemish, Italian, and Arctic mutations of APP and resistance of Abeta to physiologically relevant proteolytic degradation. *Lancet*, 2003, **361**(9373):1957-1958
- [26] Bugiani O, Giaccone G, Rossi G, *et al.* Hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis associated with the E693K mutation of APP. *Arch Neurol*, 2010, **67**(8):987
- [27] Levy E C M D F. Mutation of the Alzheimer's disease amyloid gene in hereditary cerebral hemorrhage, Dutch type. *Science*, 1990, **4959**(248):1124-1126
- [28] Melchor J P, McVoy L, Van Nostrand W E. Charge alterations of E22 enhance the pathogenic properties of the amyloid beta-protein. *J Neurochem*, 2000, **74**(5):2209-2212
- [29] Pfeifer M, Staufenbiel M, Herzog M C, *et al.* A β is targeted to the vasculature in a mouse model of hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis. *Nature Neurosci*, 2004, **7**(9):954-960
- [30] Davis J, Xu F, Miao J, *et al.* Deficient cerebral clearance of vasculotropic mutant Dutch/Iowa Double A β in human A β PP transgenic mice. *Neurobiol Aging*, 2006, **27**(7):946-954
- [31] Jung S S, Zhang W, Van Nostrand W E. Pathogenic A β induces the expression and activation of matrix metalloproteinase-2 in human cerebrovascular smooth muscle cells. *J Neurochem*, 2003, **85**(5):1208-1215
- [32] Grabowski T J, Cho H S, Vonsattel J P G, *et al.* Novel amyloid precursor protein mutation in an Iowa family with dementia and

- severe cerebral amyloid angiopathy. *Annal Neurol*, 2001, **49**(6): 697-705
- [33] Fossati S, Todd K, Sotolongo K, *et al.* Differential contribution of isoaspartate post-translational modifications to the fibrillization and toxic properties of amyloid β and the Asn23 Iowa mutation. *Biochem J*, 2013, **456**(3):347-360
- [34] Obici L, Demarchi A, de Rosa G, *et al.* A novel A β PP mutation exclusively associated with cerebral amyloid angiopathy. *Annal Neurol*, 2005, **58**(4):639-644
- [35] Fossati S, Cam J, Meyerson J, *et al.* Differential activation of mitochondrial apoptotic pathways by vasculotropic amyloid- β variants in cells composing the cerebral vessel walls. *FASEB J*, 2010, **24**(1):229-241
- [36] Benilova I, Gallardo R, Ungureanu A, *et al.* The Alzheimer disease protective mutation A2T modulates kinetic and thermodynamic properties of amyloid- β (A β) aggregation. *J Biol Chem*, 2014, **289**(45):30977-30989
- [37] Hori Y, Hashimoto T, Wakutani Y, *et al.* The Tottori (D7N) and English (H6R) familial Alzheimer disease mutations accelerate A β fibril formation without increasing protofibril formation. *J Biol Chem*, 2007, **282**(7):4916-4923
- [38] Ono K, Condrón M M, Teplow D B. Effects of the English (H6R) and Tottori (D7N) familial Alzheimer disease mutations on amyloid beta-protein assembly and toxicity. *J Biol Chem*, 2010, **285**(30):23186-23197
- [39] Zhou L, Brouwers N, Benilova I, *et al.* Amyloid precursor protein mutation E682K at the alternative β -secretase cleavage β' -site increases A β generation. *EMBO Mol Med*, 2011, **3**(5):291-302
- [40] Tang T, Hu Y, Kienlen-Campard P, *et al.* Conformational changes induced by the A21G Flemish mutation in the amyloid precursor protein lead to increased A β production. *Structure*, 2014, **22**(3): 387-396
- [41] Chong S, Yim J, Ham S. Structural heterogeneity in familial Alzheimer's disease mutants of amyloid-beta peptides. *Mol Biosys*, 2013, **9**(5):997
- [42] Inayathullah M, Teplow D B. Structural dynamics of the Δ E22 (Osaka) familial Alzheimer's disease-linked amyloid β -protein. *Amyloid*, 2011, **18**(3):98-107
- [43] Sohma Y, Wang H, Taniguchi A, *et al.* Self-assembly pathways of E22Delta-type amyloid beta peptide mutants generated from non-aggregative O-acetyl isopeptide precursors. *Bioorg Med Chem*, 2011, **19**(12):3787-3792
- [44] Kulic L, McAfoose J, Welt T, *et al.* Early accumulation of intracellular fibrillar oligomers and late congophilic amyloid angiopathy in mice expressing the Osaka intra-A β APP mutation. *Transl Psychiatry*, 2012, **2**(11):e183
- [45] Spirig T, Ovchinnikova O, Vagt T, *et al.* Direct evidence for self-propagation of different amyloid- β fibril conformations. *Neurodegener Dis*, 2014, **14**(3):151-159
- [46] Hubin E, Deroo S, Schierle G K, *et al.* Two distinct β -sheet structures in Italian-mutant amyloid-beta fibrils: a potential link to different clinical phenotypes. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2015, **72**(24):4899-4913
- [47] Lin Y, Pande V S. Effects of familial mutations on the monomer structure of A β 42. *Biophys J*, 2012, **103**(12):L47-L49
- [48] Tycko R, Sciarretta K L, Orgel J P R O, *et al.* Evidence for novel β -sheet structures in Iowa mutant β -amyloid fibrils. *Biochemistry*, 2009, **48**(26):6072-6084
- [49] Fu Z, Van Nostrand W E, Smith S O. Anti-parallel β -hairpin structure in soluble A β oligomers of A β 40-Dutch and A β 40-Iowa. *Int J Mol Sci*, 2021, **22**(3):1225
- [50] 郝秀萍. 淀粉样蛋白的成核与交叉成核作用研究[D]. 天津: 天津大学, 2019
- Hao X P. Study of Seeding and Cross-seeding Aggregations Between Amyloid Peptide[D]. Tianjin: Tianjin University, 2019
- [51] Kuo Y, Emmerling M R, Woods A S, *et al.* Isolation, chemical characterization, and quantitation of A β 3-pyroglyutamyl peptide from neuritic plaques and vascular amyloid deposits. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, **237**(1):188-191
- [52] Hosoda R, Saido T C, Otvos L, *et al.* Quantification of modified amyloid β peptides in Alzheimer disease and Down syndrome brains. *J Neuropathol Exp Neurol*, 1998, **57**(11):1089-1095
- [53] Sullivan C P, Berg E A, Elliott-Bryant R, *et al.* Pyroglutamate-A β 3 and 11 colocalize in amyloid plaques in Alzheimer's disease cerebral cortex with pyroglutamate-A β 11 forming the central core. *Neurosci Lett*, 2011, **505**(2):109-112
- [54] Shimizu T, Watanabe A, Ogawara M, *et al.* Isoaspartate formation and neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Arch Biochem Biophys*, 2000, **381**(2):225-234
- [55] Mukherjee S, Perez K A, Lago L C, *et al.* Quantification of N-terminal amyloid-beta isoforms reveals isomers are the most abundant form of the amyloid-beta peptide in sporadic Alzheimer's disease. *Brain Commun*, 2021, **3**(2):b28
- [56] Milton N G N. Phosphorylation of amyloid- β at the serine 26 residue by human cdc2 kinase. *Neuroreport*, 2001, **12**(17): 3839-3844
- [57] Kumar S, Kapadia A, Theil S, *et al.* Novel phosphorylation-state specific antibodies reveal differential deposition of ser26 phosphorylated A β Species in a mouse model of Alzheimer's disease. *Front Mol Neurosci*, 2020, **13**:619639
- [58] Kummer M P, Hermes M, Delekarte A, *et al.* Nitration of tyrosine 10 critically enhances Amyloid β aggregation and plaque formation. *Neuron*, 2011, **71**(5):833-844
- [59] Osaki D, Hiramatsu H. Citrullination and deamidation affect aggregation properties of amyloid β -proteins. *Amyloid*, 2016, **23**(4):234-241
- [60] Ayyadevara S, Balasubramaniam M, Parcon P A, *et al.* Proteins that mediate protein aggregation and cytotoxicity distinguish Alzheimer's hippocampus from normal controls. *Aging Cell*, 2016, **15**(5):924-939
- [61] He W, Barrow C J. The A β 3-pyroglyutamyl and 11-pyroglyutamyl peptides found in senile plaque have greater β -sheet forming and aggregation propensities *in vitro* than full-length A β . *Biochemistry*, 1999, **38**(33):10871-10877

- [62] Russo C, Violani E, Salis S, *et al.* Pyroglutamate-modified amyloid β -peptides-A β N3(pE)-strongly affect cultured neuron and astrocyte survival. *J Neurochem*, 2002, **82**(6):1480-1489
- [63] Shimizu T, Matsuoka Y, Shirasawa T, *et al.* Biological significance of isoaspartate and its repair system. *Biol Pharm Bull*, 2005, **28**(9): 1590-1596
- [64] Orpiszewski J, Schormann N, Kluge-Beckerman B, *et al.* Protein aging hypothesis of Alzheimer disease. *Neuro Aging*, 2000, **21**:80
- [65] Hou L, Kang I, Marchant R E, *et al.* Methionine 35 oxidation reduces fibril assembly of the amyloid abeta- (1-42) peptide of Alzheimer's disease. *J Biol Chem*, 2002, **277**(43):40173-40176
- [66] Gu M, Viles J H. Methionine oxidation reduces lag-times for amyloid- β (1-40) fiber formation but generates highly fragmented fibers. *Biochim Biophys Acta*, 2016, **1864**(9):1260-1269
- [67] Kumar S, Rezaei-Ghaleh N, Terwel D, *et al.* Extracellular phosphorylation of the amyloid beta-peptide promotes formation of toxic aggregates during the pathogenesis of Alzheimer's disease. *EMBO J*, 2011, **30**(11):2255-2265
- [68] Jamasbi E, Separovic F, Hossain M A, *et al.* Phosphorylation of a full length amyloid-beta peptide modulates its amyloid aggregation, cell binding and neurotoxic properties. *Mol Biosyst*, 2017, **13**(8):1545-1551
- [69] Zhao J, Wang P, Li H, *et al.* Nitration of Y10 in A β 1-40: is it a compensatory reaction against oxidative/nitrative stress and A β aggregation?. *Chem Res Toxicol*, 2015, **28**(3):401-407
- [70] Zhao J, Shi Q, Zheng Y, *et al.* Insights into the mechanism of tyrosine nitration in preventing β -amyloid aggregation in Alzheimer's disease. *Front Mol Neurosci*, 2021, **14**:619836
- [71] Adhikari R, Yang M, Saikia N, *et al.* Acetylation of A β 42 at lysine 16 disrupts amyloid formation. *ACS Chem Neurosci*, 2020, **11**(8): 1178-1191
- [72] D'Arrigo C, Tabaton M, Perico A. N-terminal truncated pyroglutamyl β amyloid peptide A β py3-42 shows a faster aggregation kinetics than the full-length A β 1-42. *Biopolymers*, 2009, **91**(10):861-873
- [73] Youssef I, Florent-Bécharde S, Malaplate-Armand C, *et al.* N-truncated amyloid- β oligomers induce learning impairment and neuronal apoptosis. *Neurobiol Aging*, 2007, **29**(9):1319-1333
- [74] Hou L, Lee H, Han F, *et al.* Modification of amyloid- β 1-42 fibril structure by methionine-35 oxidation. *J Alzheimers Dis*, 2013, **37**(1):9-18
- [75] Johansson AS, Bergquist J, Volbracht C, *et al.* Attenuated amyloid-beta aggregation and neurotoxicity owing to methionine oxidation. *Neuroreport*, 2007, **18**(6):559-563
- [76] Misiti F, Clementi M E, Giardina B. Oxidation of methionine 35 reduces toxicity of the amyloid beta-peptide (1-42) in neuroblastoma cells (IMR-32) *via* enzyme methionine sulfoxide reductase A expression and function. *Neurochem Int*, 2010, **56**(4): 597-602
- [77] Kumar S, Singh S, Hinze D, *et al.* Phosphorylation of amyloid- β peptide at serine 8 attenuates its clearance *via* insulin-degrading and angiotensin-converting enzymes. *J Biol Chem*, 2012, **287**(11): 8641-8651
- [78] Zhao J, Wu J, Yang Z, *et al.* Nitration of tyrosine residue Y10 of A β 1-42 significantly inhibits its aggregation and cytotoxicity. *Chem Res Toxicol*, 2017, **30**(4):1085-1092
- [79] Zhao J, Gao W, Yang Z, *et al.* Nitration of amyloid- β peptide (1-42) as a protective mechanism for the amyloid- β peptide (1-42) against copper ion toxicity. *J Inorg Biochem*, 2019, **190**:15-23
- [80] Zhou Y, Liu L, Hao Y, *et al.* Detection of A β monomers and oligomers: early diagnosis of Alzheimer's disease. *Chem Asian J*, 2016, **11**(6):805-817
- [81] Li C, Grajales S, Shuang S, *et al.* β -Amyloid biomarker detection for Alzheimer's disease. *J Anal Test*, 2017, **1**(2):15
- [82] 王晓英, 王小兵, 蒋萌. β -淀粉样蛋白的分析检测方法研究进展. *分析化学*, 2018(9):1339-1349
Wang X Y, Wang X B, Jiang M. Chinese *J Anal Chem*, 2018(9): 1339-1349
- [83] Domingo G, Benussi L, Saraceno C, *et al.* N-terminally truncated and pyroglutamate-modified A β Forms are measurable in human cerebrospinal fluid and are potential markers of disease progression in Alzheimer's disease. *Front Neurosci*, 2021, **15**:708119
- [84] Portelius E, Westman-Brinkmalm A, Zetterberg H, *et al.* Determination of beta-amyloid peptide signatures in cerebrospinal fluid using immunoprecipitation-mass spectrometry. *J Proteome Res*, 2006, **5**(4):1010-1016
- [85] Murayama K S, Kametani F, Tabira T, *et al.* A novel monoclonal antibody specific for the amino-truncated β -amyloid A β 5-40/42 produced from caspase-cleaved amyloid precursor protein. *J Neurosci Methods*, 2007, **161**(2):244-249
- [86] Kaneko N, Yamamoto R, Sato T, *et al.* Identification and quantification of amyloid beta-related peptides in human plasma using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Proc Jpn Acad B Phys Biol Sci*, 2014, **90**(3): 104-117
- [87] Haußmann U, Jahn O, Linning P, *et al.* Analysis of amino-terminal variants of amyloid- β peptides by capillary isoelectric focusing immunoassay. *Anal Chem*, 2013, **85**(17):8142-8149
- [88] Pannee J, Törnqvist U, Westerlund A, *et al.* The amyloid- β degradation pattern in plasma—a possible tool for clinical trials in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*, 2014, **573**:7-12
- [89] Sargaeva N P, Lin C, O Connor P B. Identification of aspartic and isoaspartic acid residues in amyloid β peptides, including A β 1-42, using electron-ion reactions. *Anal Chem*, 2009, **81**(23):9778-9786
- [90] Caillava C, Ranaldi S, Lauritzen I, *et al.* Study on A β 34 biology and detection in transgenic mice brains. *Neurobiol Aging*, 2014, **35**(7):1570-1581
- [91] Sullivan C P, Berg EA, Elliott-Bryant R, *et al.* Pyroglutamate-A β 3 and 11 colocalize in amyloid plaques in Alzheimer's disease cerebral cortex with pyroglutamate-A β 11 forming the central core. *Neurosci Lett*, 2011, **505**(2):109-112
- [92] Albertini V, Bruno A, Paterlini A, *et al.* Optimization protocol for amyloid- β peptides detection in human cerebrospinal fluid using

- SELDITOF MS. *Proteomics Clin Appl*, 2010, **4**(3):352-357
- [93] Acero G, Garay C, Venegas D, *et al.* Novel monoclonal antibody 3B8 specifically recognizes pyroglutamate-modified amyloid β 3-42 peptide in brain of AD patients and 3xTg-AD transgenic mice. *Neurosci Lett*, 2020, **724**:134876
- [94] Antonios G, Saiepour N, Bouter Y, *et al.* N-truncated Abeta starting with position four: early intraneuronal accumulation and rescue of toxicity using NT4X-167, a novel monoclonal antibody. *Acta Neuropathol Commun*, 2013, **1**(1):56
- [95] Liu K, Solano I, Mann D, *et al.* Characterization of A β 11-40/42 peptide deposition in Alzheimer's disease and young Down's syndrome brains: implication of N-terminally truncated A β species in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol*, 2006, **112**(2):163-174
- [96] Mehta P D, Patrick B A, Barshatzky M, *et al.* Generation and partial characterization of rabbit monoclonal antibody to pyroglutamate amyloid- β 3-42 (pE3-A β). *J Alzheimers Dis*, 2018, **62**(4):1635-1649
- [97] Mohamadi R M, Svobodova Z, Bilkova Z, *et al.* An integrated microfluidic chip for immunocapture, preconcentration and separation of β -amyloid peptides. *Biomicrofluidics*, 2015, **9**(5): 54117
- [98] Klafki H W, Rieper P, Matzen A, *et al.* Development and technical validation of an immunoassay for the detection of APP669-711 (A β -3-40) in biological samples. *Int J Mol Sci*, 2020, **21**(18):6564
- [99] Kumar S, Lemere C A, Walter J. Phosphorylated A β peptides in human Down syndrome brain and different Alzheimer's-like mouse models. *Acta Neuropathol Commun*, 2020, **8**(1):114-118
- [100] Kumar S, Kapadia A, Theil S, *et al.* Novel phosphorylation-state specific antibodies reveal differential deposition of ser26 phosphorylated A β species in a mouse model of Alzheimer's disease. *Front Mol Neurosci*, 2021, **13**:619639
- [101] Kummer M P, Hermes M, Delekarte A, *et al.* Nitration of tyrosine 10 critically enhances amyloid β aggregation and plaque formation. *Neuron*, 2011, **71**(5):833-844
- [102] Moro M L, Phillips A S, Gaimster K, *et al.* Pyroglutamate and isoaspartate modified amyloid-beta in ageing and Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol Commun*, 2018, **6**(1):3
- [103] Suprun E V, Radko S P, Farafonova T E, *et al.* Electrochemical detection of protein post-translational modifications: phosphorylation and nitration of amyloid-beta (1-16). *Electrochim Acta*, 2017, 258:1182-1190
- [104] Lu Y, Purwidyantri A, Liu H, *et al.* Photoelectrochemical detection of β -amyloid peptides by a TiO₂ nanobrush biosensor. *IEEE Sens J*, 2020, **20**(12):6248-6255
- [105] Li F, Wang D, Zhou J, *et al.* Design and biosynthesis of functional protein nanostructures. *Sci China Life Sci*, 2020, **63**(8):1142-1158

Mutant and Modified Amyloid β Peptides and Alzheimer's Disease

HAO Xiu-Ping*, WU Lin-Zhi

(Department of Materials and Chemistry, Taiyuan University, Taiyuan 030032, China)

Abstract The amyloid cascade hypothesis is the core of etiology of Alzheimer's disease (AD). However, in the past few years, immunotherapy targeting amyloid plaques has not been successful. In recent years, different forms of amyloid β peptides ($A\beta$) have attracted people's attention. Here, we summarized the research progress of different $A\beta$ mutants in the brains of early-onset AD patients and the truncated and modified $A\beta$ isoforms that have been identified in the brains of sporadic AD patients, particularly focusing on the aggregation characteristics of these $A\beta$ species and their impact on the process of AD. Single amino acid $A\beta$ mutations associated with FAD (familial AD) lead to alterations in the structure of $A\beta$, which are associated with differential aggregation kinetics, morphologies, and conformations. These differences may underlie the pathological polymorphism of FAD. Meanwhile, enzyme digestion and post-translational modification of $A\beta$ may contribute to sporadic AD. Targeting these peptides or related enzymes can be used as a new therapeutic mechanism or provide a new diagnostic method. The currently reported detection and analysis methods of $A\beta$ species was also summarized, including traditional mass spectrometry, immunoassay methods, and electrochemistry methods. This review may contribute to the in-depth study of the role of different forms of $A\beta$ and related molecules in the pathological process of AD, and provide insight for the development of new methods for the diagnosis and treatment of AD.

Key words Alzheimer's disease, mutant $A\beta$, modified $A\beta$, aggregation characteristics, pathological characteristics, detection method

DOI: 10.16476/j.pibb.2021.0242

* Corresponding author.

Tel: 86-18322694344, E-mail: haoxiuping0128@163.com

Received: August 18, 2021 Accepted: November 9, 2021