

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Кудрявцева София Станиславовна

**Взаимодействие амилоидогенных белков
с шаперонинами**

1.1.10 - Биомеханика и биоинженерия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва – 2023

Работа выполнена в отделе биохимии животной клетки Научно-исследовательского института физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

Научный руководитель - **Муронец Владимир Израилевич**
доктор биологических наук, профессор

Официальные оппоненты - **Федоров Алексей Николаевич** - доктор биологических наук, директор Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук».

Козин Сергей Александрович - доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории конформационного полиморфизма белков в норме и патологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта» Российской академии наук.

Бачева Анна Владимировна – кандидат химических наук, доцент кафедры химии природных соединений Химического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова».

Защита диссертации состоится 22 июня 2023 года в 14:00 на заседании диссертационного совета МГУ.015.10 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119234, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 73, Факультет биоинженерии и биоинформатики, ауд. 221.

E-mail: dissovet@belozersky.msu.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций Научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Москва, Ломоносовский просп., д. 27) и на сайте ИАС «ИСТИНА»: <https://dissovet.msu.ru/dissertation/015.10/2542>

Автореферат разослан «__» мая 2023 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат химических наук



И.В. Шаповалова

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АДФ	аденозиндифосфат
АТФ	аденозинтрифосфат
Крио-ЭМ	криоэлектронная микроскопия
НАДН	восстановленная форма никотинамидадениндинуклеотида
ЭДТА	этилендиаминтетрауксусная кислота
α-syn	рекомбинантный альфа-синуклеин человека
FRET	Фёрстеровский перенос энергии
GroEL	бактериальный шаперонин, выделенный из клеток <i>E.coli</i>
GroES	ко-шаперонин бактериального шаперонина GroEL
HEPES	(4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота
IPTG	изопропил-D-тиогактопиранозид
MOPS	3-[N-морфолино]пропансульфоновая кислота
PBS	фосфатно-солевой буфер
PBST	фосфатно-солевой буфер с добавлением детергента Tween 20 до конечной концентрации 0,05%
PrP	рекомбинантный овечий прионный белок
SDS	додецилсульфат натрия
ThT	тиофлавин Т
TRiC	эукариотический шаперонин, выделенный из семенников быка

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность

Роль шаперонов в развитии нейродегенеративных заболеваний амилоидной природы исследуется в различных лабораториях уже в течение многих лет. Однако полученные данные весьма противоречивы. На смену первоначальным представлениям о положительном влиянии любых шаперонов на все амилоидные заболевания, в основе которых лежит патологическая агрегация белков, пришло понимание более сложного и специфического характера взаимодействий между разными шаперонами и разными амилоидными белками. Таким образом, выяснение роли шаперонов, тем более таких сложных как АТФ-зависимые шаперонины, в патологической трансформации амилоидных белков, конкретно прионного белка и альфа-синуклеина, представляется важной и актуальной. Пространственные структуры бактериального шаперонина GroEL и эукариотического TRiC известны, но требуют дальнейшего уточнения в разных функциональных состояниях белка. Важно также проведение сравнения структур, полученных разными методами. Прямых данных о возможности связывания мономерных форм альфа-синуклеина и прионного белка с шаперонинами и, тем более, о

структуре таких комплексов на момент начала работы над диссертацией не существовало.

Степень разработанности темы

В основе развития нейродегенеративных заболеваний амилоидной природы лежат два процесса: изменение структуры амилоидогенного белка и образование из таких молекул различных агрегатов с нарушенной конформацией. В связи с этим предполагается, что на оба процесса должны влиять различные шаперонины, присутствующие в клетках, поскольку они отвечают за правильный фолдинг белков, препятствуют их агрегации и даже могут разрушать уже сформированные агрегаты. Первые гипотезы о роли шаперонинов в развитии нейродегенеративных заболеваний основывались на данных о способности последних предотвращать агрегацию белков. То есть считалось, что повышение концентрации шаперонинов в организме приведёт к разрушению амилоидных агрегатов и этим предотвратит развитие нейродегенеративных заболеваний. Такие подходы были проверены в ходе клинических испытаний для лечения болезни Гентингтона. Однако параллельно накапливались сведения о более сложной и противоречивой роли шаперонинов в развитии нейродегенеративных заболеваний. Во-первых, есть данные, что именно взаимодействие некоторых шаперонинов с амилоидогенными белками вызывает их патологическую трансформацию и инициирует образование амилоидных структур. Во-вторых, использование шаперонинов для разрушения менее токсичных амилоидных фибрилл может привести к появлению небольших нейротоксичных олигомерных форм белков.

Цели и задачи

Целью данной работы является выяснение возможности взаимодействия шаперонинов с амилоидными белками и установление роли шаперонинов в патологической трансформации амилоидных белков

Для реализации этой цели были поставлены следующие **задачи**:

1. С помощью биохимических методов продемонстрировать взаимодействие белков, склонных к амилоидной агрегации, с шаперонинами, полученными из разных организмов, и выяснить влияние такого взаимодействия на патологическую трансформацию амилоидогенных белков.
2. С помощью электронной микроскопии оценить влияние эукариотического шаперонина TRiC на формирование амилоидных агрегатов прионного белка.

3. Методом криоэлектронной микроскопии получить структуры комплекса GroEL-GroES с высоким разрешением и выяснить роль АТФ в формировании структуры этого шаперонина.
4. С помощью метода криоэлектронной микроскопии установить возможность образования комплекса GroEL-GroES с мономерными формами прионного белка и альфа-синуклеина, а также выяснить расположение амилоидных белков в активном центре шаперонина.
5. Установить структуру эукариотического шаперонина TRiC методом криоэлектронной микроскопии.

Научная новизна

В данной работе с помощью биохимических методов было впервые показано образование комплекса не только между бактериальным шаперонином GroEL-GroES и прионным белком, но и альфа-синуклеином в присутствии АТФ, приводящее к патологической трансформации обоих амилоидных белков. Также с помощью биохимических методов и электронной микроскопии было впервые показано образование комплекса между эукариотическим шаперонином TRiC и прионным белком в присутствии АТФ, также приводящее к патологической трансформации PrP. Более того методом криоэлектронной микроскопии была получена совершенно новая 3D структура комплекса бактериального шаперонина GroEL-GroES-АДФ₁₄ с высоким разрешением 3,4 Å, а также впервые была получена 3D структура комплекса эукариотического шаперонина TRiC, выделенного из семенников быка, с нуклеотидом АТФ-гамма-S с общим разрешением 4,5 Å.

Методом криоэлектронной микроскопии было впервые показано образование комплекса шаперонина GroEL с мономерной формой прионного белка и установлено, что прионный белок связывается со спиралью «i» апикальных доменов пяти из семи субъединиц GroEL. Эти данные, дополнительно изученные методом молекулярной динамики, позволили подтвердить предложенную нами гипотезу о том, что в полости GroEL связывается именно N-концевой домен прионного белка. В дополнение методом криоэлектронной микроскопии была получена 3D структура комплекса GroEL-альфа-синуклеин.

Теоретическая и практическая значимость

Выяснение механизмов влияния шаперонинов на патологическую трансформацию амилоидных белков, а именно прионного белка и альфа-синуклеина, позволит при развитии этого исследования дать практические рекомендации по профилактике и

лечению синуклеинопатий, поскольку в их возникновении ключевую роль играет альфа-синуклеин, а также губчатых энцефалопатий, связанных с патологической трансформацией прионного белка. Кроме того, выяснение роли шаперонина GroE в трансформации прионного белка, позволит выяснить роль микробиоты желудочно-кишечного тракта в передаче инфекционных форм белка, поскольку механизмы такой передачи практически не изучены.

Методология исследования

В исследовании были использованы биохимические, физико-химические и биоинформатические методы и криоэлектронная микроскопия. Все использованные методики были применены в соответствии с общепринятыми мировыми стандартами и с надлежащими контролями. Методы выделения бактериального комплекса шаперонинов GroEL-GroES, рекомбинантных овечьего прионного белка и α -синуклеина человека из *E. coli*, а также эукариотического шаперонина TRiC из семенников быка были разработаны и ранее апробированы коллективом лаборатории.

Положения, выносимые на защиту

1. Доказано образование комплексов между шаперонинами, выделенными из разных организмов, и амилоидогенными белками в присутствии АТФ, что приводит к патологической трансформации последних.
2. Методом криоэлектронной микроскопии получены 3D структуры выделенных из разных организмов шаперонинов с нуклеотидами в высоком разрешении.
3. Методом криоэлектронной микроскопии подтверждено образование комплекса бактериального шаперонина GroEL с мономерами разных амилоидогенных белков.
4. Методом молекулярной динамики подтверждена выдвинутая нами гипотеза о пути формирования комплекса бактериального шаперонина GroEL с прионным белком.

Степень достоверности данных

Данные, представленные в работе, получены с использованием современных молекулярно-биологических, биохимических и структурных методик и воспроизводимы. Также была проведена статистическая обработка результатов.

Личный вклад автора

Основные результаты работы были получены самим автором. Личный вклад автора в проведённое исследование заключался в сборе и анализе данных литературы, в планировании и проведении экспериментов, в подготовке образцов для всех видов электронной и криоэлектронной микроскопии, в анализе и оформлении полученных

результатов, в подготовке материалов к печати, в представлении результатов на научных конференциях.

Е.Б. Пичкур получил данные методом криоэлектронной микроскопии и обработал их; электронная микроскопия с негативным контрастированием комплексов эукариотического шаперона TRiC с разными формами прионного белка была выполнена А.В. Моисеенко; молекулярную динамику подготовила И.С. Панина.

Публикации по теме диссертации

По материалам диссертации опубликовано 5 экспериментальных и 2 обзорных статьи в рецензируемых журналах, индексируемых в наукометрических базах данных Web of Science и/или Scopus.

Апробация результатов

Результаты работы были представлены на международных конференциях: Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2019» (Россия, Москва, 2019); 11th International Conference Structure and Stability of Biomacromolecules (Словакия, Кошице, 2019); Microscopy and Microanalysis 2020 и 2021 (виртуальные, США); The 45th FEBS Congress (Словения, Любляна, 2021); III Объединенный Научный Форум Физиологов, Биохимиков И Молекулярных Биологов (Россия, Сочи, 2022).

Структура диссертации

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, полученных результатов и их обсуждения, заключения, основных результатов и выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 124 страницах, иллюстрирована 34 рисунками и 2 таблицами. Список цитируемой литературы включает 182 наименования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектами исследования были бактериальный комплекс шаперонинов GroEL-GroES, эукариотический шаперонин TRiC, рекомбинантный овечий прионный белок (PrP) и рекомбинантный α -синуклеин дикого типа человека (α -syn).

Шаперонин GroEL и ко-шаперонин GroES выделяли по методике Корралеса и Фершта с некоторыми модификациями (Corrales and Fersht, 1996) и хранили в 25 mM Tris-HCl буфере, pH 7,4 в присутствии 100 mM KCl и 15% глицерола при температуре -80°C. **Шаперонин TRiC** выделяли с помощью разработанного в нашей лаборатории метода [Naletova et al., 2011], который представляет собой комбинацию двух ранее известных методологий: [Norcum, 1996] и [Ferreira and Frydman, 2000]. TRiC хранили в 20 mM буфере HEPES, pH 7,2 в присутствии 100 mM NaCl и 5% глицерола при температуре -80°C. **Производство рекомбинантных белков** проводили в *E.coli*. Для очистки прионного белка использовали аффинную хроматографию на Ni—связанной сефарозе вследствие наличия у PrP сродства к металлам (Rezaei et al., 2000). Очистку α -синуклеина проводили методом кислотного осаждения примесных белков. Для **получения олигомеров и протофибрилл прионного белка** 0,5 мг/мл PrP инкубировали в 20 mM MOPS буфер, pH 7,5 1 ч без перемешивания при 65°C. **Получение фибрилл PrP** проводили в 100 mM натрий-ацетатном буфере, pH=4,0 с добавлением 1 M гуанидингидрохлорида и 0,03% азиды натрия при концентрации 2 мг/мл, при 37°C и 300 об/мин в течение 48 ч. Для **приготовления фибрилл α -синуклеина** 0,4 мг/мл белка инкубировали в буфере PBS, pH 4,0 при 37°C и 300 об/мин в течение 72 ч. **Спектры флуоресценции ThT** прописывали на спектрофлуориметре FluoroMax-3 (Horiba Jobin Yvon, Франция) при длине волны возбуждающего света 435 нм. **Интенсивность флуоресценции ThT** измеряли при длине волны возбуждения 430 нм и регистрировали эмиссию при 490 нм на планшетном ридере CLARIOstar (BMG LABTECH GmbH, Германия). **Контроль среднего размера частиц** всех форм прионного белка, а также изучение размера образующихся белковых комплексов проводили методом динамического светорассеяния на приборе Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments, Malvern, Великобритания). **Взаимодействие белковых молекул** также изучали с помощью иммуноферментного анализа и трансмиссионной электронной микроскопии негативного контрастирования. Структурный анализ образовавшихся белковых комплексов проводили **методом криоэлектронной микроскопии**. Часть полученных данных далее анализировали методом молекулярной динамики.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Изучение взаимодействия бактериального комплекса шаперонинов GroEL-GroES с белками, склонными к амилоидной агрегации

На данном этапе мы исследовали взаимодействие белковых молекул биохимическими и физико-химическими методами.

1.1. Взаимодействие комплекса GroEL-GroES с разными формами прионного белка

В начале нашей работы мы оценили возможность связывания прионного белка с бактериальным шаперонином GroEL. Для этого нами был выбран метод иммуноферментного анализа с использованием моноклональных антител, взаимодействующих с С-концевым доменом прионного белка. Как следует из рисунка 1, использованные нами антитела эффективно связываются не только с мономерами PrP, но и с другими формами данного белка, а именно: с олигомерами, протофибриллами и фибриллами. В свою очередь, бактериальный шаперонин GroEL не детектируется подобранными нами первичными антителами. После инкубации GroEL с разными формами прионного белка происходит образования комплекса шаперонина с PrP, о чём свидетельствует зафиксированный нами уровень сигнала, который во много раз превышает уровень сигнала в контрольной пробе с GroEL.

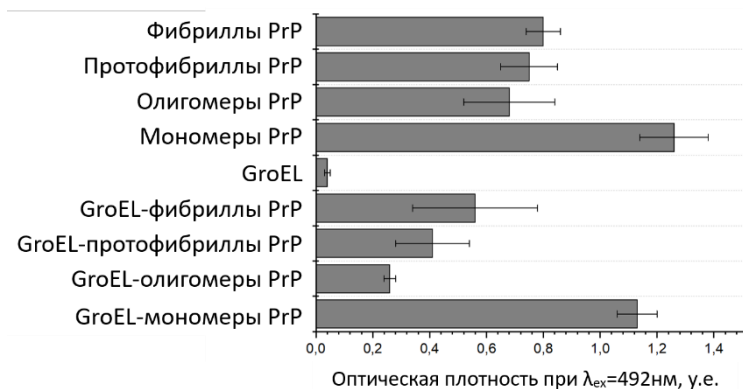


Рисунок 1. Взаимодействие бактериального шаперонина GroEL с разными формами прионного белка, выявленное методом иммуноферментного анализа с помощью антител на С-конец мономера PrP. На диаграмме представлена величина оптической плотности при $\lambda=492$ нм в разных пробах. Данные

получены с помощью планшетного спектрофотометра State Fax 2100 и представлены как экспериментальные значения ($n=6$) с указанием стандартного отклонения от среднего. Все образцы инкубировались со вторичными антителами (anti-mouse), связанными с пероксидазой хрена (1 мкг/мл в PBST).

Поскольку нам было интересно, к чему может привести взаимодействие шаперонина с белком, склонным к амилоидогенной трансформации, в условиях живого организма, мы добавили в систему бактериальный ко-шаперонин GroES, АТФ и ионы Mg^{2+} , чтобы получить работающий комплекс GroEL-GroES. Метод динамического

светорассеяния показал, что после 2-часовой инкубации мономерных (рис. 2А) и олигомерных (рис. 2Б) форм прионного белка с таким активно работающим бактериальным комплексом в растворе образуются очень крупные частицы, превышающие размер исходных молекул в 100 раз. Высокий уровень флуоресценции тиофлавина Т на спектрах, представленных справа на рисунке 2, указывает на то, что полученные белковые агрегаты обладают амилоидной структурой. То же самое справедливо и для агрегатов, которые получились при инкубировании комплекса шаперонинов с протофибриллами (рис. 2В) и фибриллами (рис. 2Г) PrP. Однако в этом случае мы наблюдали образование не только крупных, но и небольших частиц, которые своим размером напоминают либо одиночные молекулы либо молекулы, связанные с GroEL-GroES. Таким образом, получается, что бактериальный комплекс шаперонинов в присутствии Mg^{2+} -АТФ может как вызывать агрегацию прионного белка, так и наоборот работать в качестве дезагрегационного агента.

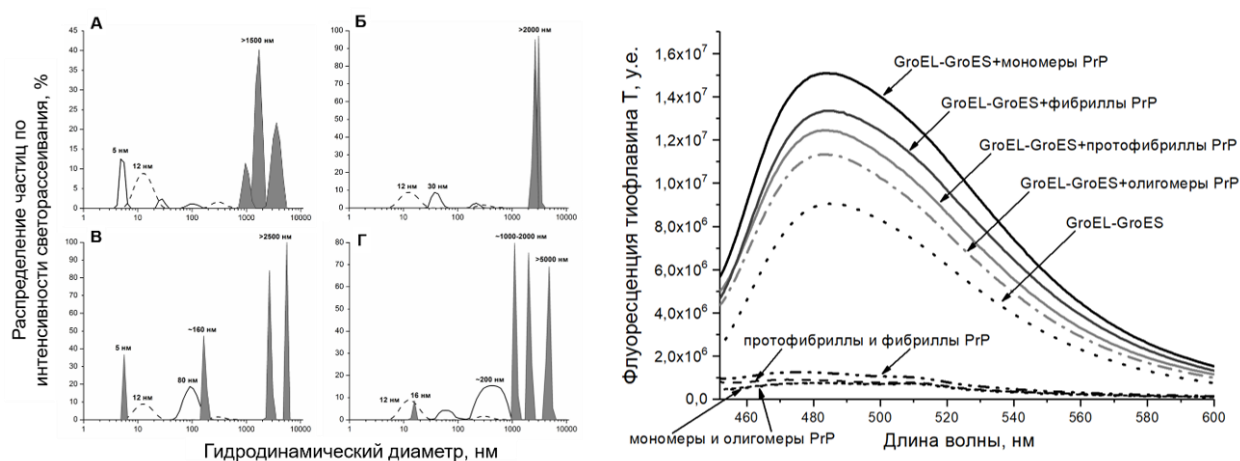


Рисунок 2. Распределение числа частиц по интенсивности светорассеивания, определённое по измерению параметров динамического светорассеивания, (слева) и спектры флуоресценции тиофлавина Т (справа) в образцах, полученных после 2-часовой совместной инкубации разных форм прионного белка с бактериальным комплексом шаперонинов GroEL-GroES в присутствии Mg^{2+} -АТФ. На левой части рисунка сплошной линией обозначены размеры разных формы PrP, пунктиром - комплекса GroEL-GroES, серым цветом - результаты совместной инкубации белков. 0,6 мкМ бактериального комплекса шаперонинов GroEL-GroES инкубировали с А) 0,6 мкМ мономеров PrP; Б) 0,6 мкМ олигомеров PrP; В) 0,6 мкМ “протофибрилл” PrP; Г) 0,6 мкМ фибрилл PrP.

1.2 Взаимодействие комплекса GroEL-GroES с альфа-синуклеином

На следующем этапе работы была исследована возможность взаимодействия бактериального шаперонина GroEL с другим амилоидным белком - альфа-синуклеином. Для этого мы применили метод иммуноферментного анализа с использованием моноклональных антител на альфа/бета-синуклеин. Как следует из приведенных на

рисунке 3А данных, при добавлении к шаперонину GroEL фибрилл альфа-синуклеина происходит образование комплекса. Однако в случае добавления к шаперонину мономеров α -syn уровень сигнала в пробе оставался практически таким же, как и в контрольной пробе с шаперонином GroEL. Это может свидетельствовать как о неспособности мономеров амилоидного белка связываться с GroEL, так и об экранировании антигенных детерминант альфа-синуклеина при его попадании во внутреннюю полость шаперонина, так как молекула α -syn обладает достаточно маленьким размером, за счёт чего связывание молекулы может происходить глубоко в полости GroEL.

Кроме того, нами было исследовано влияние рабочего (в присутствии Mg^{2+} -АТФ) бактериального комплекса шаперонов GroEL-GroES на амилоидозацию альфа-синуклеина, оцениваемую по увеличению флуоресценции тиофлавина Т. Данные, приведенные на рис. 3Б, свидетельствуют о том, что при высокой концентрации альфа-синуклеина (10-кратный избыток по отношению к шаперонину) добавление GroEL увеличивает образование амилоидных форм белка в 4 раза. Данный факт указывает на то, что мономеры α -syn скорее всего всё же связываются с исследуемым шаперонином. Вероятно, при высоких концентрациях α -синуклеина GroEL стимулирует фибриллизацию, например, за счёт перехода в раствор изменённых форм амилоидного белка, склонных к патологической агрегации. Нельзя исключить также, что связанный с шаперонином альфа-синуклеин является «затравкой» для образования фибрилл.

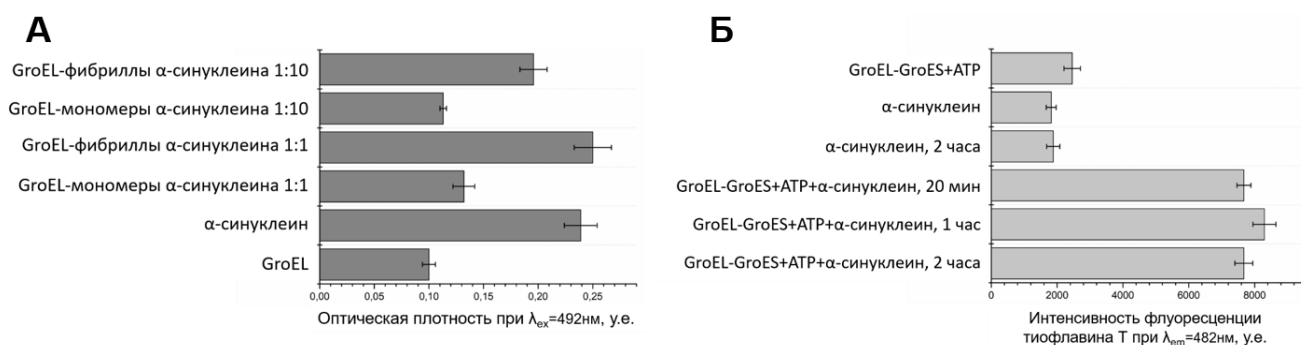


Рисунок 3. (А) Взаимодействие бактериального шаперонина GroEL с разными формами альфа-синуклеина, выявленное методом иммуноферментного анализа с помощью моноклональных антител на альфа/бета-синуклеин. (Б) Флуоресценция тиофлавина Т при взаимодействии бактериального комплекса шаперонинов GroEL-GroES с 10-кратным избытком мономеров альфа-синуклеина в присутствии Mg-АТФ в течение разного времени. Все данные представлены как экспериментальные значения ($n=6$) с указанием стандартного отклонения от среднего. На диаграмме А представлена величина оптической плотности при $\lambda_{ex}=492$ нм в разных пробах. Данные получены с помощью планшетного спектрофотометра State Fax 2100. На диаграмме Б представлена интенсивность флуоресценции тиофлавина Т при $\lambda_{em}=482$ нм в разных пробах.

2. Взаимодействие эукариотического шаперонина TRiC с разными формами прионного белка

На следующем этапе мы также исследовали возможность взаимодействия разных форм прионного белка уже с эукариотическим шаперонином. Для работы нами был выбран эукариотический шаперонин TRiC, который мы выделяли из семенников быка. Этих животных, как и овец, являющихся источником PrP, относят к семейству Полорогих.

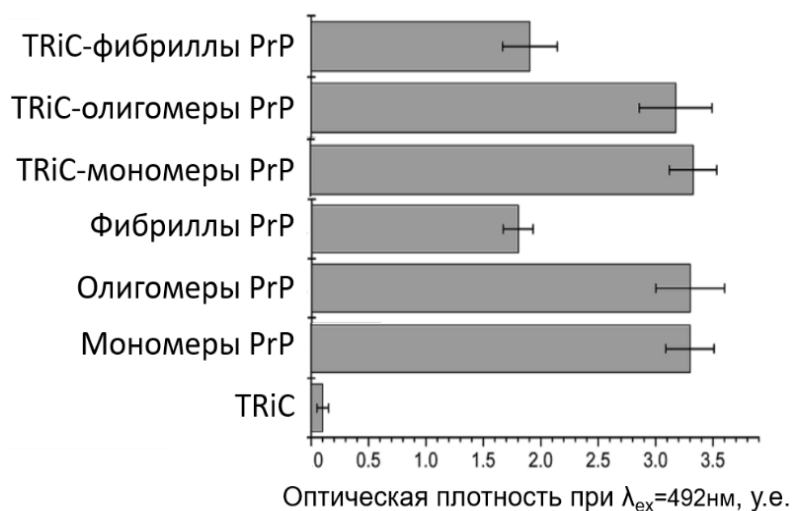


Рисунок 4. Взаимодействие эукариотического шаперонина TRiC с разными формами прионного белка, выявленное методом иммуноферментного анализа с помощью антител на С-конец мономера PrP. На диаграмме представлена величина оптической плотности при $\lambda=492$ нм в разных пробах. Данные получены с помощью планшетного спектрофотометра State Fax 2100 и представлены как экспериментальные значения

($n=6$) с указанием стандартного отклонения от среднего. Все образцы инкубировались со вторичными антителами (*anti-mouse*), связанными с пероксидазой хрена (1 мкг/мл в PBST).

Для начала мы убедились в том, что шаперонин TRiC способен связываться с разными формами PrP. Связывание белков было подтверждено методом иммуноферментного анализа (рис. 4) с применением тех же антител что и в случае с бактериальным шаперонином GroEL. Затем мы приготовили образцы, в которых белки ко-инкубировались в течение 2 часов в присутствии АТФ и ионов Mg^{2+} , необходимых для полноценной работы шаперонина. Результат взаимодействия функционально активного TRiC с разными формами прионного белка мы изучили методом динамического светорассеивания, с помощью флуоресценции тиофлавина Т (рис. 5), а также с помощью электронной микроскопии с применением негативного контрастирования (рис. 6).

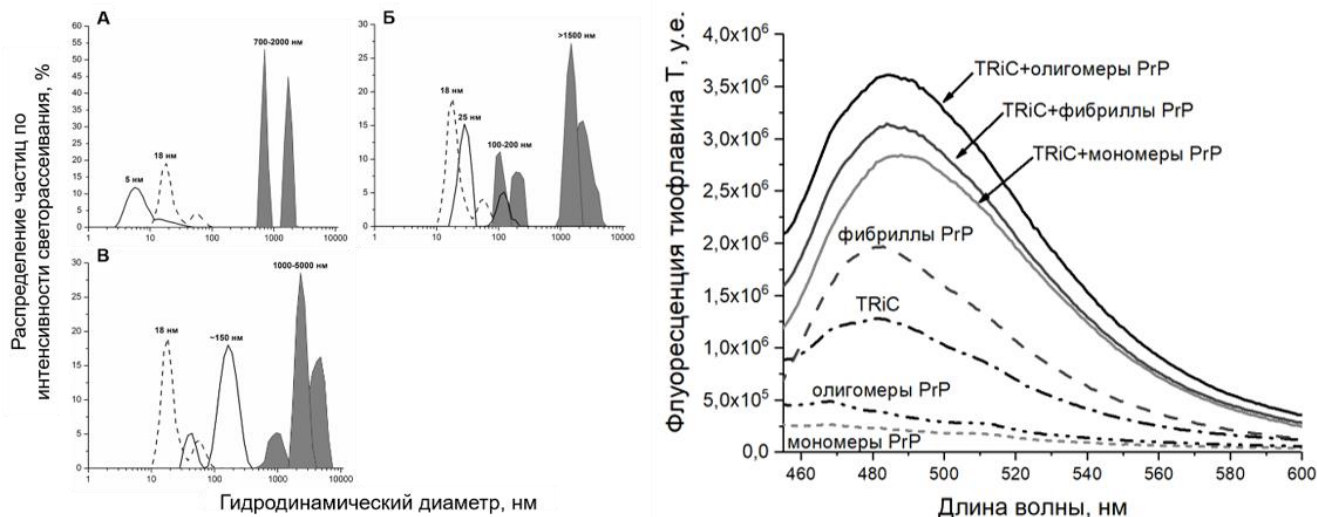


Рисунок 5. Распределение числа частиц по размеру, определённое по измерению параметров динамического светорассеяния (слева), и спектры флуоресценции тиофлавина Т (справа) в образцах, полученных после 2-часовой совместной инкубации разных форм прионного белка с эукариотическим шаперонином TRiC в присутствии Mg^{2+} -АТФ. На левой части рисунка сплошной линией обозначены размеры разных формы PrP, пунктиром – шаперонина TRiC, серым цветом - результаты совместной инкубации белков.

0,6 мкМ эукариотического шаперонина TRiC инкубировали с А) 0,6 мкМ мономеров PrP; Б) 0,6 мкМ олигомеров PrP; В) 0,6 мкМ фибрилл PrP.

Динамическое светорассеивание показало, что после ко-инкубации эукариотического шаперонина с любой из форм амилоидогенного белка в растворе образуются крупные частицы. Уровень флуоресценции тиофлавина Т, представленный в виде спектров справа на рисунке 5, в свою очередь, указывает на амилоидную природу образовавшихся агрегатов. Интересно то, что образование более крупных агрегатов наблюдается из мономеров PrP (рис. 5А), тогда как из олигомеров формируются и относительно небольшие частицы диаметром 100-200 нм, хотя олигомеры PrP уже изначально содержат в своём составе прионный белок в инфекционной изоформе “scrapie”, что должно делать их склонными к амилоидной агрегации. Эту закономерность подтверждают данные, полученные с помощью электронной микроскопии: на рисунке 6А видно, что при инкубации шаперонина TRiC с мономерами PrP образуются преимущественно удлинённые фибриллы, а в случае олигомеров (рис. 6Б) – более короткие. В свою очередь, взаимодействие эукариотического шаперонина с фибриллами PrP приводит к тому, что частицы TRiC как будто налипают поверх длинных фибрилл, возможно за счёт электростатических взаимодействий (рис. 6В).

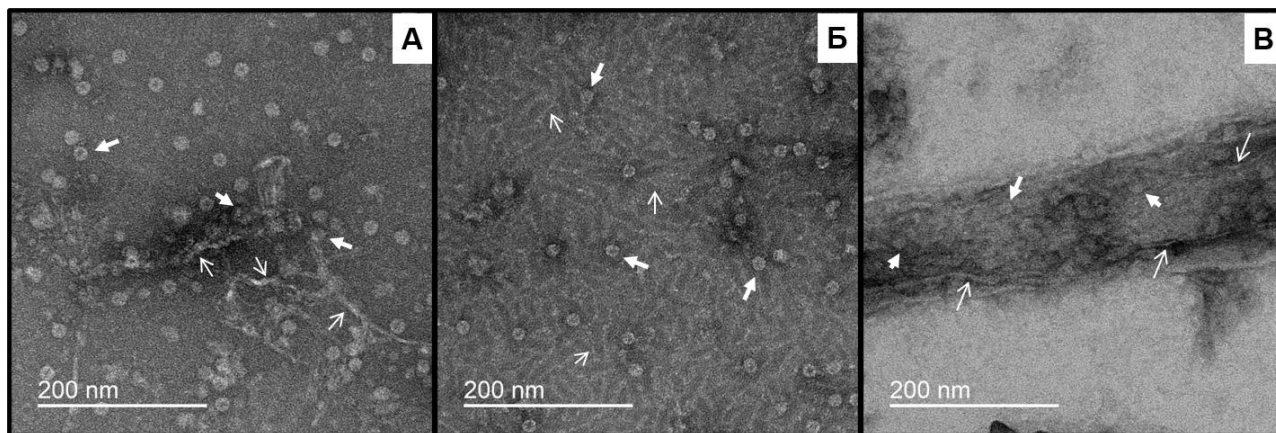


Рисунок 6. Микрографии агрегатов, обнаруженных в образцах после инкубации разных форм прионного белка с эукариотическим шаперонином TRiC. А – мономеры PrP; Б – олигомеры PrP; В – фибриллы PrP. Тонкие стрелки указывают на агрегаты PrP, жирные - на TRiC. Формы PrP в концентрации 0,6 мкМ (в пересчете на мономер) инкубировали в течение 2 ч в присутствии 0,6 мкМ TRiC в растворе, содержащем 10 мМ KH_2PO_4 , 1 мМ ЭДТА, 5 мМ β -меркаптоэтанол, 2 мМ Mg^{2+} -АТФ, pH 7,5. Образцы наносили на обработанную тлеющим разрядом медную сетку с углеродным покрытием, а затем окрашивали 1% раствором уранилацетата. Исследование проводили на электронном микроскопе JEOL JEM-2100 (JEOL, Япония)

3. Изучение комплексов шаперонинов с белками, склонными к амилоидной агрегации, методом криоэлектронной микроскопии

Для визуализации полученных нами *in vitro* комплексов шаперонинов с амилоидными белками мы использовали появившийся относительно недавно метод криоэлектронной микроскопии, который помогает более детально изучить, что из себя представляют такие комплексы. Полученные в ходе этого эксперимента данные криоэлектронной микроскопии были расшифрованы и оформлены в виде рисунков нашим коллегой Евгением Борисовичем Пичкуром из национального исследовательского центра "Курчатовский Институт".

3.1. Комплекс GroEL-GroES-АДФ

Перед тем как начать работать с полученными в ходе экспериментов белковыми комплексами, мы посчитали необходимым наладить работу нового для нас метода. Для этого мы решили разрешить структуру комплекса GroEL-GroES – популярного объекта для структурных исследований, и сравнить полученные данные с уже существующими.

Для получения более стабильной структуры мы инкубировали GroEL с GroES в присутствии Mg-АТФ. Однако процесс заморозки образцов для криоэлектронной микроскопии занял больше времени, чем мы планировали. Поэтому мы решили проверить, какая часть АТФ успела превратиться в АДФ, так как комплекс шаперонинов

сам по себе обладает слабой АТФ-азной активностью. С помощью энзиматического метода определения концентрации АДФ (рис. 7) мы выяснили, что за время инкубации GroEL с GroES, которое составило 60 минут, 80% АТФ превратилось в АДФ. Поскольку согласно общепринятой гипотезе о рабочем цикле шаперонинов диссоциация АДФ из комплекса происходит при связывании последним АТФ в противоположном кольце, мы предположили, что скорей всего замороженные нами образцы будут содержать комплекс GroEL-GroES-АДФ. Этот комплекс в отсутствии АТФ можно считать довольно стабильным, что является положительной характеристикой для изучения образца методом криоэлектронной микроскопии. Поэтому мы продолжили работать с сетками, на которые были нанесены описанные выше пробы.

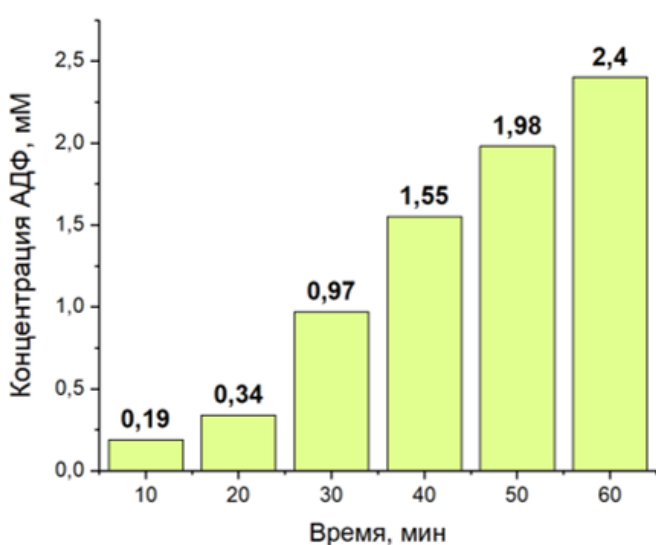


Рисунок 7. Изменение концентрации АДФ в среде, содержащей бактериальный комплекс шаперонинов GroEL-GroES, измеренное энзиматически. Реакционная смесь содержала 50 мМ HEPES-NaOH pH 8,0; 100 мМ KCl; 1 мМ MgCl₂; 2,5 мМ фосфоенолпирувата, 125 мкМ НАДН, по 40 ед/мл пируваткиназы и лактатдегидрогеназы. К ней добавляли аликвоту смеси, содержащей АДФ, и измеряли оптическую плотность при длине волны 340 нм с помощью спектрофотометра Shimadzu UV-1601

UV/VIS Visible. Расчёт концентрации АДФ проводили по уравнению, полученному из калибровочной кривой.

В процессе обработки полученных методом криоэлектронной микроскопии данных мы провели трёхмерную классификацию частиц с наложением симметрии C7 для того, чтобы исследовать конформационный ландшафт полученных комплексов и уточнить тип нуклеотидов, лежащих в экваториальных доменах субъединиц GroEL. После дополнительного уточнения были определены два равных основных класса частиц с различной ориентацией апикальных доменов в транс-кольце, не связанном с GroES. В первой структуре апикальные домены расположены ближе к оси симметрии, чем во второй. Различия в положении доменов отчётливо видны, если наложить друг на друга электронные плотности, принадлежащие обеим структурам (рис. 7В). В итоге, мы приняли решение в дальнейшем называть конформации “узкая” (рис. 7А) и “широкая” (рис. 7Б) соответственно. Среднее расчётное разрешение обоих комплексов составило 3,4 Å. Наилучшее значение (около 3,0 Å) наблюдается в областях

экваториальных доменов GroEL, отвечающих за межкольцевые контакты и связывание нуклеотидов. При таком разрешении и благодаря сравнению наших структур с уже представленными в базе данных PDB структурами GroEL-GroES-нуклеотид мы можем с уверенностью заключить, что субъединицы обоих колец содержат нуклеотиды в карманах для их связывания и что, с высокой долей вероятности, этот нуклеотид - АДФ.

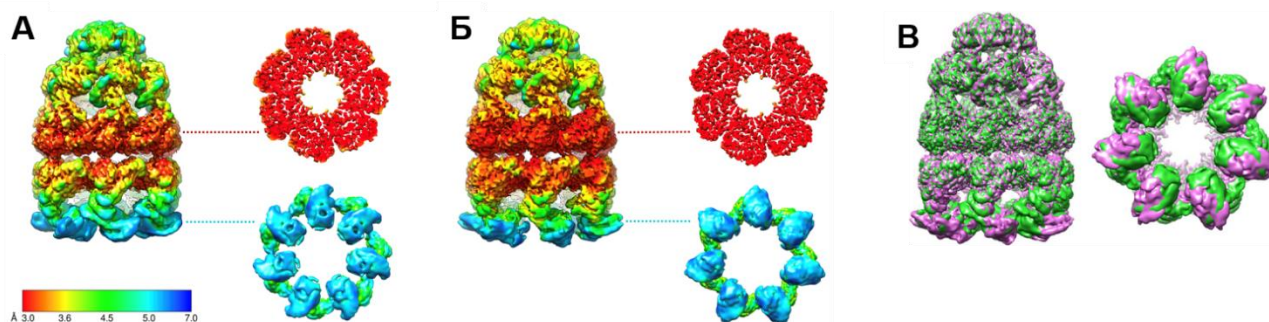


Рисунок 8. Структуры пулевидного комплекса GroEL-GroES-нуклеотиды с симметрией $C7$, полученные методом криоэлектронной микроскопии. Окрашенные в соответствии со своим локальным разрешением “узкая” (A) и “широкая” (B) конформации комплекса GroEL-GroES показаны вместе со срезами на уровне экваториальных доменов транс-кольца и апикальных доменов цис-кольца для дополнительной визуализации конформационных различий. (B) Наложенные друг на друга карты электронной плотности “узкой” (зелёный цвет) и “широкой” конформации (фиолетовый цвет) - вид сбоку и со стороны транс-кольца. Данные получены и обработаны совместно с Е.Б. Пичкуром из НИЦ “Курчатовский Институт” с помощью микроскопа Titan Krios.

Мы проанализировали все комплексы GroEL-GroES-нуклеотид, которые нашли в базе данных PDB. Оказалось, что структуры комплексов GroEL-GroES, которые называют “пулями”, разрешались как с помощью рентгеноструктурного анализа (с разрешением 2,8 - 3 Å) так и с помощью криоэлектронной микроскопии (7,7–15,9 Å). Во всех случаях нуклеотид АДФ или его негидролизуемый аналог АДФ-Mg-AlF₃ были обнаружены только в том кольце, которое связано с ко-шаперонином GroES. В свою очередь, структуры комплексов GroEL-GroES₂ - по-другому “футбольных мячей” - были получены методом рентгеноструктурного анализа с разрешением 3,6–3,8 Å. Нуклеотид-связывающие карманы обоих колец у этих структур заняты либо АТФ, либо его негидролизуемым аналогом АДФ-BeFx. Из этого следует, что наши структуры отличаются от всех представленных в базе данных.

Изучая базу данных PDB, мы обнаружили, что в 2006 году научный коллектив под руководством N. A. Ranson разрешил структуру нескольких комплексов GroEL-GroES-нуклеотид и на основе полученных данных предложил схему рабочего АТФ-азного цикла бактериального шаперонина (рис. 9A).

Хотя полученные нами 3D структуры отличаются от упомянутых выше по нуклеотидному состоянию транс-колец, “широкая” конформация комплекса GroEL-GroES-АДФ₁₄ в значительной степени совпадает по строению со структурой 2C7D, которая указана на рисунке 9А под цифрой 3, поэтому мы посчитали возможным предположить, какое место в обозначенном АТФ-азном цикле комплекса GroEL-GroES теоретически могут занимать наши структуры. Предложенная нами гипотеза представлена на рисунке 9Б: “широкая” конформация может быть следующим шагом после стадии, обозначенной цифрой 3, когда комплекс GroEL-АДФ₇-GroES начинает связывать молекулы АТФ в транс-кольце, но апикальные домены транс-кольца еще не совершили своё вращение, а в случае нашей структуры это уже произошло. Тогда “узкая” конформация может быть следующим этапом цикла, а именно тем, который на рисунке 9А обозначен цифрой 4.

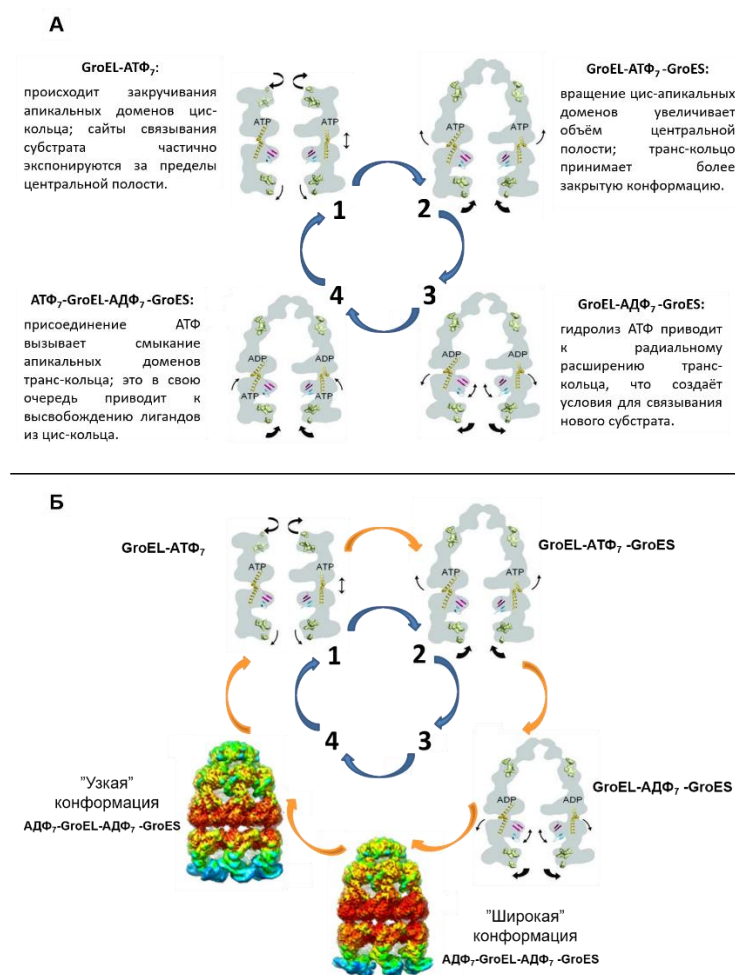


Рисунок 9. Схема аллостерических изменений в структурах бактериального шаперонина GroEL, происходящие на протяжении АТФ-азного цикла.

(А) Составленная на основе данных, взятых из статьи Ranson N.A., et al. 2006 г. Структуры, важные для рассмотрения аллостерического механизма, выделены цветом и наложены на осевое сечение GroEL.

- 1) Комплекс GroEL-АТФ₇; связывание АТФ с верхним кольцом вызывает удлинение всего комплекса с закручиванием апикальных доменов.
- 2) Комплекс GroEL-АТФ₇-GroES. Транс-кольцо более замкнутое.
- 3) GroEL-АДФ₇-GroES. Всё транс-кольцо расширяется радиально, создавая новое акцепторное состояние субстрата.
- 4) АТФ₇-GroEL-АДФ₇-GroES. Транс-кольцо сжимается, и внутрикольцевой контакт восстанавливается.

(Б) Дополненная полученными нами 3D структурами бактериального комплекса шаперонинов GroEL-GroES-АДФ₁₄ после сравнительного анализа данных, полученных методом криоэлектронной микроскопии.

Полученные результаты показывают, что при высоком соотношении АДФ к АТФ в среде [5:1] и без развёрнутого субстрата имеет место только асимметричный цикл

работы GroEL-GroES. Тот факт, что у подавляющего большинства представленных в образце частиц GroEL-GroES оба кольца заняты АДФ, свидетельствует о том, что указанное состояние является предельной стадией асимметричного цикла при нехватке АТФ. Впервые похожие тезисы выдвинули X. Ye и G. H. Lorimer в своей статье 2013 года, изучая АТФ-азный цикл бактериального комплекса GroEL-GroES методом FRET. Похоже, что с помощью криоэлектронной микроскопии мы смогли подтвердить существование указанных стадий асимметричного рабочего цикла GroEL-GroES.

3.2. Комплекс бактериального шаперонина GroEL с прионным белком

Согласно полученным нами данным, GroEL способен связываться с прионным белком даже будучи в апоформе (рис. 1). Поэтому для начала мы решили изучить более простую систему и посмотреть структуру чистого комплекса GroEL-PrP. В ходе исследования мы обнаружили, что полученная методом криоэлектронной микроскопии карта электронной плотности (рис. 10) содержит дополнительную плотность в области апикальных доменов одного из колец GroEL, если сравнить её со структурами апоформы шаперонина.

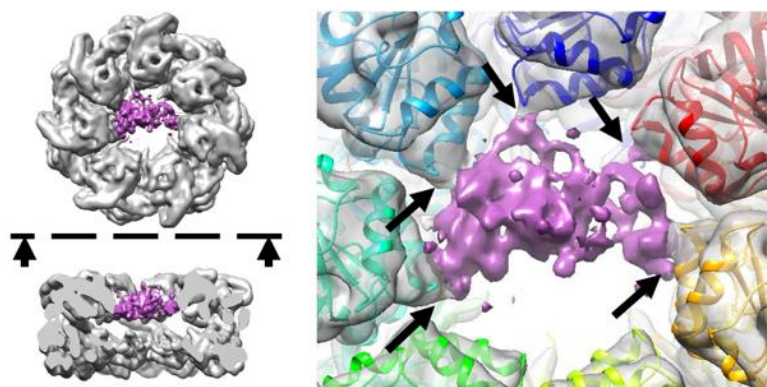


Рисунок 10. Карта электронной плотности образовавшегося комплекса бактериального шаперонина GroEL с мономером прионного белка, полученная методом криоэлектронной микроскопии. Вид сверху. Пунктирная линия и стрелки на левой части рисунка указывают направление разреза. Данные

получены методом криоэлектронной микроскопии. Черные стрелки на правой части рисунка указывают на контакты между PrP и альфа спиралями “i” субъединиц шаперонина GroEL. Данные получены и обработаны совместно с Е.Б. Пичкуром из НИЦ “Курчатовский Институт” с помощью микроскопа Titan Krios.

Указанная дополнительная электронная плотность образует контакты со спиралями “i” пяти из семи апикальных доменов GroEL. Следует отметить, что именно эта спираль отвечает за связывание субстратов в полости бактериального шаперонина. Размер представленной дополнительной электронной плотности позволил нам предположить, что она принадлежит мономеру PrP, однако локальное разрешение полученной карты достаточно низкое предположительно за счёт высокой конформационной подвижности прионного белка. Этот факт не позволил нам точно вписать вторичную структуру

молекулы PrP в обнаруженную плотность. Тем не менее с помощью молекулярной динамики мы смогли предположить, какая часть молекулы прионного белка с большей вероятностью участвует во взаимодействии с GroEL. Для этого наша коллега из Института биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова И.С. Панина построила две модели взаимодействия шаперонина GroEL с молекулой прионного белка: когда комплекс GroEL-PrP формируется за счёт N-концевого домена PrP - GroEL-PrP(N) (рис. 11А) или за счёт С-концевого - GroEL-PrP(C) (рис. 11Б).

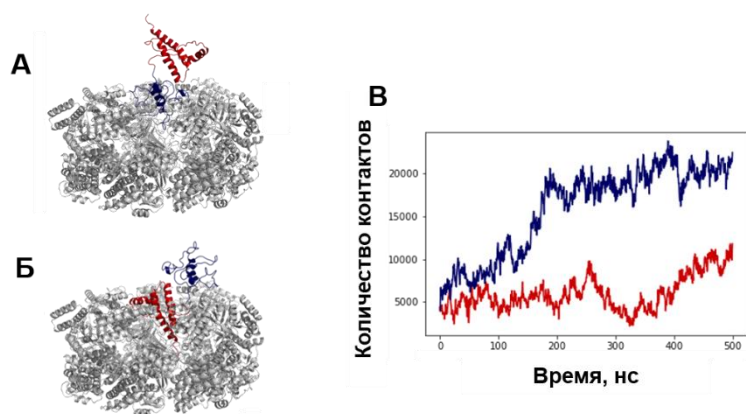


Рисунок 11. Формирование комплекса бактериального шаперонина GroEL с мономером прионного белка согласно данным, полученным методом молекулярной динамики. Серым цветом обозначен GroEL, синим - N-концевой домен PrP, красным - С-концевой домен PrP. А - визуализация гипотезы о том, что PrP взаимодействует с GroEL своим N-концевым доменом. В - визуализация гипотезы о том, что PrP взаимодействует с GroEL своим С-концевым доменом. С - динамика числа контактов между GroEL и N-концевым доменом (синяя) и С-концевым доменом (красная) PrP на протяжении траектории молекулярной динамики. Данные получила м.н.с. И.С. Панина из Института биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова.

своим N-концевым доменом. В - визуализация гипотезы о том, что PrP взаимодействует с GroEL своим С-концевым доменом. С - динамика числа контактов между GroEL и N-концевым доменом (синяя) и С-концевым доменом (красная) PrP на протяжении траектории молекулярной динамики. Данные получила м.н.с. И.С. Панина из Института биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова.

Исходя из полученных данных, мы видим, что количество контактов между GroEL и PrP увеличивается вдоль траекторий существования молекулярнодинамических симуляций (рис. 11В), что вероятно соответствует образованию и стабилизации комплекса GroEL-PrP. Однако при сравнении двух симуляций мы выделили несколько их отличительных особенностей. Во-первых, общее число контактов в комплексе GroEL-PrP(N) в два раза больше, чем в комплексе GroEL-PrP(C). Во-вторых, число контактов для GroEL-PrP(C) колеблется на протяжении всей траектории, а для GroEL-PrP(N) флуктуации уменьшаются после 200 нс. Мы также обнаружили, что в случае GroEL-PrP(N) целых пять субъединиц GroEL (А, С, D, F, G) оказываются тесно связанными с PrP, а в случае GroEL-PrP(C) таких субъединиц только две (А, Е). Поэтому с высокой долей вероятности мы можем заключить, что в нашем случае образовался именно комплекс GroEL-PrP(N). Полученные результаты подтверждают высказанную нами ранее гипотезу о том, что неструктурированный N-концевой домен прионного

белка связывается в полости GroEL и не может её покинуть, возможно так как не способен сформировать стабильную вторичную структуру. В то же время С-концевой домен PrP экспонируется во внешнюю среду и может участвовать в образовании амилоидных структур. Эта теория также объясняет, почему мы смогли детектировать образование комплекса GroEL-PrP с помощью антител на С-конец прионного белка.

3.3. Комплекс бактериального шаперонина GroEL с альфа-синуклеином

Поскольку биохимические методы показали, что ко-инкубация рабочего комплекса шаперонинов GroEL-GroES с альфа-синуклеином приводит к амилоидной трансформации последнего (рис. 3Б), мы решили получить 3D структуру комплекса GroEL с α -syn. Это могло бы помочь обосновать нашу гипотезу о том, что амилоидизация альфа-синуклеина вызвана именно взаимодействием этих двух белков.

На рисунке 12 представлена полученная нами карта электронной плотности комплекса GroEL-альфа-синуклеин, на которой в области апикальных доменов шаперонина видна дополнительная плотность, лежащая глубоко внутри полости. Эта плотность выявлена только в одном из колец GroEL и распределена между апикальными доменами нескольких соседних субъединиц. Площадь и характер связывания субстрата в полости шаперонина напоминают результат, полученный для комплекса GroEL-PrP (рис. 10). Однако поскольку альфа-синуклеин является неструктурированным белком, нет возможности точно вписать его вторичную структуры в карту электронной плотности. Также следует отметить, что полученные данные не противоречат нашему предположениям о том, почему антитела на α -syn не показали связывание GroEL с мономерами данного амилоидного белка.

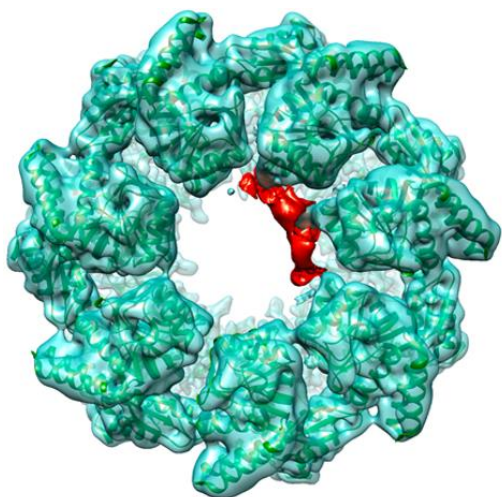


Рисунок 12. Карта электронной плотности образовавшегося комплекса бактериального шаперонина GroEL с мономером альфа-синуклеина, полученная методом криоэлектронной микроскопии. Вид сверху. Атомная модель для GroEL показана зелёным, участок карты, предположительно соответствующий α -синуклеину - красным. Данные получены и обработаны совместно с Е.Б. Пичкуром из НИЦ "Курчатовский Институт" с помощью микроскопа Titan Krios.

3.4. Комплекс эукариотического шаперонина TRiC прионным белком

После получения 3D структуры бактериального комплекса шаперонинов с высоким разрешением мы решили попробовать также разрешить и структуру эукариотического шаперонина, используя метод криоэлектронной микроскопии, так как все известные структуры шаперонина TRiC были ранее получены для рекомбинантного белка, выделенного из клеток дрожжей. Мы же для своих исследований выделяли нативный TRiC из семенников быка.

Процесс получения проб для крио-ЭМ был осложнён тем, что, хотя белок образовывал ровный слой на сетках, которые мы изучали с помощью электронной микроскопии с применением негативного контрастирования, при заморозке тех же проб в жидком этане шаперонин агрегировал, поэтому было трудно набрать достаточное для анализа количество одиночных частиц TRiC. В итоге, нам удалось улучшить ситуацию за счёт добавления в буфер стабилизаторов: глицерина и негидролизуемого аналога АТФ - АТФ-гамма-S. Результат 3D реконструкции представлен на рисунке 13. Разрешение экваториальных доменов составило 4,5 Å, в то время как апикальные домены разрешены существенно хуже.

Мы планируем продолжить оптимизировать условия для стабилизации молекул эукариотического шаперонина в условиях заморозки в жидком этане и получить структуру TRiC с более высоким разрешением всех доменов.

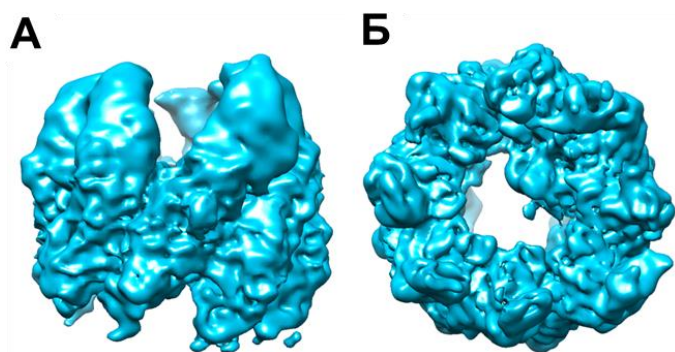


Рисунок 13. Карта электронной плотности комплекса эукариотического шаперонина TRiC с негидролизуемым аналогом АТФ (АТФ-гамма-S), полученная методом криоэлектронной микроскопии. Вид сбоку (А) и сверху (Б). Данные получены и обработаны совместно с Е.Б. Пичкуром из НИЦ

"Курчатовский Институт" с помощью микроскопа Titan Krios.

ВЫВОДЫ

1. С помощью биохимических и физико-химических методов доказано образование комплекса шаперонинов GroEL-GroES с прионным белком и альфа-синуклеином в присутствии АТФ, что явно приводит к патологической трансформации этих амилоидных белков.
2. С помощью биохимических и физико-химических методов, а также электронной микроскопии было впервые показано образование комплекса между эукариотическим шаперонином TRiC и прионным белком в присутствии АТФ, приводящее к патологической трансформации этих амилоидных белков.
3. Методом криоэлектронной микроскопии получена совершенно новая 3D структура комплекса бактериального шаперонина GroEL-GroES-АДФ₁₄ с высоким разрешением 3,4 Å, а также предварительная 3D структура эукариотического шаперонина TRiC с разрешением экваториальных доменов 4,5 Å.
4. Образование комплекса GroEL-PrP было подтверждено методом криоэлектронной микроскопии. При этом было обнаружено связывание мономера прионного белка со спиралью “i” апикального домен пяти субъединиц GroEL.
5. Данные, полученные методами молекулярной динамики и криоэлектронной микроскопии, подтвердили нашу гипотезу о том, что в гидрофобной полости GroEL связывается именно N-концевой домен прионного белка, а C-концевой домен остаётся свободным и может участвовать в амилоидной агрегации.
6. Методом криоэлектронной микроскопии была получена 3D структура комплекса GroEL-альфа-синуклеин. Картина расположения дополнительной электронной плотности альфа-синуклеина в полости GroEL схожа со наблюдаемой в комплексе GroEL-PrP.

**НАУЧНЫЕ СТАТЬИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ, ОПУБЛИКОВАННЫЕ В
ЖУРНАЛАХ SCOPUS, WOS, RSCI**

1. E.V. Leisi, K.V. Barinova, **S.S. Kudryavtseva**, A.V. Moiseenko, V.I. Muronetz, and L.P. Kurochkina (2022) Effect of bacteriophage-encoded chaperonins on amyloid transformation of alpha-synuclein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **622**, 136–142. – **JIF WOS:** 3,57 – (0,8/0,13)¹.
2. V.I. Muronetz, **S.S. Kudryavtseva**, E.V. Leisi, L.P. Kurochkina, K.V. Barinova, and E.V. Schmalhausen. (2022) Regulation by different types of chaperones of amyloid transformation of proteins involved in the development of neurodegenerative diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, **23**(5), 2747–18. - **JIF WOS:** 5, 92 – (1,89/0,38)¹.
3. **S.S. Kudryavtseva**, E.B. Pichkur, I.A. Yaroshevich, A.A. Mamchur, I.S. Panina, A.V. Moiseenko, O.S. Sokolova, V.I. Muronetz, and T.B. Stanishneva-Konovalova (2021). Novel cryo-EM structure of an ADP-bound GroEL-GroES complex. *Scientific reports*, **11**(1), 18241. - **JIF WOS:** 4,37 – (0,91/0,37)¹.
4. A.A. Mamchur, A.V. Moiseenko, I.S. Panina, I.A. Yaroshevich, **S.S. Kudryavtseva**, E.B. Pichkur, O.S. Sokolova, V.I. Muronetz and T.B. Stanishneva-Konovalova (2021). Structural and computational study of the GroEL–prion protein complex. *Biomedicines*, **9**(11), 1649. - **JIF WOS:** 6,08 – (1,16/0,19)¹.
5. И.С. Панина, А.А. Мамчур, И.А. Ярошевич, Д.В. Зленко, Е.Б. Пичкур, **С.С. Кудрявцева**, В.И. Муронец, О.С. Соколова, Т.Б. Станишнева-Коновалова (2021). Изучение конформационной подвижности GroEL методами криоэлектронной микроскопии и молекулярной динамики. *Кристаллография*, **66**(5), 821–828. - **РИНЦ:** 0,89 – (0,64/0,08)¹.
6. **S.S. Kudryavtseva**, Y.Y. Stroylova, L.P. Kurochkina, and V.I. Muronetz (2020). The chaperonin TRiC is blocked by native and glycated prion protein. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **683**, 108319. - **JIF WOS:** 4,01 – (0,88/0,35)¹.
7. V.I. Muronetz, K.V. Barinova, **S.S. Kudryavtseva**, M.V. Medvedeva, A.K. Melnikova, I.A. Sevostyanova, I., P.I. Semenyuk, Y.Y. Stroylova and M. Sova (2020) Natural and synthetic derivatives of hydroxycinnamic acid modulating the pathological transformation of amyloidogenic proteins. *Molecules*, **25**(20), 4647. - **JIF WOS:** 4,41 – (2,28/0,31)¹.

¹ В скобках приведен объём публикации в печатных листах и вклад автора в печатных листах.

**ДРУГИЕ НАУЧНЫЕ РАБОТЫ, ОПУБЛИКОВАННЫЕ ПО ТЕМЕ
ДИССЕРТАЦИИ:**

1. **С.С. Кудрявцева**, Л.П. Курочкина, Ю.Ю. Стройлова, В.И. Муронец (2022) Взаимодействие амилоидогенных белков с шаперонами, выделенными из разных групп организмов. *Acta Naturae*, Научные Труды III Объединенного научного форума (VII Съезд биохимиков, молекулярных биологов и физиологов России, X Российский симпозиум "Белки и пептиды" и VII Съезд физиологов СНГ), с. 77.
2. E. Pichkur, N. Fedorov, **S. Kudryavtseva**, I. Yaroshevich, O. Sokolova, V. Muronetz, and T. Stanishneva-Konovalova (2022) Complex of chaperonin GroEL–alpha-synuclein resolved by Cryo-EM. *Microscopy and Microanalysis*, **28** (S1), 1160–1161.
3. **S. Kudryavtseva**, E. Pichkur, I. Yaroshevich, V. Muronetz, O. Sokolova, and T. Stanishneva-Konovalova (2021) Nucleotide-bound conformations of the GroEL-GroES1 complex resolved by Cryo-EM. *FEBS open bio*, **11**(S1): P–04.2–07.
4. E. Pichkur, **S. Kudryavtseva**, O. Sokolova and T. Stanishneva-Konovalova (2020) Cryo-EM structure of GroEL in complex with the prion protein. *Microscopy and Microanalysis*, **26** (S1), 1–4.
5. **Kudryavtseva S.**, Stroylova Y., Stanishneva-Konovalova T., Pichkur E., Moiseenko A., Muronetz V. (2019) Interaction of the GroEL/GroES chaperonin complex with amyloidogenic proteins. Book of Contributions, 11th International Conference Structure and Stability of Biomacromolecules, p. 100-101.