

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА
НИИ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ имени А.Н. БЕЛОЗЕРСКОГО

На правах рукописи

Кудрявцева София Станиславовна

**Взаимодействие амилоидогенных белков
с шаперонинами**

1.1.10 - Биомеханика и биоинженерия

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
д.б.н., профессор Муронец Владимир Израилевич

Москва – 2023

Оглавление

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ	5
1. Актуальность	5
2. Степень разработанности темы	5
3. Цели и задачи	6
4. Научная новизна.....	7
5. Теоретическая и практическая значимость.....	8
6. Методология исследования	8
7. Положения, выносимые на защиту.....	9
8. Степень достоверности данных	9
9. Личный вклад автора.....	9
10. Публикации по теме диссертации	10
11. Апробация результатов	11
12. Структура диссертации	12
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	13
1. Классификация шаперонов и их роль в организме	14
2. Влияние шаперонов на патологическую трансформацию амилоидогенных белков	17
2.1. Прионный белок	17
2.2. Альфа-синуклеин	19
3. Влияние амилоидогенных белков на работу шаперонов	22
4. Участие бактериальных шаперонов кишечной микробиоты в патологической трансформации амилоидогенных белков	25
5. Объекты исследования.....	27
5.1. Структура и функции прионного белка	28
5.2. Структура и функции альфа-синуклеина.....	31
5.3. Бактериальный комплекс шаперонинов GroEL-GroES	34
5.1. Эукариотический шаперонин TRiC.....	38
МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	42
МАТЕРИАЛЫ	42
МЕТОДЫ	43
1. Получение препаратов белков	43
1.1. Экспрессия, выделение и очистка бактериальных шаперонинов GroEL и GroES.....	43
1.2. Выделение и очистка эукариотического шаперонина TRiC.....	45
1.3. Экспрессия, выделение и очистка овечьего прионного белка PrP.....	47
1.4. Экспрессия, выделение и очистка рекомбинантного альфа-синуклеина человека.....	49
2. Получение разных форм прионного белка	50
3. Фибриллизация альфа-синуклеина	51
4. Флуоресценция тиофлавина T (ThT).....	51
4.1. Измерение спектра флуоресценции тиофлавина T	52
4.2. Измерение интенсивности флуоресценции тиофлавина T в планшете	52
5. Взаимодействие прионного белка с шаперонинами в присутствии АТФ	54

6. Взаимодействие альфа-синуклеина с бактериальным комплексом шаперонинов GroEL-GroES в присутствии АТФ	54
7. Динамическое светорассеяние	54
8. Иммуноферментный анализ.....	55
9. Измерение концентрации АДФ.....	56
10. SDS-электрофорез по методу Лэммли.....	57
11. Трансмиссионная электронная микроскопия.....	58
12. Криоэлектронная микроскопия	58
12.1. Комплекс GroEL-GroES-нуклеотид	58
12.1.1. Подготовка образца.....	58
12.1.2. Сбор и обработка данных	59
12.2. Комплекс GroEL-PrP	59
12.2.1. Подготовка образца.....	59
12.2.2. Сбор и обработка данных	60
12.3. Комплекс GroEL-альфа-синуклеин	61
12.3.1. Подготовка образца.....	61
12.3.2. Обработка и сбор данных	61
12.4. Комплекс TRiC-АТФ-гамма-S	62
12.4.1. Подготовка образцов.....	62
12.4.2. Обработка и сбор данных	65
13. Молекулярная динамика	66
РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	68
1. Получение гомогенных препаратов белков	68
1.1. Амилоидногенные белки.....	68
1.2. Шаперонины.....	69
2. Получение разных форм прионного белка	71
3. Изучение взаимодействия бактериального комплекса шаперонинов GroEL-GroES с белками, склонными к амилоидной агрегации	73
3.1. Взаимодействие комплекса GroEL-GroES с разными формами прионного белка	74
3.2. Взаимодействие комплекса GroEL-GroES с альфа-синуклеином.....	77
4. Изучение взаимодействия эукариотического шаперонина TRiC с разными формами прионного белка.....	80
5. Изучение комплексов шаперонинов с белками, склонными к амилоидной агрегации, методом криоэлектронной микроскопии	85
5.1. Комплекс GroEL-GroES-нуклеотид.....	85
5.2. Комплекс бактериального шаперонина GroEL с прионным белком	94
5.3. Комплекс бактериального шаперонина GroEL с альфа-синуклеином	97
5.4. Комплекс эукариотического шаперонина TRiC с прионным белком	98
ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ.....	101
БЛАГОДАРНОСТИ	102
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	103

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АДФ	аденозиндифосфат
АТФ	аденозинтрифосфат
ДТТ	дитиотреитол
Крио-ЭМ	криоэлектронная микроскопия
НАДН	восстановленная форма никотинамидадениндинуклеотида
ПААГ	полиакриламидный гель
ЦНС	центральная нервная система
ЭДТА	этилендиаминтетрауксусная кислота
ЭПР	эндоплазматический ретикулум
α-syn	рекомбинантный α -синуклеин человека
FRET	Фёрстеровский перенос энергии
GroE	Бактериальный комплекс шаперонинов GroEL-GroES
GroEL	бактериальный шаперонин, выделенный из клеток <i>E.coli</i>
GroES	ко-шаперонин бактериального шаперонина GroEL
HEPES	(4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота
IP TG	изопропил-D-тиогалактопиранозид
LB	лизогенная среда
MOPS	3-[N-морфолино]пропансульфоновая кислота
NMDA	N-метил-D-аспартат
PBS	фосфатно-солевой буфер
PBST	фосфатно-солевой буфер с добавлением к нему детергента Tween 20 до конечной концентрации 0,05%
PMSF	фенилметилсульфонил фторид
PrP	рекомбинантный овечий прионный белок
PrP^c	здоровая изоформа мономера прионного белка
PrP^{Sc}	инфекционная изоформа “скрейпи” мономера прионного белка
PTD	домен белковой трансдукции
SDS	додecilсульфат натрия
ThT	тиофлавин Т
TIM	альфа-бета цилиндр
TRiC	эукариотический шаперонин, выделенный из семенников быка
Tris	трис(гидроксиметил)аминометан

ВВЕДЕНИЕ

1. 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.

2. 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.

3. 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 шаперона.
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.

4. 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. Более того, с помощью биохимических методов и электронной микроскопии было впервые показано образование комплекса между эукариотическим шаперонином TRiC и прионным белком в присутствии АТФ, приводящее к патологической трансформации амилоидного белка. Также 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.

5. 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.

6. 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.

7. 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.

8. 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.

9. 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 эукариотического шаперона TRiC была выполнена А.В. Моисеенко; молекулярную динамику подготовила И.С. Панина.

10. 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, Scopus, РИНЦ.

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.

11. 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 45rd FEBS Congress (Словения, Любляна, 2021); III Объединенный Научный Форум Физиологов, Биохимиков И Молекулярных Биологов (Россия, Сочи, 2022).

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

12. 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.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В природе существует ряд тяжёлых нейродегенеративных заболеваний, причиной которых является накопление белковых агрегатов в здоровых тканях, например, болезни Паркинсона, Альцгеймера, Гентингтона, прионные заболевания и другие. Такие агрегаты образуются из белков, утративших свою нативную конформацию, и, следовательно, функцию [1-2]. Таким образом, в основе развития нейродегенеративных заболеваний амилоидной природы лежат два процесса: изменение вторичной структуры амилоидогенного белка и образование из такого белка различных агрегатов с нарушенной конформацией - олигомеров и фибрилл.

Считается, что белковая цепь в амилоидных агрегатах уложена в многослойные сэндвичи, состоящие из параллельных бета-структур. В них бета-листы с параллельными оси водородными связями плотно упакованы в протофиламенты. Эти протофиламенты затем укладываются в длинные амилоидные нити. Бета-тяжи в бета-листах лежат перпендикулярно оси фибриллы [3-5]. Амилоидные фибриллы обычно содержат общий кросс-бета-шип. В нем бета-слои переплетаются в стериическую молнию, где гидрофобные боковые цепи обращены друг к другу [6-7].

Поскольку присутствующие в клетках шапероны отвечают за правильную укладку белковых цепей, препятствуют их агрегации и даже могут разрушать уже сформированные агрегаты [8], было выдвинуто предположение, что они могут влиять и на изменение вторичной структуры белка и на формирование агрегатов. Первые гипотезы о роли шаперонов в развитии нейродегенеративных заболеваний были достаточно простыми. Они основывались на данных о способности шаперонов предотвращать агрегацию белков. Из чего следует, что повышение в тканях концентрации шаперонов, разрушающих

амилоидные агрегаты, должно предотвращать развитие нейродегенеративных заболеваний. Следовательно, одной из стратегий лечения амилоидных заболеваний может быть использование внешних шаперонов. Такие подходы разрабатывались для лечения болезни Гентингтона [9]. Однако параллельно с этим накапливались сведения о более сложной и противоречивой роли шаперонов в развитии нейродегенеративных заболеваний. С одной стороны, показано, что токсичность амилоидных агрегатов зависит от их строения. Как правило, крупные фибриллярные структуры нетоксичны, а максимальной токсичностью обладают относительно небольшие олигомеры. Поэтому использование шаперонов для разрушения амилоидных фибрилл может привести к нежелательным последствиям из-за появления нейротоксичных олигомерных форм белков. С другой стороны, есть данные, что именно взаимодействие некоторых шаперонов с амилоидогенными белками вызывает их патологическую трансформацию и инициирует образование амилоидных структур [10]. Вероятно, такие процессы могут быть характерны для шаперонов с частично нарушенными функциями. Таким образом, нельзя утверждать, что все шапероны оказывают положительное влияние на лечение нейродегенеративных заболеваний. Механизмы взаимодействия шаперонов с различными амилоидогенными белками следует тщательно изучать, учитывая как свойства самих белков, так и функциональное состояние шаперонов.

1. Классификация шаперонов и их роль в организме

Шапероны играют ключевую роль в широком спектре процессов, происходящих в клетках всех живых организмов, от бактериофагов и вирусов до растений и животных. Они участвуют в фолдинге белков *de novo*, сборке олигомерных белков, разрушении белковых агрегатов и рефолдинге денатурированных белков, транслокации белков и удалении

аберрантных белков путем их деградации с помощью убиквитин-протеасомной системы или путем аутофагии [11-13]. Нарушения структуры и функциональной активности шаперонов вследствие мутаций или посттрансляционных модификаций, изменения содержания отдельных шаперонов или соотношения разных типов шаперонов, а также их локализации могут приводить к тяжелым последствиям не только для клетки, но и для всего организма. Любой из этих факторов может стать причиной развития различных патологий: так называемых шаперонопатий, некоторых форм рака, а также аутоиммунных и нейродегенеративных заболеваний [2, 10]. Развитию последних способствует возрастная дерегуляция клеточного протеостаза в пользу накопления в клетках неправильно свернутых и агрегированных белков [14].

В клетках существует несколько различных классов шаперонов, которые также называются белками теплового шока (HSP), поскольку их продукция стимулируется тепловым стрессом [15-16]. Исторически шапероны принято классифицировать по молекулярной массе их полипептидных цепей: Hsp40, Hsp60 (шаперонины), Hsp70, Hsp90, Hsp100 и малые белки теплового шока с молекулярной массой субъединиц от 12 до 43 кДа (Hsp20, Hsp22, Hsp25/27, Hsp32, HspB1–HspB10 и др.). В то же время, поскольку многие шапероны являются олигомерами, молекулярные массы функционально активных комплексов могут быть значительно выше. Например, шапероны класса Hsp70 (молекулярная масса мономера 66–78 кДа) функционируют в тандеме с кошаперонами Hsp40, масса которых варьирует от 10 (DnaJC19) до 254 кДа (DnaJC13). Эукариотический шаперонин TRiC (Hsp60) представляет собой олигомерный комплекс (≈ 1000 кДа), состоящий из 16 различных, но гомологичных субъединиц. Бактериальный шаперонин GroEL (≈ 800 кДа) состоит из 14 идентичных субъединиц, но требует для

своего функционирования ко-шаперонин GroES, представляющий собой гептамер (70 кДа).

Для фолдинга вновь синтезированных полипептидов и рефолдинга неправильно свернутых белков необходимы шапероны класса HSP60 (шаперонины), а также шапероны HSP70 и HSP90. Они представляют собой мультисубъединичные комплексы, функционирование которых включает чередующиеся циклы связывания ненативных белков и высвобождения свернутых белков, регулируемые АТФ и различными кофакторами. Отличительной чертой этого типа шаперонов является АТФазная активность. В начале цикла шапероны распознают и связывают открытые на поверхности гидрофобные мотивы развернутых белков, чтобы защитить их от агрегации. В конце цикла гидролиз АТФ приводит к высвобождению белка в раствор, где процесс сворачивания должен завершиться самопроизвольно. Полипептидные цепи, которые не были свернуты должным образом, могут повторно ассоциироваться с шаперонами. Таким образом, для продуктивного фолдинга необходимо участие АТФ-зависимых шаперонов, обеспечивающих повторяющиеся циклы связывания и высвобождения белка до тех пор, пока он не достигнет нативного состояния. Этим шаперонам для своего функционирования требуются специфические кошапероны, которые не только регулируют АТФазный цикл, но и влияют на субстратную специфичность [11].

Следует отметить, что к АТФ-зависимым шаперонам относятся также шаперонины [17], комплексы с уникальной двухкольцевой архитектурой и внутренней полостью. Наличие внутренней полости обеспечивает изолированное пространство для сворачивания ненативных белков. Ввиду различия их механизмов шапероны и шаперонины функционируют последовательно: HSP70 взаимодействует с образующимися и вновь синтезируемыми полипептидами, а шаперонины

участвуют в фолдинге тех белков, которые не могут свернуться только при участии HSP70. В то же время, наряду с АТФ-зависимыми шаперонами, агрегации ненативных белков в клетке, особенно в условиях стресса, препятствуют также АТФ-независимые шапероны, малые белки теплового шока, функционирующие как классические холодазы [2, 18]. Они связывают склонные к агрегации белки и переносят их либо к АТФ-зависимым шаперонам для рефолдинга, либо к протеасомам/аутофагосомам для протеолитической деградации.

2. Влияние шаперонов на патологическую трансформацию амилоидогенных белков

2.1. Прионный белок

Различные типы шаперонов участвуют как в образовании нативного прионного белка (PrP^c), выполняющего свои функции в нервной системе, так и в патологической трансформации этого белка. Особое значение для развития инфекционных форм прионных болезней могут иметь шапероны бактериальных клеток желудочно-кишечного тракта, участвующие в трансформации инфекционного прионного белка и его транспорте в центральную нервную систему [19].

Известно, что у млекопитающих прионный белок экспрессируется преимущественно в нейронах и локализуется на мембранах клеток, образующих диффузную нейроэндокринную систему, и клетках лимфоретикулярной системы [20]. Прионный белок также можно обнаружить в цитозоле нейронов [21-22]. Процессы трансляции белков, в том числе и прионного белка, их правильного фолдинга, созревания и транспорта происходят в эндоплазматическом ретикулуме (ЭР) с участием шаперонов [23-24]. Нарушение фолдинга белков в клетке приводит к накоплению неправильно свернутых белков в эндоплазматическом ретикулуме, что приводит к стрессу

эндоплазматического ретикулума (ЭР стресс) [25]. Перегрузка ЭР развернутыми белками активирует реакцию развернутых белков (UPR), которая направлена на восстановление нормальной функции клеток за счет остановки трансляции белков, расщепления неправильно свернутых белковых молекул и активации синтеза молекулярных шаперонов [26]. Если клетке не удастся восстановить свою функциональность, UPR направляет ее по пути апоптоза [27]. Показано, что стресс ЭР часто наблюдается при работе с моделями прионных болезней и вносит существенный вклад в развитие этих патологий [28-30]. Более того, ЭР-стресс наблюдали у пациентов со спорадическими и вариантными формами болезни Крейтцфельдта-Якоба [31]. Одним из значимых участников стресса ЭР является эукариотический шаперон BiP/Grp78 [32], который является членом семейства Hsp70 [33]. Это один из наиболее распространенных белков в ER, что делает его основным фактором сворачивания белков в клетке [34]. Grp78 взаимодействует с мутантным PrP и опосредует его деградацию через протеасому, что может указывать на то, что Grp78 сопровождает фолдинг прионного белка во время его синтеза *de novo* [35-36]. Уровень Grp78 повышался в клетках нейробластомы, инфицированных изоформой скрепи прионного белка PrP^{Sc} [31, 37], а также у мышей, инфицированных прионным белком [38]. Что еще более важно, в образцах мозга пациентов со спорадической болезнью Крейтцфельдта-Якоба были обнаружены повышенные уровни этого конкретного шаперона [31]. Вероятно, шаперон Grp78 участвует в сворачивании нативного прионного белка. Накопление мутантных или инфекционных форм прионного белка нарушает работу шаперона Grp78 и вызывает стресс ЭР, сопровождающийся стимуляцией синтеза Grp78. Шапероны Hsp72 и Hsp73 также связаны с прионными заболеваниями. Было обнаружено, что мозг мышей со скрепи содержит аномально большое количество лизосом, обогащенных PrP и Hsp73 [39].

Содержание Hsp72 увеличивается при нейродегенеративных заболеваниях [40], а также при моделировании прионных заболеваний как в клетках [41], так и у животных [42].

Следует отметить, что роль шаперонов в трансформации прионных белков дрожжей подробно изучена [43] [43]. Исследования показали, что дрожжевой шаперон Hsp104 участвует в расщеплении амилоидных фибрилл, образованных из дрожжевого прионного белка Sup35 [44]. Хотя такие дрожжевые модели имеют отдаленное отношение к механизмам возникновения прионных болезней у животных, возможность проведения генетических манипуляций с дрожжевыми клетками позволяет быстро и легко выявить общие закономерности действия шаперонов на амилоидную трансформацию белков [45-47]. Кроме того, экспрессия амилоидных белков млекопитающих в клетках дрожжей позволяет приблизить эти модели к моделям, основанным на клетках млекопитающих [48].

Обобщая, можно сказать, что шапероны играют важную роль как в реализации естественных функций амилоидогенного прионного белка, так и в его патологической трансформации. Шапероны участвуют в сворачивании прионного белка и в его транспорте к мембранам нервных клеток. В то же время мутантные или инфекционные формы прионов могут блокировать шапероны, вызывая стресс ЭПР. Кроме того, бактериальные шапероны могут участвовать в транспорте инфекционных форм прионов из кишечника в центральную нервную систему, что более подробно будет рассмотрено в последнем разделе обзора.

2.2. Альфа-синуклеин

Альфа-синуклеин не образует стабильной третичной структуры и относится к так называемым естественно неупорядоченным белкам или *intrinsically disordered proteins* [49]. Альфа-синуклеин связан с возникновением и развитием ряда синуклеинопатий, включая болезнь

Паркинсона [50-51]. Изучение влияния шаперонов на патологическую трансформацию альфа-синуклеина, приводящую к образованию его олигомерной и фибриллярной форм, необходимо как для понимания возникновения синуклеинопатий, так и для поиска подходов к их лечению. В большинстве исследований показано, что альфа-синуклеин связывается с шаперонами, и это взаимодействие предотвращает его амилоидизацию. Так, малые белки теплового шока (Hsp27 и α B-кристаллин) связываются с альфа-синуклеином и эффективно подавляют его агрегацию и фибрилляцию [52-56]. Более сложные АТФ-зависимые шапероны класса Hsp70 оказывают еще более выраженное влияние на трансформацию альфа-синуклеина [35, 57-59]. Шапероны Hsp70 могут предотвращать образование фибрилл и олигомеров не только в присутствии АТФ, но и в его отсутствие [58, 60]. Некоторые противоречия в результатах по влиянию нуклеотидов на связывание альфа-синуклеина, вероятно, связаны с особенностями взаимодействия шаперонов с различными промежуточными продуктами фибрилляции альфа-синуклеина [61]. Шаперон Hsp70 в сочетании с J-белковыми кошаперонами класса В (DNAJB1) и фактором нуклеотидного обмена HSP110 эффективно дезагрегирует уже сформированные амилоидные альфа-синуклеиновые фибриллы. Дезагрегация является АТФ-зависимым процессом, и образующиеся мономеры альфа-синуклеина нетоксичны [62].

Другие шапероны, в том числе из класса Hsp60, также могут предотвращать образование фибрилл [63-66]. Эукариотический шаперонин TRiC связывается с олигомерами альфа-синуклеина, нейтрализует их токсичность и предотвращает фибрилляцию [66]. Бактериальный шаперонин GroEL снижает скорость образования фибрилл [64, 66].

Однако некоторые данные указывают на то, что шапероны в ряде случаев способствуют патологической трансформации альфа-синуклеина. Показано, что шаперонин Hsp90 связывается с мономерным альфа-синуклеином *in vitro*, и его дальнейшие превращения зависят от функционального состояния шаперонина. В отсутствие АТФ шаперонин стимулировал накопление неамилоидных олигомеров альфа-синуклеина, при этом образование фибрилл альфа-синуклеина было АТФ-зависимым процессом [67]. Как отмечалось выше, комбинация трех шаперонов многоклеточных организмов, HSP70, DNAJB1 и HSP110, приводила к дезагрегации альфа-синуклеиновых фибрилл *in vitro* с образованием нетоксичных мономеров. В то же время функционирование этих шаперонов *in vivo*, вероятно, стимулировало появление токсических форм альфа-синуклеина. В экспериментах на *Caenorhabditis elegans* истощение HSP-110 снижало дезагрегационную активность HSP70, что приводило к уменьшению очагов альфа-синуклеина, межклеточной передачи и токсичности [68]. Следовательно, хотя шаперон HSP70 и его партнеры необходимы для поддержания клеточного протеостаза, они могут быть вовлечены в образование токсических форм альфа-синуклеина. Таким образом, хотя в большинстве случаев шапероны предотвращают патологическую трансформацию альфа-синуклеина и даже разрушают уже сформировавшиеся амилоидные структуры, в ряде случаев они могут способствовать передаче токсичных олигомерных форм альфа-синуклеина, образующихся при дезагрегации фибрилл.

Сведения о влиянии различных групп шаперонов на патологическую трансформацию двух амилоидогенных белков — прионного белка и альфа-синуклеина — обобщены в таблице 1. Как следует из таблицы, шапероны препятствуют агрегации и фибрилляции как прионного белка, так и альфа-синуклеина. Некоторые шапероны могут даже разрушать уже сформированные амилоидные фибриллы. В то же время

такое разрушение фибрилл не всегда можно отнести к благоприятному действию шаперонов, так как все больше данных указывает на токсичность именно небольших олигомерных амилоидных структур. Кроме того, в ряде работ показано, что шапероны стимулируют патологическую трансформацию амилоидогенных белков.

Таблица 1. Влияние шаперонов на трансформацию амилоидогенных белков. *α -syn* - альфа-синуклеина, *PrP* - овечий прионный белок, *Sup35p* - дрожжевой прионный белок.

Типы шаперонов	Малые белки теплового шока	Hsp70	Hsp90	Hsp100-110	GroEL (Hsp60)	GroEL +GroES	TRiC (Hsp60)
Молекулярная масса одной субъединицы, кДа	12-43	66-78	81-99	100-199	55-64		55-64
Количество субъединиц	9-50	1-2	2	6	14		16
АТФ-азная активность	-	+	+	+	+		+
Ингибирование амилоидной агрегации	α -syn	PrP α -syn			α -syn		α -syn
Стимуляция амилоидной агрегации			α -syn		PrP	PrP	PrP
Разрушение амилоидных фибрилл		α -syn		α -syn Sup35p		PrP	

3. Влияние амилоидогенных белков на работу шаперонов

Шапероны способствуют правильной укладке полипептидных цепей, что приводит к появлению функционально активных белков с нативной конформацией. Вероятно, как было сказано в предыдущем разделе, возможны несколько нативных конформаций, в том числе с разными

функциями, но при рассмотрении блокировки шаперонов мы не будем касаться этого аспекта. Будем считать, что существуют неправильно свернутые или развернутые полипептидные цепи, связывающиеся с шаперонами, и белки в нативной конформации, не распознаваемые шаперонами (рис. 1А). Белковая молекула с нативной конформацией появляется после одного или нескольких циклов связывания развернутой полипептидной цепи с шапероном и последующей диссоциации. Однако если полипептидная цепь в принципе не может свернуться в нативную конформацию, она снова будет связываться с шапероном. В случае сложных шаперонинов, у которых сворачивание полипептидной цепи происходит во внутренней полости, такие неправильно свернутые белки не высвобождаются в раствор. Такие белки будут повторно связываться с сайтами шаперонов, которые распознают структурные элементы, специфичные для развернутых белков. Следовательно, обсуждавшиеся выше белки с неправильной укладкой, возникающие по разным причинам, будут блокировать систему шаперонов (рис. 1Б). В случае сложных шаперонинов, таких как GroEL и TRiC, блокирование даже одного кольца должно нарушать попеременную работу двух колец и полностью ингибировать функцию шаперонинов.

Блокирование шаперонов может происходить, когда они взаимодействуют не только с неправильно свернутыми белками, но и с амилоидогенными белками (рис. 1Б). Амилоидогенные белки относятся к транс-неупорядоченным белкам и, следовательно, содержат неструктурированные участки, которые шапероны распознают как ненативные структуры. Большинство исследований сосредоточено на роли шаперонов в патологической трансформации амилоидогенных белков. Однако амилоидогенные белки также могут воздействовать на шапероны, блокируя их активные центры. Показано, что мономеры прионного белка связываются во внутренней полости шаперонина GroEL.

Такое связывание снижает гибкость шаперонинового кольца, с которым связан прионный белок [69]. Взаимодействие мономеров PrP с GroEL нарушает функционирование комплекса GroEL-GroES: шаперонин теряет способность реактивировать денатурированные белки, например, денатурированную глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназу [70].

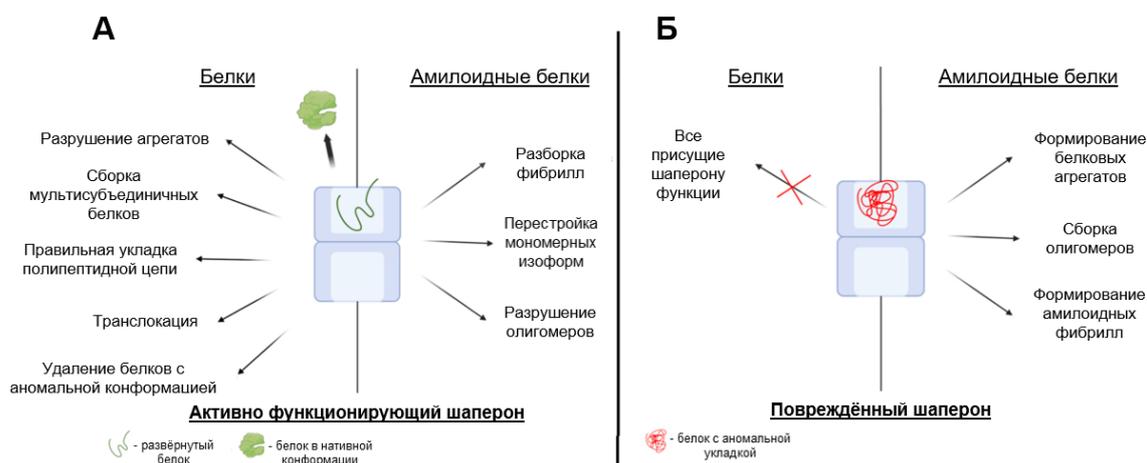


Рисунок 1. Функциональные изменения в работе шаперонов, вызванные блокировкой активных центров мультисубъединичного комплекса. (А) Влияние шаперонов на судьбу различных белков, в том числе склонных к амилоидной агрегации.. (Б) Индукция патологической трансформации амилоидогенных белков при блокировке работы шаперонов.

Блокирование шаперонов может происходить, когда они взаимодействуют не только с неправильно свернутыми белками, но и с амилоидогенными белками (рис. 1Б). Амилоидогенные белки являются внутренне неупорядоченными белками, и поэтому они содержат неструктурированные области, которые шапероны распознают как ненативные структуры. Большинство исследований сосредоточено на роли шаперонов в патологической трансформации амилоидогенных белков. Однако амилоидогенные белки также могут воздействовать на шапероны, блокируя их активные центры. Прионный белок полностью блокировал способность TRiC реактивировать денатурированную

рекомбинантную глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу, специфичную для сперматозоидов человека. Гликирование мономера PrP приводило к частичному разворачиванию его структурированной части, что снижало эффективность блокирования шаперонина PrP [71].

Блокирование амилоидными белками системы шаперонов, выполняющей столь важные для клетки функции, должно приводить к изменению функционального протеома клетки. Хорошо известно, что нейродегенеративные амилоидные заболевания характеризуются не только появлением олигомерных и фибриллярных амилоидных структур, но и различными нарушениями функционирования клеток. Например, болезнь Паркинсона сопровождается нарушением энергетического обмена, в том числе гликолиза. Одним из возможных механизмов снижения скорости гликолиза может быть недостаток гликолитических ферментов, составляющих большинство цитоплазматических белков. Амилоидные формы альфа-синуклеина могут не только напрямую ингибировать активность гликолитических ферментов, как это было недавно показано [72], но и блокировать шапероны, необходимые для эффективного фолдинга ферментов. Кроме того, блокирование шаперонов амилоидными белками может также нарушать другие функции клетки из-за неспособности продуцировать достаточное количество белков в их нативной конформации. Все малоизученные аспекты влияния блокирования шаперонов амилоидными и неправильно свернутыми белками на клеточное функционирование требуют тщательного изучения.

4. Участие бактериальных шаперонов кишечной микробиоты в патологической трансформации амилоидогенных белков

За последнее десятилетие появилось много информации о взаимосвязи процессов, происходящих в желудочно-кишечном тракте, с

возникновением и развитием нейродегенеративных заболеваний, в первую очередь болезней Паркинсона и Альцгеймера [73-77]. Определяющую роль во влиянии желудочно-кишечного тракта на нервную систему играет микробиота кишечника, состав которой может как провоцировать патологические процессы, так и предупреждать их. Наиболее полно изучено участие микробиоты кишечника в развитии болезни Паркинсона [77-82]. Прежде всего, несколько исследований показали, что альфа-синуклеин и его фибриллярные формы могут транспортироваться из кишечника в мозг и участвовать в формировании телец Леви [79-80]. При этом может транспортироваться как альфа-синуклеин эндокринных клеток кишечной стенки [79], так и фибриллярные формы альфа-синуклеина, введенные в просвет кишечника [80]. Кроме того, было показано, что альфа-синуклеин кишечных нервных клеток изменяется метаболитами кишечного происхождения. В результате альфа-синуклеин может не только сам приобретать патологическую конформацию, но и проникать в ткани центральной нервной системы и изменять в них конформацию альфа-синуклеина. Так, показано, что измененные формы альфа-синуклеина обладают приноподобным действием, что может быть одним из механизмов развития данной патологии [81-82]. Принято считать, что именно различные метаболиты, образующиеся в кишечнике, могут проникать через кишечную стенку и влиять на процессы, происходящие в центральной нервной системе. Однако мы полагаем, что возможен и другой механизм, предложенный в нашей лаборатории в 2011 г., который в первую очередь может быть характерен для инфекционных прионных болезней [19]. Инфекционные прионы попадают в организм через кишечник и, естественно, могут встречаться в нем с бактериями, а также с компонентами, выделяющимися при лизисе бактериальных клеток. К таким компонентам могут относиться шапероны как самих бактерий, так

и бактериофагов. Известно, что шапероны, такие как GroE, взаимодействуют с прионными белками и влияют на их патологическую трансформацию. В нашей лаборатории было показано, что шаперонин GroE из клеточных экстрактов *E. coli* стимулирует амилоидную трансформацию рекомбинантного овечьего белка и вызывает образование сферических наноструктур. Эффективность амилоидной трансформации коррелирует с содержанием GroE в клетках, поскольку максимальное накопление амилоидных форм прионного белка характерно для экстрактов суперпродуцентов этого шаперона [19]. Мы полагаем, что шаперонины бактерий, бактериофагов и других обитателей кишечника могут быть ключевым элементом, определяющим эффективность заражения организма прионным белком. Нельзя исключать, что другие амилоидогенные белки, попадающие в кишечник с пищей, например, альфа-синуклеин, после взаимодействия с шаперонами могут проникать в ЦНС и провоцировать патологическую трансформацию белков, связанную с нейродегенеративным амилоидозом. Этот почти неизученный аспект роли кишечной микробиоты требует тщательного изучения, так как позволяет установить молекулярные механизмы столь популярного в настоящее время явления.

5. Объекты исследования

Описанные выше наблюдения о возможной роли шаперонов в патологической трансформации амилоидогенных белков, в частности прионного белка и альфа-синуклеина, показывают, что имеющиеся сведения об этих процессах противоречивы и недостаточно исследованы, в том числе и на уровне индивидуальных белков. Для выяснения молекулярных механизмов взаимодействия шаперонов с амилоидогенными белками в нашей работе в качестве объектов исследования были выбраны прионный белок и альфа-синуклеин, а также

два шаперона, принадлежащих к группе шаперонинов - GroE и TRiC. Основные характеристики этих белков описаны ниже.

5.1. Структура и функции прионного белка

В девяностые годы прошлого века учёные обнаружили, что инфекционными агентами могут служить не только вирусы и различные микроорганизмы но и белковые молекулы. Так началось активное изучение прионного белка (PrP)- инфекционного агента белковой природы, который является возбудителем нейродегенеративных заболеваний человека и других млекопитающих. К числу таких заболеваний относят синдром Крейцфельдта–Якоба, куру, синдром Герстманна–Штройслера–Шейнкера и хроническую семейную бессонницу у человека, а также почесуху овец (скрейпи) и губчатую энцефалопатию коров. При возникновении прионного заболевания в нервной ткани накапливаются амилоидные агрегаты патологической изоформы прионного белка, что вызывает её повреждение и, в конечном счёте, отмирание. Для распространения прионного заболевания необходимо, чтобы нормально свёрнутая клеточная изоформа прионного белка встретила с патологической в нервных клетках заражённого организма. Это вызывает лавинообразное изменение вторичной структуры белковой молекулы.

Прионный белок - это небольшой протеазочувствительный белок, состоящий из 254 аминокислотных остатков. Структура клеточного PrP млекопитающих консервативна и представлена двумя принципиально различающимися структурными доменами: N-концевым – неструктурированным, содержащим октапептидные повторы, и C-концевым, представленным тремя альфа-спиралями (H1, H2 и H3) и двумя бета-тяжами S1 и S2 [83]. Прионовый белок синтезируется в шероховатой эндоплазматической сети и проходит через аппарат Гольджи, чтобы в конечном итоге достичь клеточной поверхности. При

созревании в ЭПР прионный белок претерпевает несколько посттрансляционных модификаций: отщепление N-концевого сигнального пептида, добавление олигосахаридных цепей в двух местах на N-конце, образование одинарной дисульфидной связи и присоединение гликофосфатидилинозитолового якоря (GPI) к C-концу белка [84-85]. После созревания белок прикрепляется к клеточной поверхности с помощью GPI [86] (рис. 2). Дальнейшие исследования показали, что при переходе из неинфекционной в инфекционную конформацию молекула прионного белка утрачивает первый альфа-спиральный участок H1, который полностью переходит в бета-структуру. В результате этого содержание бета-структур во вторичной структуре PrP увеличивается с 3% до 43% [87-88].

Известно, что у млекопитающих прионный белок экспрессируется преимущественно на нейронах; на клетках, образующих диффузную нейроэндокринную систему, а также на клетках лимфоретикулярной системы [20]. Хотя функции этого белка в организме пока до конца не установлены, было выдвинуто несколько гипотез.

Во-первых, считается, что PrP может участвовать в передаче сигналов от клетки к клетке и в сигнальных каскадах индукции апоптоза, являясь вторичным мессенджером [90]. Исследования показали, что прионный белок циркулирует между плазматической мембраной и эндосомальным компартментом [91]. Предполагается, что при этом задействован механизм макропиноцитоза. В состав PrP входит специальная последовательность, называемая доменом белковой трансдукции (PTD). Когда изменяется потенциал на поверхности клетки, домен белковой трансдукции взаимодействует с протеогликанами клеточной оболочки, что вызывает инвагинацию мембраны внутрь клетки с последующим образованием пузырька, содержащего PrP. Далее пузырёк

отшнуровывается в цитоплазму, где его содержимое может высвободиться [92].

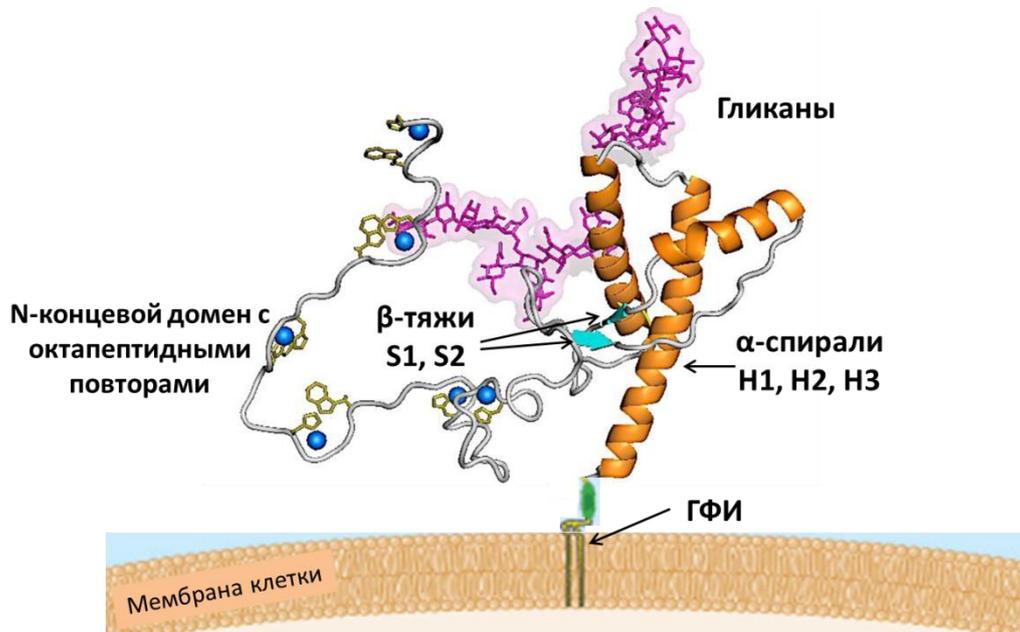


Рисунок 2. Структура клеточной изоформы прионного белка [89].

Структура представлена двумя принципиально различающимися доменами: N-концевым – неструктурированным, содержащим октапептидные повторы, и C-концевым, представленным тремя альфа-спиралями (H1, H2 и H3) и двумя бета-тяжами S1 и S2. В ходе своего созревания прионный белок претерпевает несколько посттрансляционных модификаций: отщепление N-концевого сигнального пептида, добавление олигосахаридных цепей в двух местах на N-конце, образование одинарной дисульфидной связи и присоединение гликофосфатидилинозитолового якоря (GPI) к C-концу. После созревания белок прикрепляется к клеточной поверхности с помощью GPI.

Во-вторых, прионный белок может играть роль в регуляции долговременной потенциации за счёт ингибирования NMDA-рецепторов [93]. Долговременная потенциация – это разновидность синаптической пластичности, при которой синаптическая передача между двумя

нейронами на длительное время усиливается после воздействия на синаптический путь. Считается, что функцией PrP может являться прямое или опосредованное ингибирование NR2D субъединиц NMDA-рецепторов к глутамату, играющих ключевую роль в развитии многих типов долговременной потенциации. В экспериментах на срезах гиппокампов показано, что у мышей, лишённых нормального PrP, наблюдается увеличение амплитуды и продолжительности синаптических токов, обусловленных работой NMDA-рецепторов [93]. Биологический смысл этой функции PrP может оказаться двояким. С одной стороны, можно предполагать, что PrP выполняет функции нейропротектора. Действие PrP на NMDA-рецепторы может быть направлено на предотвращение перевозбуждения нервной ткани при разного рода патологических состояниях (таких как эпилепсия, инсульт, ишемия, сотрясение мозга и пр.). С другой стороны, возможно, основной функцией PrP является поддержание миелиновой оболочки аксонов и регуляция апоптоза в клетках нервной ткани, который опосредован активностью NMDA-рецепторов на определенных этапах развития нервной системы.

В-третьих, оказалось, что прионный белок способен образовывать хелатные комплексы с ионами двухвалентных металлов [94]. Отсюда можно предположить, что PrP является межклеточным депо меди и кальция [95]. Показано, что связывание ионов меди и других металлов осуществляется октапептидными повторами на N-конце молекулы [96].

5.2. Структура и функции альфа-синуклеина

В организме человека на данный момент обнаружено три белка вида “синуклеин”: альфа-, бета- и гамма-синуклеин. Однако наибольшее число исследований посвящено альфа-синуклеину, так как неправильная укладка этого белка и дальнейшее накопление его агрегатов в нейронах чёрной субстанции приводит к возникновению болезни Паркинсона [97].

Из-за накопления агрегатов разрушаются дофаминовые нейроны, которые лежат как раз в компактной части чёрной субстанции [98]. Также данное заболевание характеризуется накоплением нерастворимых цитоплазматических белков в специальных внутриклеточных включениях - тельцах и нейритах Леви [99]. Ярче всего клиническая картина болезни проявляется посредством нарушения произвольных движений [100], однако для неё свойственны и другие немоторные проявления [101].

Альфа-синуклеин – это небольшой внутриклеточный белок, который обильно экспрессируется в нейронах. Он состоит примерно из 140 аминокислот и имеет молекулярную массу около 14000 Да [102]. Первичная аминокислотная последовательность обычно делится на три домена: N-концевой домен, центральный домен NAC и C-концевой домен. N-концевой домен богат лизинами и играет важную роль при взаимодействии с мембранами клеток. В случае связывания с липидным бислоем он образует альфа-спираль [103]. C-концевой домен имеет неупорядоченную структуру и обогащён как отрицательно заряженными остатками, так и остатками пролина. Последние обеспечивают гибкость полипептида [49]. Центральный домен содержит множество гидрофобных остатков и участвует в агрегации альфа-синуклеина [104]. Его также называют неамилоидным бета-компонентом.

Как уже упоминалось, альфа-синуклеин может существовать в растворимом и связанном с мембраной состояниях и от этого будет зависеть его вторичная структура. Растворимый цитозольный альфа-синуклеин по своей природе не структурирован и ведёт себя как естественно развёрнутый белок. Когда же белок встраивается в липидную мембрану, его повторяющаяся последовательность на N-конце сворачивается в альфа-спиральную структуру [105].

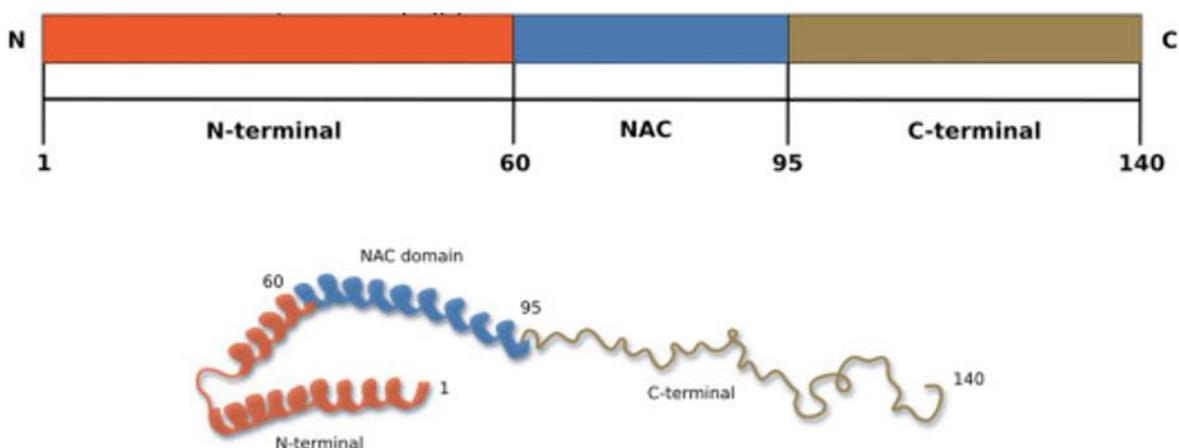


Рисунок 3. Структура альфа-синуклеина [106].

Альфа-синуклеин человека состоит из N-концевого домена (1-60 а.о.), гидрофобного NAC-домена (61-95 а.о.) (Non-Amyloid β Component of AD amyloid) и отрицательно заряженного C-концевого домена (96-140 а.о.).

Физиологическая роль альфа-синуклеина до конца не ясна. Белок преимущественно расположен в пресинаптических окончаниях нейронов, поэтому он считается важным для синаптической пластичности и везикулярной упаковки и транспортировки веществ. В частности, альфа-синуклеин связывается с синаптобревином-2 и напрямую способствует сборке комплекса SNARE - молекулярной машины, которая отвечает за экзоцитозное высвобождение нейромедиатора в синапс [107].

В результате накопления агрегатов α -синуклеина, развиваются болезни с общим названием синуклеинопатии. К ним, в частности, относятся болезнь Паркинсона, множественная системная атрофия, деменция с тельцами Леви и чистая вегетативная недостаточность.

Накопление агрегатов альфа-синуклеина может вызывать и ряд других синуклеинопатий. Деменция с тельцами Леви по своим клиническим проявлениям схожа с болезнью Паркинсона. Однако при ней также возникают и симптомы, напоминающие болезнью Альцгеймера. Скорей всего это связано с обнаруженной у таких пациентов патологией коры головного мозга [108]. При множественной системной атрофии патологический альфа-синуклеин накапливается в

олигодендроцитах и швановских клетках в центральной и периферической нервной системе. В зависимости от этого выделяют два варианта болезни: паркинсонический и церебральный [109-110]. Чистая вегетативная недостаточность является относительно медленно прогрессирующим заболеванием и не сопровождается двигательной дисфункцией. В её случае у пациентов после смерти находят тельца Леви в симпатических и парасимпатических ганглиях, а также в пре- и постганглионарных вегетативных нейронах [111].

5.3. Бактериальный комплекс шаперонинов GroEL-GroES

Вновь синтезированная полипептидная цепь должна быть уложена определенным образом, чтобы образовать нативную структуру. Только тогда белок приобретает свои функциональные свойства. Правильный фолдинг белка как *in vivo*, так и *in vitro* может нарушаться межмолекулярными взаимодействиями. Это в свою очередь может привести к образованию белковых агрегатов, поскольку внутриклеточная концентрация макромолекул может достигать 300 мг/мл [112]. В таких условиях мультидоменные белки могут принимать правильную конформацию только в присутствии специфических клеточных помощников - “молекулярных шаперонов” [113]. Впоследствии термин “молекулярные шапероны”, или просто “шапероны”, стал применяться к большому семейству белков, которые участвуют в фолдинге полипептидной цепи, в формировании комплексов и перемещении макромолекул, но не принимают участия в реализации их функции. Они делятся на шесть больших групп в зависимости от своего размера. Пять из них — Hsp 100, Hsp 90, Hsp 70, Hsp 40 и шаперонины (Hsp 60), образующие крупные мультисубъединичные комплексы весом 800–900 кДа, обладают медленной АТФазной активностью. А шестая группа — малые белки теплового шока (12–43 кДа) — работают АТФ-независимым образом [114].

Члены семейства шаперонов были обнаружены в клетках бактерий [115], архей [116], эукариот [117] и даже в геномах вирусов [118-120]. Наиболее изученный комплекс шаперонинов GroEL-GroES отвечает за фолдинг белков в бактериальных клетках. Этот комплекс не только содействует сворачиванию вновь синтезированных полипептидов, но также участвует в предотвращении агрегации белков в случае теплового шока. Более того GroEL-GroES помогает восстановиться белкам, которые были повреждены или неправильно свёрнуты под воздействием различных стрессовых условий. В исследованиях функциональной активности комплекса шаперонинов GroEL-GroES было показано, что около 5% белков *E. coli* требуют обязательной помощи комплекса для формирования нативной конформации [121-122], а около 10% белков требуют одновременной работы систем GroE и DnaK, где GroEL действует на более поздних этапах [123-124].

Шаперонин GroEL состоит из 14 идентичных субъединиц с молекулярной массой 60 кДа, объединенных в два гептамерных кольца. Каждая из субъединиц GroEL состоит из трех доменов: апикального, предназначенного для связывания белков с ненативной конформацией и ко-шаперонина GroES, промежуточного и экваториального с АТФ-связывающим карманом. Кольца соприкасаются со стороны экваториальных доменов, образуя бочкообразную структуру.

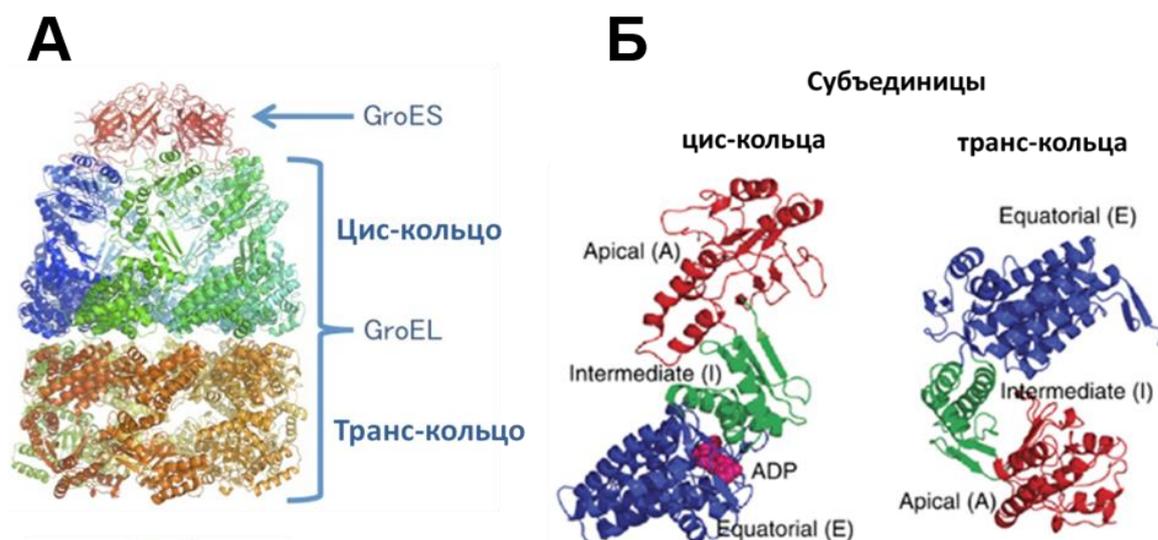


Рисунок 4. Трёхмерная структура **А)** рабочего комплекса шаперонинов GroEL-GroES и **Б)** субъединиц цис- и транс-кольца шаперонина GroEL. *A – апикальный домен, I – промежуточный (шарнирный), E – экваториальный [125].*

Апикальный и промежуточный домены субъединиц GroEL образуют стенки большой центральной полости, а экваториальные домены ограничивает её снизу. На каждое кольцо приходится одна полость. Внутренняя поверхность этих полостей выстлана неполярными аминокислотными остатками [125-127]. Функциональные тесты показали, что связывание субстрата происходит за счёт двух альфа-спиралей (H и I) апикального домена [128]. Совместная кристаллизация малых гидрофобных пептидов с GroEL показала, что эти вытянутые пептиды связываются в бороздке между спиральями H и I, образуя контакты с апикальными гидрофобными боковыми цепями [129-130]. Кроме того, 7 субъединиц ко-шаперонина GroES с молекулярной массой 10 кДа каждая образуют куполообразный комплекс, способный связываться с апикальными доменами GroEL, закрывая гидрофобную полость. Это, а также связывание АТФ запускает внутри молекулы GroEL перестройки, которые увеличивают гидрофильность полости, что создаёт благоприятные условия для правильной укладки связанного в ней

белкового субстрата [131-132]. Комплекс шаперонинов GroEL-GroES узнаёт свои молекулярные субстраты, если их аминокислотная последовательность содержит один или несколько подвижных петлеобразных гидрофобных участков [133]. Однако нет доказательств, влияет ли количество гидрофобных сайтов на эффективность связывания субстрата шаперонином. Также было показано, что значительная часть субстратов GroEL содержит домены типа ТИМ-цилиндр [134].

Благодаря структурным исследованиям удалось узнать много нового о функциональном цикле комплекса GroEL-GroES. Так, полученная методом рентгеноструктурного анализа структура с разрешением 2,8 Å показала, что межсубъединичные контакты в каждом кольце GroEL обеспечиваются благодаря гидрофобным взаимодействиям в экваториальных доменах и солевыми мостиками в промежуточных и апикальных [125]. А контакты между кольцами GroEL образованы как электростатическими, так и гидрофобными взаимодействиями. Особенно в данном ключе отмечают солевые мостики E461–R452 и водородную связь K105–A109 [135-137]. Важно отметить, что наличие нуклеотидов в АТФ-связывающих карманах влияет на межкольцевые взаимодействия GroEL. Рентгеноструктурный анализ молекулы GroEL, изученной после её коинкубации с АТФ, показал, что связывание АТФ с одним кольцом вызывает перестройку его солевых мостиков, что в свою очередь вызывает согласованное вращение апикальных доменов того же кольца [126, 138]. Это вращение приводит к возникновению такой конформации апикальных доменов GroEL, которая способна связывать GroES. При нормальном функционировании присоединение GroES происходит после связывания субстрата и приводит к его инкапсуляции. Вопрос о том, происходит ли набор описанных выше событий в обоих кольцах одновременно или по одному, давно вызывает споры [139]. Модель “футбольного мяча” предполагает, что кольца работают одновременно и

гептамеры GroES сразу связываются с обоими кольцами комплекса [140], в то время как модель “пули” полагает, что кольца работают по очереди через отрицательную кооперацию между ними [141]. Оба типа структур были кристаллизованы [131, 142-143]. Некоторые исследователи считают, что пулеобразное состояние может быть более физиологичным, так как оно наблюдается при физиологическом соотношении концентраций АТФ к АДФ [140, 143-144]. Другие, что возможны два цикла: асимметричный и симметричный [140]. Асимметричный цикл происходит в отсутствие белка-субстрата. Он начинается с образования комплекса GroEL-GroES₂ в форме футбольного мяча, связанного с 14 молекулами АТФ. Эти нуклеотиды со временем гидролизуются, но их гидролиз в одном кольце происходит несколько быстрее, чем в другом. Из-за этого одна молекула ко-шаперонина GroES отделяется, что приводит к образованию пулевидного комплекса GroEL-GroES, который уже продолжает функционировать в виде пули. А вот в присутствии развёрнутого субстрата наблюдается симметричный цикл, и чем выше концентрация субстрата, тем больше будет образовываться комплексов в виде футбольного мяча [145-146].

5.1. Эукариотический шаперонин TRiC

Ещё одним белком интереса в нашей работе является эукариотический цитоплазматический шаперонин TRiC. Следует упомянуть, этот белок наиболее сложно организован из всех известных шаперонинов. Он состоит из двух симметричных колец, каждое из которых образовано восемью разными субъединицами (α , β , γ , δ , ϵ , η , θ , ζ), причём каждая субъединица кодируется отдельным геном [147]. Каждая субъединица TRiC весит 60 кДа и состоит из трёх доменов: апикального, промежуточного и экваториального. В состав апикального домена входит альфа-спираль, необходимая для закрытия гидрофобной полости шаперонина [148]. Благодаря наличию этих дополнительных

спиралей TRiC не нуждается в помощи ко-шаперонина для создания благоприятных для сворачивания субстратов условий. В полость шаперонина могут погружаться белки размером до 60 кДа.

Механизм действия TRiC связан с его способностью изменять конформацию субстрата, стимулируя его частичное разворачивание и дальнейшее сворачивание в нативную форму [149]. На примере двух самых широко изученных субстратов шаперонина - актина и тубулина - было показано, что оба белка связываются с определёнными субъединицами шаперонина [150]. С помощью электронной микроскопии было доказано, что связывание АТФ вызывает конформационные изменения в апикальном домене TRiC, что, в свою очередь, ведёт к закрыванию полости. Отличие этого шаперонина от других заключается в том, что конформационные изменения в апикальных доменах не происходят одновременно [151]. Они идут последовательно от одной субъединицы TRiC к другой, начиная с α и далее в направлении $\gamma - \beta - \zeta$. Благодаря такой конформационной подвижности происходит проталкивание молекулы белка внутрь полости шаперонина. Получается, что аминокислотные остатки, образующие стенки полости шаперонина TRiC, связываются с полипептидом и играют активную роль в его фолдинге [152].

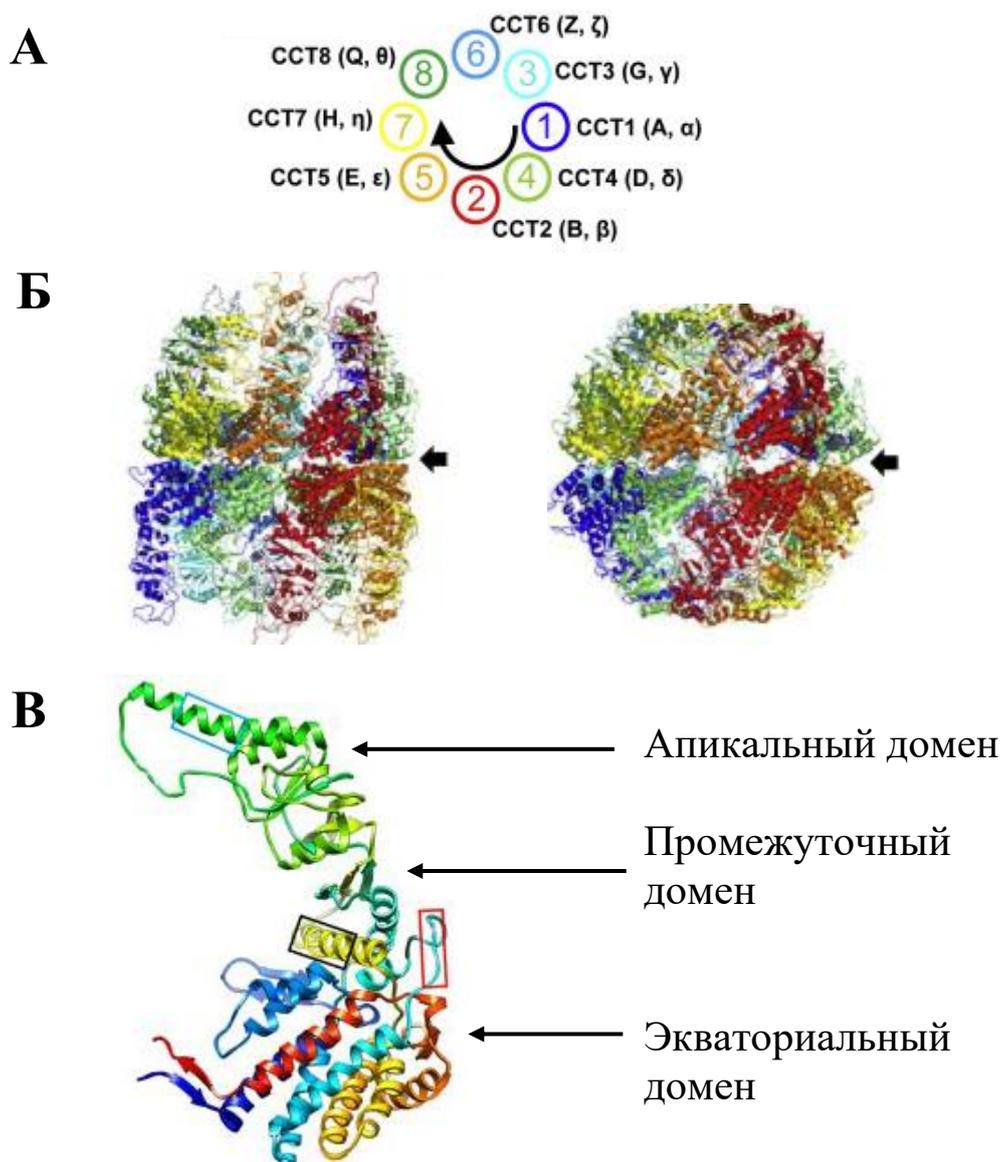


Рисунок 5. Структура шаперонина TRiC, расшифрованная с использованием метода криоэлектронной микроскопии [147].
 (А) Схематичное изображение расположения субъединиц в кольце.
 (Б) Вид полного комплекса шаперонина сбоку в открытой и закрытой конформациях. Разными цветами обозначены разные субъединицы.
 (В) Модель отдельной субъединицы шаперонина, показывающая расположение альфа-спиралей и бета-тяжей.

Если говорить о функциональном цикле TRiC, то на первой стадии происходит связывание субстрата с одним из колец шаперонина. Предполагается, что одновременное сворачивание субстрата может происходить только на одном из двух колец комплекса. На следующей стадии цикла восемь молекул АТФ связываются с TRiC в специальных карманах, которые лежат в экваториальных доменах последнего. В результате этого происходит частичное закрывание полости шаперонина. На стадии гидролиза нуклеотида полость TRiC полностью закрывается [153]. По окончании гидролиза АТФ в раствор высвобождаются неорганический фосфат, а затем и субстрат шаперонина. В случае, если субстрат не успел принять нативную конформацию, он может вновь связаться с молекулой TRiC и пройти цикл сворачивания ещё раз. Считается, что гидролиз АТФ является лимитирующей стадией описанного цикла. Изначально шаперонин TRiC был охарактеризован как шаперон, осуществляющий сворачивание белков цитоскелета, актина и тубулина [154]. Однако позднее методом иммунопреципитации было показано, что приблизительно 9-15% всех синтезированных в цитоплазме белков взаимодействуют с TRiC в процессе их сворачивания [155].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

МАТЕРИАЛЫ

В работе были использованы следующие реактивы и расходные материалы:

Среда LB (Luria Broth, Sigma), бактериальная культура W3110 *E.coli* с плазмидой pOF 39, бактериальная культура BL21 (DE3) *E.coli* (Novagen, USA) с плазмидой pET 22b+ (Novagen, USA), плазида pET33b(+), антибиотики канамицин (ОАО «Биохимик», Россия) и ампициллин (ОАО «Синтез», Россия), изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид (Helicon, Россия), HEPES, MOPS, Tris, KH_2PO_4 , тритон X-100 (MP Biomedicals, США), PMSF, коктейль ингибиторов протеаз (Sigma), DEAE-Sepharose fast flow (Sigma), гепарин-агароза (Sigma), Chelating Sepharose fast flow (GE Healthcare), Sephadex G-25 (GE Healthcare), тиофлавин Т, Кумасси R-250, Кумасси G-250, амидовый чёрный, АТФ, АТФ-гамма-S, АДФ (Sigma, США), NADH, моноклональные мышиные антитела F99/97.6.1 к эпитому Q²²⁰YQRES²²⁵ на С-конце прионного белка (Cell Signaling Technology, США), анти-мышинные антитела козы, конъюгированные с пероксидазой хрена (Jackson ImmunoResearch, США), моноклональные мышиные антитела к α -синуклеину, клон LB509 (Abcam, США), додецилсульфат натрия, фосфатно-солевой буфер в таблетках (Amresco, США), ЭДТА, дитиотреитол, NaCl, KCl, $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, MgCl_2 , ацетат натрия, ацетат аммония, глицерин, мочеви́на, имидазол, Tween-20, уксусная кислота, соляная кислота, этиловый спирт, 2-пропанол, бромфеноловый синий, серная кислота (Химмед, Россия), β -меркаптоэтанол (Ferak, Германия), набор маркеров Pierce Unstained Protein Ladder (14,4-116 кДа) (Thermo Scientific, США), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, сахароза, цитрат натрия, перекись водорода,

о-фенилендиамин (MP Biomedicals, США), фосфоенолпируват, НАДН, пируваткиназа, лактатдегидрогеназа, уранилацетат.

МЕТОДЫ

1. Получение препаратов белков

1.1. Экспрессия, выделение и очистка бактериальных шаперонинов *GroEL* и *GroES*

Производство шаперонинов *GroEL* и *GroES* осуществляли, используя замороженную бактериальную культуру W3110 *E.coli* с плазмидой pOF 39. Для возобновления культуры 50 мл бактериальной среды LB (Luria Broth, Sigma), содержащей 50 мкг/мл ампициллина, заражали замороженной культурой и растили в течение ночи при 37°C и перемешивании 200 об/мин. Далее брали 6 колб с 200 мл среды LB, содержащей 50 мкг/мл ампициллина, и добавляли ночную культуру до оптической плотности 0,1 при 600 нм. Производство искомым белков проводили в течение ночи при 37°C и перемешивании 200 об/мин.

После производства в течение ночи культуру центрифугировали 20 минут при 5000 g и 4°C. Далее отмывали бактериальные клетки (осадок) 50 мМ Tris-HCl буфером, pH 8,0 от среды, а затем суспендировали в лизирующем буфере (100 мМ Tris-HCl, pH 8,1, содержащем 0,1 мМ ЭДТА, 10 мМ ДТТ и 0,2 мг/мл ингибиторов протеаз (Sigma)). Бактериальные клетки разрушали с помощью ультразвуковой обработки (Fisher Bioblock, Illkirch, Франция) 5 импульсами по 40 секунд при амплитуде 50%. Суспензию центрифугировали 30 минут при 15000g, после чего высаливали супернатант сухим сульфатом аммония до 30%. После центрифугирования суспензии при указанных выше условиях полученную надосадочную жидкость дополнительно высаливали сухим сульфатом аммония до 80%. Далее центрифугировали препарат при тех

же условиях и растворяли осадок в буфере В (50 мМ Tris-HCl, pH 7,2, 0,1 мМ ЭДТА, 2 мМ ДТТ). Полученный раствор диализовали против буфера В в течение ночи.

Диализат наносили на колонку с DEAE-Sepharose fast flow (Sigma), уравновешенную буфером В. Элюцию белков проводили градиентом 0-500 мМ NaCl. Хроматографию проводили со скоростью 1-3 мл/мин на хроматографической системе Äkta Prime с программным обеспечением Unicorn Control (Amersham Biosciences, Piscataway, США). Собирали фракции в объеме 8 мл и анализировали их методом электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии SDS. Далее отдельно объединяли фракции, содержащие GroEL и GroES.

Полученный препарат GroEL диализовали против буфера В в течение ночи, а затем повторно очищали на DEAE-Sepharose fast flow по указанной выше методике. Собирали фракции в объеме 6 мл и также анализировали их методом электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии SDS. Фракции, содержащие очищенный GroEL, объединяли. Часть полученного препарата GroEL высаливали сухим сульфатом аммония до 80% и хранили при +4°C. Другую часть белка хранили при -80°C в виде аликвот по 1 мг.

Полученный препарат GroES также диализовали против буфера В в течение ночи, после чего проводили дополнительную очистку белка с помощью термообработки. Для этого последовательно нагревали диализат, содержащий шаперонин GroES, в круглодонной колбе в термостате сначала до 60°C, а затем до 80°C. При этом все примесные белки денатурировали и выпадали в осадок. Во время проведения термообработки отбирали пробы и анализировали их методом электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии SDS. Далее концентрировали полученный препарат в концентраторах с пропускной

способностью в 50 кДа. Очищенный препарат GroES, высаливали сухим сульфатом аммония до 80% и хранили на +4°C.

1.2. Выделение и очистка эукариотического шаперонина TRiC

Шаперонин TRiC был выделен из бычьих семенников с помощью разработанного в нашей лаборатории метода [155], который представляет собой комбинацию двух ранее известных методологий: [156] и [157].

Сначала удаляли наружную оболочку с одного бычьего семенника (360 г), а внутреннюю часть пропускали через механическую мясорубку. К полученному фаршу (188 г) добавляли 2 объёма буфера для гомогенизации (50 мМ HEPES, pH 7,4; 250 мМ сахарозы, 100 мМ NaCl, 2 мМ ЭДТА, 1 мМ ДТТ, 1 мМ PMSF) и оставляли при перемешивании на 10 минут при +4°C для экстракции белков. Далее центрифугировали смесь 30 минут при 15000 g, после чего отбирали супернатант и высаливали его сухим сульфатом аммония до 30%-ого насыщения. Оставляли суспензию на 30 минут при +4°C и постоянном перемешивании, а затем проводили центрифугирование в вышеуказанных условиях. Полученный супернатант высаливали сухим сульфатом аммония до 50%-ого насыщения и оставляли на ночь при +4°C без перемешивания.

На следующий день центрифугировали оставленную суспензию при указанных выше условиях и ресуспендировали полученный осадок в буфере для хроматографии ХБ (50 мМ HEPES, pH 7,2; 250 мМ KCl, 10 мМ ацетата натрия, 5 мМ MgCl₂, 0,5 мМ ЭДТА, 10% глицерола, 1 мМ ДТТ, 1 мМ PMSF). Далее проводили ультрацентрифугирование (УЦ) образца (45 мл) по следующей методике: на дно стакана для УЦ помещали 7,5 мл 1 М сахарозы, а сверху наслаивали 15 мл образца (соотношение сахароза/образец составляло 1:2). Ультрацентрифугирование проводили на приборе Beckman

Ultracentrifuges, ротор Ti-70 при скорости 117000g (33800 об/мин) в течение 9 часов и 19 минут. После УЦ удаляли верхний слой, отбирали и сохраняли сахарозу, а полученный желеобразный осадок ресуспендировали в ХБ. На всех стадиях выделения отбирали пробы для электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфат натрия.

Ресуспендированный осадок смешивали с сахарозой и наносили на колонку с гепарин-агарозой (Sigma) (65 мл), уравновешенную ХБ. Элюцию белков проводили линейным градиентом 250-500 мМ КСl. Хроматографию проводили со скоростью 1-3 мл/мин на хроматографической системе Äkta Prime с программным обеспечением Unicorn Control (Amersham Biosciences, Piscataway, США), собирали фракции в объеме 8 мл. Элюция белка наблюдалась при 70% градиента. Далее мы анализировали полученные при хроматографической очистке пробы с помощью электрофореза в ПААГ в присутствии додецилсульфата натрия и объединили фракции, содержащие шаперонин. Препарат оставляли на ночь на диализе против 2 л ХБ.

Полученный диализат подвергали вторичной очистке на колонке с гепарин-агарозой (Sigma) при тех же условиях, что и в случае первичной очистки, элюировав белок буфером для хроматографии, содержащим 500 мМ КСl. После проведения электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия отбирали фракции, содержащие очищенный TRiC, объединяли их и концентрировали белок в центрифужных концентраторах Amicon Ultra-15 (Millipore) с пропускной способностью в 50 кДа, после чего колориметрически измеряли концентрацию белка по методу Брэдфорд. После этого сконцентрированный шаперонин диализовали против 3 л буфера хранения (20 мМ HEPES, pH 7,2; 100 мМ NaCl, 5 мМ MgCl₂, 0,5 мМ

ЭДТА, 5% глицерола, 1 мМ ДТТ). Концентрацию белка в диализате измеряли колориметрически методом Бредфорд.

40% полученного чистого препарата белка хранили при +4°C в течение 2 недель. Остальную часть препарата замораживали при -80°C для более длительного хранения.

1.3. Экспрессия, выделение и очистка овечьего прионного белка PrP

Продукцию VRQ-варианта овечьего прионного белка осуществляли согласно методике, описанной в [158], используя замороженную бактериальную культуру BL21 (DE3) *E.coli* (Novagen, USA) с плазмидой pET 22b+ (Novagen, USA).

Для возобновления культуры 100 мл бактериальной среды LB (Luria Bertani Broth, Sigma), содержащей 100 мкг/мл ампициллина, заражали замороженной культурой и растили в течение ночи при 37°C и перемешивании 200 об/мин. Далее брали 6 колб с 500 мл среды LB, содержащей 100 мкг/мл ампициллина, и добавляли ночную культуру до оптической плотности 0,1 при 600 нм. Растили культуру клеток в течение 2 часов, чтобы оптическая плотность достигла 0,7. Затем индуцировали экспрессию белка добавлением IPTG до конечной концентрации 1 мМ. После продукции в течение ночи при 37°C и перемешивании 200 об/мин культуру центрифугировали 20 минут при 5000 g и 4°C. Далее отмывали бактериальные клетки (осадок) 50 мМ Tris-HCl буфером, pH 8,0 от среды, а затем замораживали на -20°C.

Замороженные бактериальные осадки суспендировали в лизирующем буфере (50 мМ Tris-HCl, содержащий 0,5 мг/мл лизоцима, 10 мМ ЭДТА, 0,1% Triton X-100, pH 8, набор ингибиторов протеаз (Sigma)) и инкубировали в течение 30 минут при температуре 37°C и перемешивании 100 об/мин. Затем бактерии разрушали с помощью ультразвуковой обработки на приборе Branson Digital Sonifer 10

импульсами по 10 секунд при амплитуде 50%. Полученные лизаты центрифугировали при 5000 g в течение 15 минут при 4°C.

Осадок, содержащий прионный белок в нерастворимых тельцах включения, промывали трижды 50 mM Tris-HCl буфером, pH 8,0. Далее солюбилизировали в буфере, содержащем 6 M гуанидингидрохлорид (50 mM Tris-HCl, 0,5 M NaCl) в течение ночи при 4°C. После центрифугирования в течении 20 минут при 8000 g супернатант хранили при 4°C до проведения хроматографической очистки.

Дальнейшую очистку препарата проводили при помощи аффинной хроматографии с использованием ионов никеля на колонке, заполненной носителем Chelating Sepharose FF (GE Healthcare). Также использовали хроматографическую систему Äkta Prime с программным обеспечением Unicorn Control (Amersham Biosciences, Piscataway, США). Разделение белков происходило благодаря наличию в последовательности прионного белка обогащенных гистидинами участков в составе октапептидных повторов, обладающих высоким сродством к ионам никеля.

Колонку, заполненную носителем (20 мл), насыщали 0,2 M раствором $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. После чего удаляли непрочно связавшиеся ионы, промывая колонку 20 mM ацетатным буфером, pH 4,0. Далее уравнивали колонку 20 mM Tris-HCl буфером, содержащим 0,5 M NaCl, 8 M мочевины, pH 7,4 и наносили супернатант, содержащий прионный белок, на колонку. После промывания колонки буфером до выхода оптической плотности на постоянный уровень осуществляли этап ренатурации белка (“рефолдинг”), промывая колонку буфером, содержащим 20 mM Tris-HCl, 0,3 M NaCl, 20 mM имидазол, pH 7,4. Искомый белок элюировали 1 M имидазольным буфером, pH 7,4, который обладает большей аффинностью к ионам никеля. Хроматографию проводили со скоростью 0,5-2 мл/мин. Фракции

собирали в объеме 3 мл. Концентрацию белка в пробах измеряли спектрофотометрически (коэффициент молярной экстинкции $A^{0,1\%}$ прионного белка составляет $2,6 \text{ (мг/мл*см)}^{-1}$).

Для хранения прионный белок переводили в 15 мМ ацетат-аммонийный буфер, рН 5,0 с помощью диализа, затем лиофилизировали его и хранили при -20°C .

1.4. Экспрессия, выделение и очистка рекомбинантного альфа-синуклеина человека

Рекомбинантный альфа-синуклеин человека экспрессировали с использованием бактериальной культуры *E. coli* BL21 (DE3), трансформированной плазмидой рЕТ33b(+), содержащей ген SNCA с мутацией Y136Y (TAC→TAT). Синонимическая замена была внесена в последовательность гена для того, чтобы предотвратить ошибку трансляции, ранее описанную для альфа-синуклина [72]. Для возобновления культуры клетки выращивали в течение ночи при 37°C при постоянном перемешивании 200 об/мин в 15 мл бактериальной среды LB, содержащей 50 мкг/мл канамицина. Далее 5 мл среды с клетками переносили в колбы с 200 мл среды LB, содержащей 50 мкг/мл канамицина, и растили до оптической плотности 0,6 при 600 нм. Затем добавляли изопропил-D-тиогаляктопиранозид (IPTG) до конечной концентрации 1 мМ для индукции экспрессии белка и культивировали клетки при 37°C и перемешивании 200 об/мин в течение 4-5 часов.

После продукции белка клеточную массу центрифугировали при 5000g и 4°C в течение 20 мин. Полученный осадок суспендировали в 30 мМ калий-фосфатном буфере (рН 7,5), предварительно отмыв его от среды, и разрушали клетки с помощью ультразвука (Branson Ultrasonics Sonifier TM S-450) (3 импульса по 20 сек, амплитуда 20%). Полученную суспензию центрифугировали в течение 20 мин при 15000g и 4°C . рН

супернатанта доводили до 2,8 добавлением 9% HCl и снова центрифугировали в течение 20 мин при 15000g и 4°C. Далее pH супернатанта доводили до 7-7,5 добавлением 1 М калий-фосфатного буфера (pH 11). Очищенный препарат белка высаливали сухим сульфатом аммония до 40% насыщения и хранили при +4°C.

2. Получение разных форм прионного белка

Для приготовления олигомерных структур растворяли навеску лиофилизированного прионного в 20 mM натрий-ацетатном буфере, pH 4,0, а затем измеряли концентрацию белка спектрофотометрически на приборе Shimadzu UV-1601 UV/VIS Visible при $\lambda=280\text{nm}$, коэффициент молярной экстинкции $A^{0,1\%}$ прионного белка составляет $2,6 (\text{мг/мл}\cdot\text{см})^{-1}$. Далее переводили прионный белок в 20 mM MOPS буфер, pH 7,5 на колонке PD MidiTrap с носителем Sephadex G-25 (GE Healthcare) и анализировали содержание белка в собранных фракциях с помощью амидового чёрного. Концентрацию белка после обессоливания также измеряли спектрофотометрически. Затем 800 мкл раствора прионного белка (20 mM MOPS буфер, pH 7,5) с концентрацией 0,5 мг/мл инкубировали 1 ч при 65°C без перемешивания.

Для приготовления амилоидных фибрилл растворяли навеску лиофилизированного PrP в 100 mM натрий-ацетатном буфере, pH=4,0 и измеряли концентрацию белка спектрофотометрически ($A_{0,1\%}=2,6 \text{ мл}/(\text{мг}\cdot\text{см})$). После этого готовили пробу, содержащую 2 мг/мл прионного белка, 1 М гуанидингидрохлорида и 0,03% азиды натрия. Полученную пробу инкубировали 48 часов при 37°C и интенсивном перемешивании.

Размер полученных частиц контролировали методом динамического светорассеяния. Образование амилоидных фибрилл контролировали с помощью флуоресценции тиофлавина Т.

3. Фибриллизация альфа-синуклеина

Альфа-синуклеин в виде сульфат-аммонийной суспензии центрифугировали в течение 10 мин при 12000g и 20°C. Осадок перерастворяли в 50 mM Tris-HCl pH 7,4 до конечной концентрации альфа-синуклеина 4,5 мг/мл и диализовали против того же буфера (1000-кратное превышение объема) в течение двух часов при 4°C. Для получения фибрилл раствор, содержащий 0,72 мг/мл альфа-синуклеина, инкубировали при pH 7,4 в буфере для фибриллизации (50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl и 50 mM KCl, pH 7,4) при 37°C и перемешивании 600 об/мин в течение 30 часов. Для контроля образования фибрилл отбирали аликвоты и измеряли флуоресценцию тиофлавина Т (Материалы и методы, раздел 4.2).

4. Флуоресценция тиофлавина Т (ThT)

Тиофлавин Т – это небольшая молекула флуоресцентного красителя, которая флуоресцирует после передачи ей энергии возбуждения. При связывании ThT с бета-листами, которыми богаты амилоидные структуры, происходит иммобилизация бензотиазольного и аминокбензольного колец молекулы в определенном положении, в то время как в растворе два кольца свободно вращаются друг относительно друга (рис.6). Это приводит к сдвигу максимума длины волны возбуждения (с 385 нм на 435 нм) и эмиссии (с 445 нм на 482 нм) и увеличению интенсивности флуоресценции тиофлавина Т на несколько порядков [159]. Поэтому ThT активно используют для детекции агрегатов, имеющих амилоидную природу, в том числе олигомеров и фибрилл.

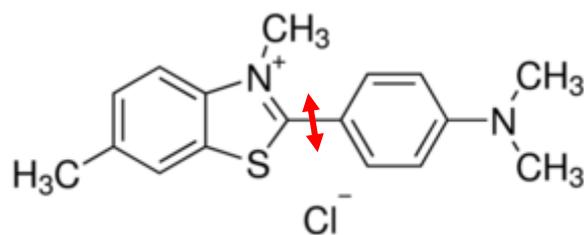


Рисунок 6. Структура тиофлавина Т. Красной стрелкой указана связь, относительно которой происходит вращение двух колец.

4.1. Измерение спектра флуоресценции тиофлавина Т

Для контроля образования всех форм PrP (мономеров, олигомеров и фибрилл) 4,4 мкМ прионного белка (0,1 мг/мл) в пересчёте на мономер инкубировали с 10-кратным избытком тиофлавина Т (44 мкМ) в течение 15 минут при 20°C. Общий объем пробы составлял 1 мл. Далее снимали спектры флуоресценции тиофлавина Т на спектрофлуориметре Horiba FluoroMax 3 в диапазоне 450-600 нм. Длина волны возбуждения составляла 435 нм.

Мы также получали спектры флуоресценции ThT для изучения природы агрегатов, образовавшихся при взаимодействии разных форм прионного белка с шаперонинами, полученными из разных организмов (Материалы и методы, раздел 5). В данном случае концентрация PrP в пробе составляла 0,6 мкМ в пересчёте на мономер. Тиофлавин Т брался в 10-кратном избытке, измерения проходили согласно описанным выше методике.

4.2. Измерение интенсивности флуоресценции тиофлавина Т в планшете

Во время фибриллизации альфа-синуклеина мы отбирали аликвоты (10 мкл) из реакционной смеси через определенные промежутки времени и инкубировали их с 10-кратным избытком тиофлавина Т в 50 мМ Tris-HCl pH 7,4 в течение 20 мин при 20°C и перемешивании 350 об/мин.

Общий объем смеси в лунке 96-луночного черного планшета составлял 100 мкл, концентрация α -syn – 5 мкМ (0,07 мг/мл), ThT – 50 мкМ. После инкубации получали значения флуоресценции тиофлавина Т при фиксированной длине волны возбуждения, составляющей 435 нм, с помощью планшетного спектрофлуориметра VICTOR X5 (PerkinElmer, США). Каждую точку измеряли независимо три раза, после чего усредняли полученные значения. По увеличению интенсивности флуоресценции при длине волны 482 нм делали вывод об эффективности образования амилоидных структур (рис. 7).

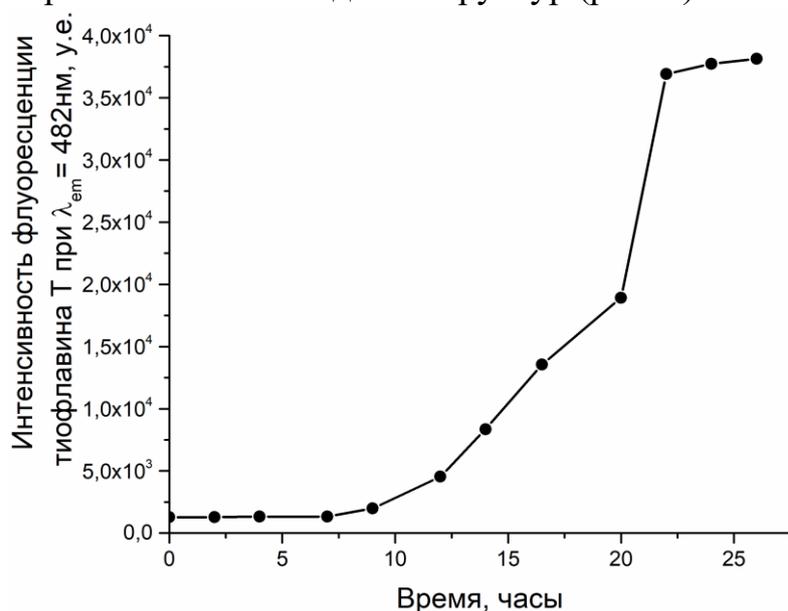


Рисунок 7. Изменение флуоресценции тиофлавина Т, наблюдаемое при образовании амилоидных фибрилл альфа-синуклеина.

Мы также использовали измерения флуоресценции ThT для изучения природы агрегатов, образовавшихся при взаимодействии мономеров альфа-синуклеина с бактериальным комплексом шаперонинов GroEL-GroES в присутствии АТФ (Материалы и методы, раздел б). В этом случае концентрация α -syn в пробе составляла 2,5 мкМ в пересчёте на мономер. Тиофлавин Т брался в 10-кратном избытке, измерения проходили согласно описанным выше методике.

5. Взаимодействие прионного белка с шаперонинами в присутствии АТФ

Для изучения взаимодействия разных форм (мономеры, олигомеры, “протофибриллы”, фибриллы) прионного белка с бактериальным комплексом шаперонинов GroEL-GroES и эукариотическим шаперонином TRiC в присутствии АТФ мы смешивали белки в молярном соотношении 1 к 1, а именно: 0,6 мкМ PrP (в расчёте на мономер белка) с 0,6 мкМ GroEL и 1,2 мкМ GroES или 0,6 мкМ TRiC в 10 мМ калий-фосфатном буфере, рН 7,5, содержащем 1 мМ ЭДТА, 2 мМ АТФ и 2 мМ MgCl₂. Инкубацию проводили в течение 2 часов при 20°C и постоянном перемешивании. Далее полученные образцы изучали методом динамического светорассеяния и с помощью получения спектров флуоресценции тиофлавина Т.

6. Взаимодействие альфа-синуклеина с бактериальным комплексом шаперонинов GroEL-GroES в присутствии АТФ

Для изучения взаимодействия мономеров альфа-синуклеина с бактериальным комплексом шаперонинов GroEL-GroES в присутствии АТФ мы смешивали белки в молярном соотношении 10 к 1, а именно: 10 мкМ мономеров α -syn с 1 мкМ шаперонина GroEL и 2 мкМ его ко-шаперонина GroES в 50 мМ Tris-HCl буфере, рН 7,5, содержащем 50 мМ, KCl, 3 мМ АТФ и 10 мМ MgCl₂. Инкубацию проводили в течение 2 часов при 20°C и постоянном перемешивании. Далее полученные образцы изучали с помощью флуоресценции тиофлавина Т.

7. Динамическое светорассеяние

Мы использовали метод динамического лазерного светорассеяния для контроля среднего размера частиц всех форм прионного белка

(мономеры, олигомеры и фибриллы), а также для изучения размера образующихся белковых комплексов. Опыты были проведены на приборе «Zetasizer Nano-ZS» (Malvern Instruments, Malvern, Великобритания), используемом для измерения размеров частиц в диапазоне от 1 до 10000 нм. Прибор оснащен лазером (длина волны 532 нм) и оптической системой, позволяющей измерять интенсивность светорассеяния под углом 173° . Измерение проводили при температуре 25°C в специальных кюветах, позволяющих использовать 0,1 мл исследуемого образца. Каждое приведенное на графиках распределение представляет собой среднее значение из 5 измерений, проведенных в течение 75 сек.

8. Иммуноферментный анализ

Раствор шаперонина иммобилизовали в лунках 96-луночного планшета в буфере PBS (10 мМ фосфатно-солевой буфер, pH 7,4 с 137 мМ NaCl и 2,7 мМ KCl). Инкубацию проводили в течение часа при 20°C и постоянном перемешивании, затем промывали лунки буфером PBS для удаления несвязавшихся молекул белка. Далее к сорбированному антигену добавляли разные формы прионного белка или альфа-синуклеина в качестве белка-партнёра в соотношении 1:1 и инкубировали смесь в лунках в течение часа при 20°C и постоянном перемешивании, после чего промывали лунки буфером PBST (PBS с 0,05% Tween-20). После добавляли в лунки первичные моноклональные антитела к С-концу PrP (Cell Signaling Technology, США) или к альфа-синуклеину (Abcam, США) в концентрации 1 мкг/мл в буфере PBS, pH 7,4 и инкубировали в течение часа при 20°C и перемешивании, после чего промывали лунки буфером PBST. После удаления несвязавшихся молекул первичных антител пробы инкубировали со вторичными антителами (анти-мышинные антитела козы, 1,5 мкг/мл в буфере PBST, pH 7,4),

конъюгированные с пероксидазой хрена, в тех же условиях, после чего снова промывали лунки буфером PBST. Далее в лунки добавляли смесь, содержащую 0,1М цитратный буфер, pH 4,5, 6,3 мМ спиртового раствора о-фенилендиамина и 0,06% перекиси водорода. Через 10 мин инкубации при 20°C и постоянном перемешивании в лунки добавляли 1н H₂SO₄ для остановки пероксидазной реакции. Далее получали значение оптической плотности раствора в лунках при $\lambda = 492$ нм с помощью планшетного спектрофотометра State Fax 2100 (Thermo Fisher Scientific, США).

9. Измерение концентрации АДФ

Концентрацию АДФ в реакционной смеси изучали энзиматически с помощью системы регенерации АТФ (рис. 8) [160].

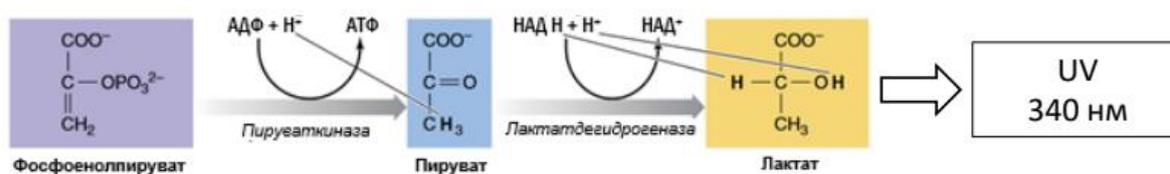


Рисунок 8. Схема реакций, протекающих при энзиматическом способе измерения концентрации АДФ в среде.

Сначала мы провели валидацию метода и построили калибровочную кривую для расчёта концентрации аденозиндифосфата (рис. 9). Для этого мы подготовили реакционную смесь, содержащую 50 мМ HEPES-NaOH, pH 8,0; 10 мМ KCl; 1 мМ MgCl₂, 2,5 мМ фосфоенолпирувата; 125 мкМ NADH, пируваткиназу и лактатдегидрогеназу (по 40 единиц/мл). Реакцию начинали добавлением аликвоты, содержащей АДФ, и измеряли оптическую плотность при длине волны 340 нм с помощью спектрофотометра Shimadzu UV-1601 UV/VIS Visible, что показывало образование NAD⁺ в пробе.

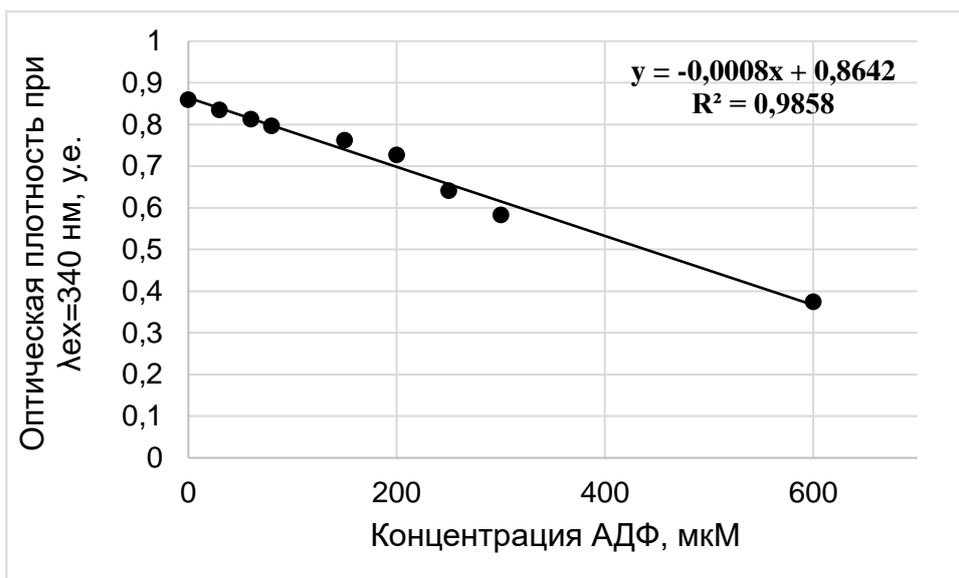


Рисунок 9. Калибровочная кривая для определения концентрации АДФ в пробе. При проведении эксперимента мы инкубировали 1 мкМ GroEL с 3 мкМ GroES в 50 мМ Tris-HCl буфере, pH 7,5, содержащем 10 мМ KCl, 10 мМ MgCl₂ и 3 мМ АТФ, в течение 60 мин при 20°C. При этом мы отбирали из смеси аликвоты каждые 10 минут и измеряли концентрацию АДФ в них.

10. SDS-электрофорез по методу Лэммли

Разделение и анализ белковых проб, полученных на разных стадиях работы, проводили электрофоретически в присутствии додецилсульфата натрия (SDS) по методу Лэммли [161]. В качестве электродного буфера использовали 0,025 М Tris, 0,192 М глицин, 0,1% SDS, pH 8,3. В качестве стандартов молекулярных масс использовали Pierce Unstained Protein Ladder (14,4-116 кДа). К образцам белка добавляли соответствующий объем 4-кратного буфера для образцов (0,25 М Tris-HCl, pH 6,8, 8%-ный SDS, 40%-ный глицерин, 0,04%-ный бромфеноловый синий, 5%-ный β-меркаптоэтанол) и инкубировали их в течение 10 мин при 95°C. На гель наносили 5-20 мкл белковых растворов, содержащих 0,5 – 15 мкг белка. Электрофорез проводили при постоянной силе тока 15 мА на одно стекло. Гели окрашивали в течение 5 мин в горячем растворе красителя (0,04%-

ный Кумасси R-250, 20%-ный изопропанол, 10%-ный этанол и 10%-ная уксусная кислота) и затем отмывали избыток красителя в 10%-ной уксусной кислоте при нагревании.

11. Трансмиссионная электронная микроскопия

Образцы, представляющие интерес, визуализировали с помощью просвечивающей электронной микроскопии. Аликвоты наносили на медные сетки, покрытые тонким слоем аморфного углерода (01843-F/01844-F, Ted Pella). После этого окрашивали образцы 2%-ным водным раствором уранилацетата и сушили на воздухе. Электронную микроскопию негативного контрастирования образцов проводили на электронном микроскопе JEOL JEM-2100 (JEOL, Япония) при напряжении 200 кВ.

12. Криоэлектронная микроскопия

12.1. Комплекс GroEL-GroES-нуклеотид

12.1.1. Подготовка образца

1 мкМ GroEL инкубировали с 3 мкМ GroES в 50 мМ Tris-HCl буфере, pH 7,5, содержащем 10 мМ KCl, 10 мМ MgCl₂ и 3 мМ АТФ в течение 60 мин при 20°C. Затем образец концентрировали в 10 раз с помощью центрифужного концентратора Millipore Microcon с пропускной способностью в 100 кДа. Далее наносили 3 мкл образца на сетки Quatifoil R1.2/1.3 для электронной микроскопии, предварительно обработанные в тлеющем разряде (20 мА, 5с). Лишнюю влагу с сетки промокали через 3,0с, и подвергали глубокой заморозке в жидком этане с использованием FEI Vitrobot Mark IV при 4,5 °C и 100% относительной влажностью.

12.1.2. Сбор и обработка данных

С помощью просвечивающего криоэлектронного микроскопа Titan Krios 60-300, оснащенного детектором электронов Falcon II, с размером пикселя 1,107 Å собрали 6784 видеоролика. За экспозицию было записано 25 кадров с дозой 4e/Å² на видеокадр. Коррекция движения, оценка CTF и сбор частиц были выполнены с помощью программного обеспечения Warp [162]. Для 2D-классификации частицы были экспортированы в Relion [163]. Генерация исходной модели, последующая 3D-классификация и уточнение с наложением C7 симметрии выполняли в cisTEM [164], в результате чего были получены два класса, представляющие разные состояния комплекса, каждый из которых содержал примерно 42 000 частиц. Частицы обоих классов были импортированы в cryoSPARC [165], сопоставлены со структурами из cisTEM с применённой C7 симметрией. Наконец, структуры были проанализированы на локальные вариации разрешения и локально увеличены в cryoSPARC. 3D-анализ вариабельности [166] выполнили для анализа режима движения апикального домена со следующими параметрами: фильтрация нижних частот = 6 Å, 3 режима.

12.2. Комплекс GroEL-PrP

12.2.1. Подготовка образца

Лиофилизированный прионный белок растворяли в 20 мМ натрий-ацетатном буфере, pH 4,0, а затем переводили его в 50 мМ Tris-HCl буфер, pH 7,5, содержащий 1 мМ ЭДТА (буфер для образцов, SB), с помощью колонки Sephadex-G25. Сульфат-аммонийную суспензию GroEL центрифугировали при 12000g в течение 10 мин. Полученный осадок растворяли в SB и диализовали белок против него в течение 2 часов. После этого 8 мкМ GroEL инкубировали с 16 мкМ PrP в SB в течение 30

мин при 21°C. Формирование комплекса GroEL-PrP было подтверждено с помощью динамического лазерного светорассеяния. Полученный образец центрифугировали 5 мин при 13000g для осаждения крупных агрегатов, затем надосадочную жидкость концентрировали в 2 раза с помощью центрифужного концентратора Millipore Microcon с пропускной способностью 100 кДа. Далее 3 мкл образца наносили на медные сетки Quantifoil R1.2/1.3 для электронной микроскопии, предварительно обработанные в тлеющем разряде (20 мА, 5с). Лишнюю влагу с сетки промокали через 3,0с, и подвергали глубокой заморозке в жидком этане с использованием FEI Vitrobot Mark IV при 4,5 °C и 100% относительной влажностью.

12.2.2. Сбор и обработка данных

С помощью просвечивающего криоэлектронного микроскопа Titan Krios 60-300, оснащенного детектором электронов Falcon II, с размером пикселя 1,107Å собрали 1631 видеоролика. За одну экспозицию было записано 25 кадров с дозой 4,0 e/Å² на кинокадр в диапазоне расфокусировки от -1,0 до -2,6 мкм. Коррекция движения и оценка СТФ выполняли с помощью MotionCor2 и Ctffind, а частицы собирались с помощью CrYOLO [167]. После двух раундов 2D-классификации в Relion [168] для первоначального построения модели и 3D-классификации было отобрано 106 тыс. частиц. Дополнительная 2D-классификация была выполнена с помощью GPU ISAC [169] для оценки неоднородности выборки. Трехмерные классификации в Relion позволили нам выбрать подмножество частиц, которое демонстрирует некоторую дополнительную плотность в полости GroEL, однако она видна только при низких порогах карты. Мы применили расширение симметрии C2, чтобы объединить информацию из обоих колец GroEL, тем самым эффективно удвоив количество частиц, присутствующих в

реконструкции. Такая трехмерная классификация с использованием маски, закрывающей центральную полость одного из колец GroEL, позволила отобрать те классы молекул, в которых чётко выделяется дополнительная электронная плотность, лежащая между апикальными доменами. Плотность частиц вне маски была невелирована, чтобы уменьшить её влияние на классификацию. Частицы из отобранных классов были подвергнуты окончательному 3D уточнению. В итоге была получена карта электронной плотности с разрешением 4,0Å. Локальное разрешение оценили с помощью программного обеспечения PHENIX local_resolution.

12.3. Комплекс GroEL-альфа-синуклеин

12.3.1. Подготовка образца

Для получения комплекса 2 мкМ GroEL инкубировали с 20 мкМ альфа-синуклеина в 50 мМ Tris-HCl буфере, pH 7,5 в течение 15 минут при постоянном перемешивании 550 об/мин при 20°C, используя термошейкер Eppendorf Thermomixer. Далее 3 мкл образец наносили на медные сетки Quantifoil R1.2/1.3 для электронной микроскопии, предварительно обработанные в тлеющем разряде (20 мА, 5с). Лишнюю влагу с сетки промокали через 3,0с, и подвергали глубокой заморозке в жидком этане с использованием FEI Vitrobot Mark IV при 4,5 °C и 100% относительной влажностью.

12.3.2. Обработка и сбор данных

С помощью просвечивающего криоэлектронного микроскопа Titan Krios 60-300, оснащенного детектором электронов Falcon II, с размером пикселя 1,107Å и программного обеспечения EPU (FEI) собрали 1725 видеоролика. Далее мы использовали программный пакет Warp [162] для

коррекции движения, оценки параметров функции переноса контраста (CTF) и выделения частиц. С помощью CryoSPARC [165] провели 2D-классификацию и расчёт 3D-реконструкции без наложения симметрии. Разрешение полученной структуры составило 3,63 Å по критерию FSC=0,143. Для дальнейшего анализа атомную модель GroEL (PDB: 1SS8) наложили на полученную в ходе 3D-реконструкции электронную плотность и обнаружили в области апикальных доменов дополнительную плотность.

12.4. Комплекс TRiC-АТФ-гамма-S

12.4.1. Подготовка образцов

Перед тем как приступить к изучению структуры эукариотического шаперонина TRiC методом криоэлектронной микроскопии, мы оценили качество препарата белка с помощью электронной микроскопии с применением негативного контрастирования. На рис. 10А видно, что шаперонин образует на сетке равномерный слой одиночных частиц, лежащих в разных проекциях. Такие параметры позволили нам перейти к использованию Крио-ЭМ.

Для криоэлектронной микроскопии мы увеличили концентрацию TRiC в пробе в 10 раз и получили 1 мг/мл шаперонина в 50 mM Tris-HCl pH 7,5; 100 mM KCl. Однако после заморозки в жидком этане медных сеток Quantifoil R1.2/1.3 с нанесённым на них образцом практически весь белок оказался собран в крупные агрегаты. Пример изображения, полученного нами при изучении образца, замороженного для исследования методом криоэлектронной микроскопии, представлен на рисунке 10Б.

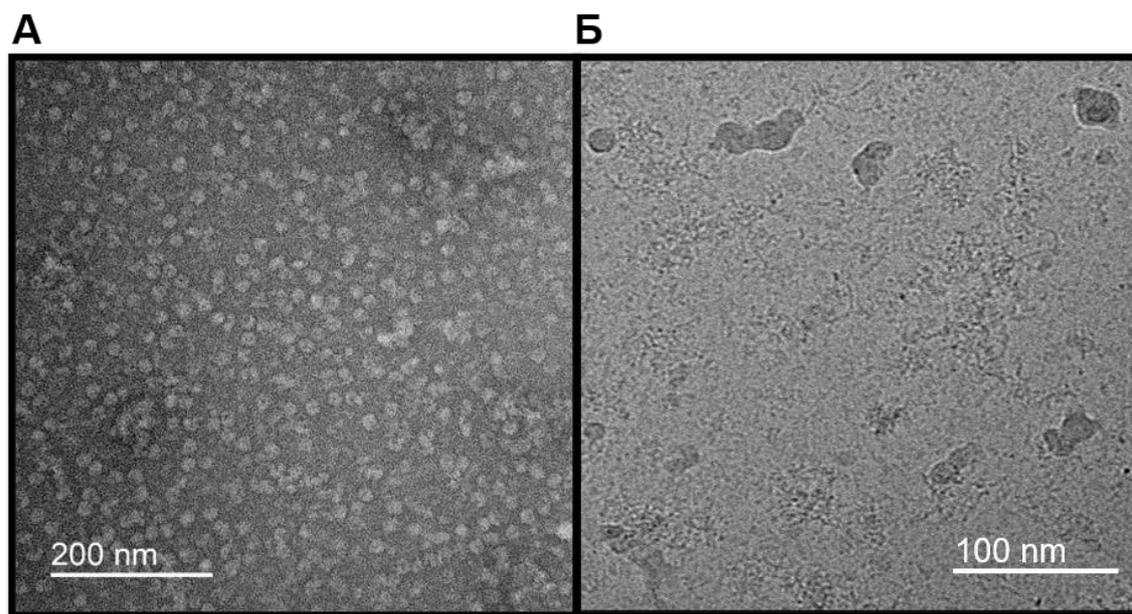


Рисунок 10. Микрографии образца, содержащего эукариотический шаперонин TRiC, полученные (А) методом электронной микроскопии с применением негативного контрастирования и (Б) заморозкой в жидком этане. Концентрация белка в пробе 0,1 мг/мл для электронной микроскопии и 1 мг/мл для криоэлектронной микроскопии. Образцы были подготовлены в 50 мМ Tris-HCl pH 7,5; 100 мМ KCl и нанесены на обработанную в тлеющем разряде медную сетку с углеродным покрытием. В случае электронной микроскопии проводили окрашивание 1% раствором уранилацетата. Исследование проводили на электронном микроскопе JEOL JEM-2100 (JEOL, Япония) и на просвечивающем криоэлектронного микроскопа Titan Krios 60-300.

Исходя из полученного результата мы приняли решение оптимизировать условия заморозки эукариотического шаперонина: мы варьировали концентрацию белка, буферные условия, а также типы покрытия, нанесённого на сетки. Результаты проделанной работы представлены в таблице 2.

Таблица 2. Процесс оптимизации образцов эукариотического шаперонина TRiC для получения структуры с помощью криоэлектронной микроскопии. GO – дополнительный слой оксида графена, C – дополнительный слой аморфного углерода толщиной n нм, PolyL – обработка 0,1% раствором полилизина.

Все сетки были обработаны в тлеющем разряде (20 мА, 5с). Лишнюю влагу промокали через 3,0с, и подвергали глубокой заморозке в жидком этане при 4,5 °С и 100% относительной влажностью.

№ п/п	Концентрация TRiC	Состав буфера	Сетки	Оценка исследованного образца
1	1 мг/мл	50 мМ Tris-HCl pH 7,5; 100 мМ KCl	Quantifoil R1.2/1.3	Одиночных молекул мало, в основном агрегаты и/или развалившийся.
2	1,34 мг/мл	50 мМ Tris-HCl pH 7,5; 100 мМ KCl	Quantifoil R1.2/1.3 + GO	Одиночных частиц стало больше, но они лежат в проекции “вид сверху” и тоже окружены агрегатами.
3	0,5 мг/мл	50 мМ Tris-HCl pH 7,5; 100 мМ KCl	Quantifoil R1.2/1.3 + 3nm C	Много агрегатов, все частицы в проекции “вид сверху”.
4	0,5 мг/мл	20 мМ HEPES pH 7,2; 150 мМ KCl	Quantifoil R1.2/1.3 + GO + PolyL	По-прежнему присутствуют агрегаты, нет боковых проекций.
5	0,72 мг/мл	20 мМ HEPES, pH 7,2; 10% глицерола	Quantifoil R1.2/1.3	Частицы в приоритетном боковом положении, но присутствуют агрегаты и малое количество частиц на изображение.
6	1,3 мг/мл	20 мМ HEPES, pH 7,2; 10% глицерина, 1 мМ АТФ-гамма-S	Quantifoil R1.2/1.3	Образцы с наилучшим качеством. Концентрация частиц во льду достаточна для автоматизированного набора. Частицы видны во льду вне зависимости от обработки полилизином.
7		20 мМ HEPES, pH 7,2; 20% глицерина, 1 мМ АТФ-гамма-S	Quantifoil R1.2/1.3 + PolyL	

В итоге нами были получены два образца (№6 и №7), с которых мы собрали достаточное количество данных для дальнейшей обработки. Для получения образцов мы инкубировали 1,3 мг/мл (1,35 мкМ) TRiC с 1 мМ негидролизуемого аналога АТФ - АТФ-гамма-S - в Tris-HCl буфере, рН 7,5 в присутствии 10% (образец №6) или 20% (образец №7) глицерина в течение 10 минут при 20°C. Далее 3 мкл образца №6 мы наносили на медные сетки Quantifoil R1.2/1.3 для электронной микроскопии, предварительно обработанные в тлеющем разрядом (20 мА, 5с). В свою очередь 3 мкл образца №7, мы наносили на медные сетки Quantifoil R1.2/1.3, к которым после обработки в тлеющем разряде добавляли 0.1% раствор полизина и высушивали перед использованием. Лишнюю влагу с сетки промокали через 3,0с, и подвергали глубокой заморозке в жидком этане с использованием FEI Vitrobot Mark IV при 4,5°C и 100% относительной влажностью.

12.4.2. Обработка и сбор данных

С помощью просвечивающего криоэлектронного микроскопа Titan Krios 60-300, оснащенного детектором электронов Falcon II, с размером пикселя 1,107Å и программного обеспечения EPU (FEI) мы собрали 2512 стеков изображений с образца № 6. Далее при помощи программного пакета Warp [162] мы произвели коррекцию дрейфа, оценку параметров функции передачи контраста и выбор на изображениях одиночных проекций комплекса. Из исходных изображений мы выделили 165000 проекции одиночных частиц после пре-процессинга и экспортировали их в программный пакет CryoSPARC [165]. На следующем этапе мы провели двухмерную классификацию проекций, после которой выбрали 74000 частиц для дальнейшего анализа. Одновременно с этим удалили ориентации, которые были представлены сильнее других.

Генерация начальной модели, а также первоначальная трехмерная реконструкция осуществлялись в том же CryoSPARC. Предварительная структура показала сильный эффект приоритетных ориентаций на качество реконструкции. В частности, в направлениях, перпендикулярных наиболее представленному, наблюдались артефакты, в связи с чем среднее разрешение модели было переоценено. Для компенсации данного эффекта были получены данные под наклоном 15° . Полученные классовые суммы по-прежнему демонстрировали нахождение большинства частиц в одной приоритетной ориентации, однако количество частиц в промежуточных ориентациях было увеличено благодаря наклону образца.

На следующем этапе мы изучили сетки, на которые был нанесён образец №7 и выяснили, что отсутствие дополнительной поддерживающей пленки оказалось необходимым для обеспечения достаточного контраста от белковых частиц при повороте сетки на 45° , в связи с чем экспериментальные данные были набраны и 2D классификация была проведена отдельно для данных условий эксперимента. Полученные классовые суммы позволили получить 28000 проекций, не представленных ранее при получении данных без наклона образца.

На последнем этапе частицы, полученные без наклона, а также с наклоном 15° и 45° , были сгруппированы и использовались для трехмерной классификации и реконструкции в cryoSPARC.

13. Молекулярная динамика

Начальные конформации GroEL и PrP были выбраны из молекулярно-динамического моделирования двух отдельных белков, проведенного нашей группой ранее [170]. Комплекс GroEL-PrP был собран в двух вариантах: GroEL-PrP(N) с N-доменом в полости GroEL и

GroEL-PrP(C) с C-доменом в полости GroEL. Начальная пространственная ориентация и глубина внедрения PrP(N) или PrP(C) в полость GroEL были выбраны таким образом, чтобы домен PrP был погружен на максимальную глубину с минимальным пересечением атомов. Оба варианта были согласованы с электронными плотностями, полученными с помощью криоэлектронной микроскопии. Моделирование молекулярной динамики проводили в программном пакете GROMACS [171] версии 2020.1 с использованием силового поля a99SB-disp, которое было разработано для регистрации динамики как структурированных, так и неупорядоченных белков [172]. Во время расчётов был использован временной шаг интегрирования 2 фс и применены периодические трёхмерные граничные условия. Моделирование проводили при температуре 300 К и постоянном давлении 1 бар с использованием алгоритмов V-rescale [173] и алгоритма Парринелло-Рахмана [174] соответственно. Для кулоновского и ван-дер-ваальсовых взаимодействий был определён максимальный радиус в 12 Å. Электростатические эффекты учитывали с помощью суммирования Эвальда по сетке частиц [175]. Также была использована явная модель растворителя (TIP4P-D [176]), ионная сила раствора соответствовала 150 mM NaCl. Перед МД-моделированием системы подвергались минимизации энергии (1000 шагов сопряженного градиента) с последующим нагревом от 5 до 300 К в течение 5 нс. Молекулы белка и растворителя соединяли по отдельности. В результате для каждого варианта комплекса GroEL-PrP получили траектории длительностью 500 нс.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Получение гомогенных препаратов белков

1.1. Амилоидногенные белки

В результате каждого выделения нами было получено от 20 до 35 мг очищенного препарата прионного белка или α -синуклеина из 1 г бактериальных клеток. На рисунке 11 представлены электрофореграммы амилоидогенных белков, полученных после очистки.

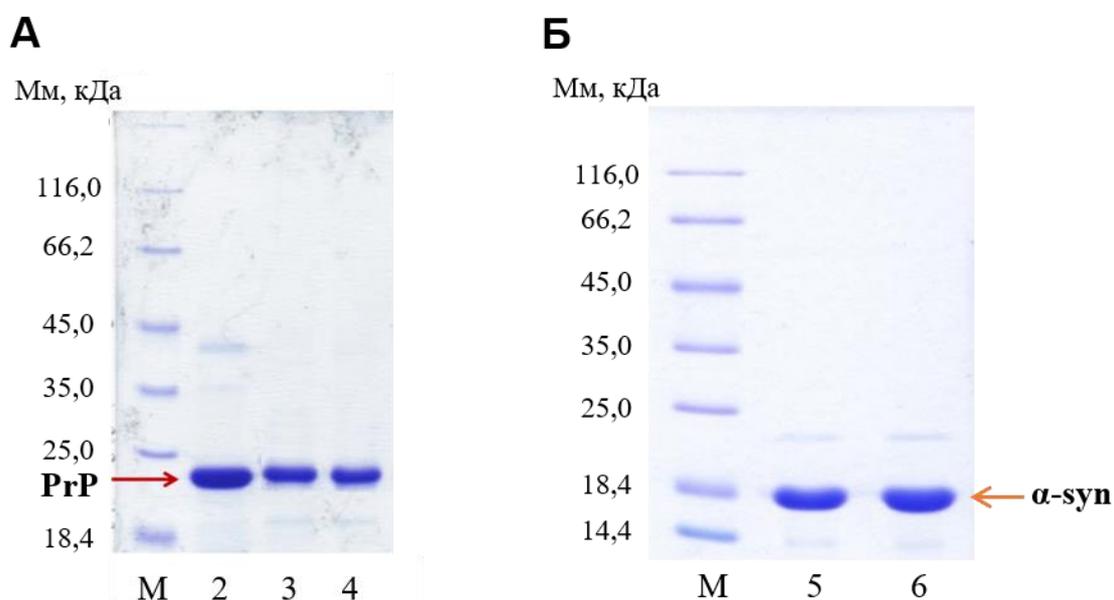


Рисунок 11. Анализ очищенных препаратов прионного белка (А) и альфа-синуклеина (Б) методом ПААГ-электрофореза (12,5% и 16% разделяющие гели, соответственно) в восстанавливающих условиях (в присутствии β -меркаптоэтанола). М-маркеры (14,4-116 кДа); 2 – препарат PrP, отправленный на лиофилизацию; 3-4 – лиофилизированный PrP, растворённый в 20 мМ натрий-ацетатном буфере, рН 4,0; 5 – α -syn после высаливания сухим сульфатом аммония до 40%-ого насыщения; 6 - α -syn после перекристаллизации.

Кажущаяся молекулярные массы прионного белка, полученная методом электрофореза в 12,5% полиакриламидном геле в восстанавливающих условиях, совпадает с теоретической, которая составляет 23 кДа. В случае же альфа-синуклеина кажущаяся молекулярная масса, полученная в 16% полиакриламидном геле в восстанавливающих условиях, составляет около 18 кДа (рис. 11, дорожки 5 и 6), что больше теоретической - 14 кДа. Такой эффект наблюдается предположительно за счёт наличия в составе С-концевого домена белка большого количества отрицательно заряженных остатков глутаминовой и аспарагиновой кислот, которые замедляют подвижность белка в полиакриламидном геле.

1.2. Шаперонины

В результате каждого выделения нами было получено по 70-80 мг GroEL и GroES из 1 г бактериальных клеток и 30-40 мг TRiC из одного бычьего семенника. На рисунке 12 продемонстрированы электрофореграммы шаперонинов, полученные после очистки белков. Бактериальные шаперонины состоят из идентичных субъединиц, поэтому на рисунке 12А видны мажорные полосы, принадлежащие GroEL и GroES. В свою очередь, все 8 субъединицы эукариотический шаперонин TRiC различаются между собой и обладают разной молекулярной массой. Поэтому на электрофореграмме на рисунке 12Б очищенный препарат шаперонина представлен в виде нескольких полос.

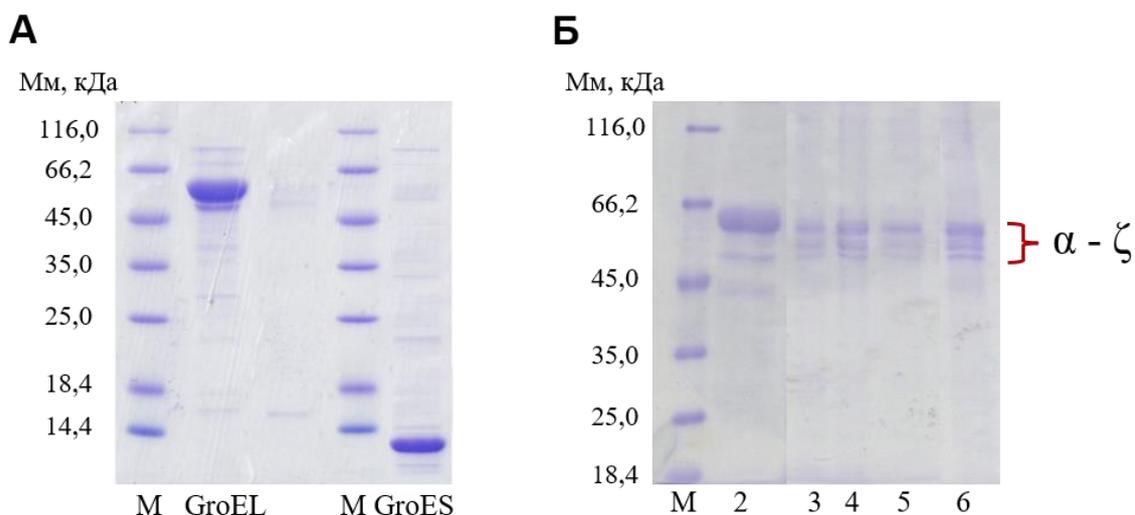


Рисунок 12. Анализ очищенных препаратов бактериального шаперонина GroEL и его ко-шаперонина GroES (А), а также эукариотического шаперонина TRiC (Б) методом ПААГ-электрофореза (12,5% разделяющие гели) в восстанавливающих условиях (в присутствии β -меркаптоэтанола). М-маркёры (14,4-116 кДа); 2 – мономер бактериального шаперонина GroEL (60 кДа); 3-6 – препараты эукариотического шаперонина TRiC, полученные после второго раунда хроматографической очистки на гепарин-агарозе.

Мы также изучили полученные препараты с помощью динамического светорассеивания. Анализ частиц на распределение по интенсивности светорассеивания (рис. 13А) обнаружил небольшую гетерогенность в случае обоих белков, о чём свидетельствует наличие на графике дополнительных пиков. Однако данный параметр позволяет увидеть даже незначительные примеси более крупных частиц, так как они сильно рассеивают свет из-за своего размера, а высокочувствительный датчик фиксирует даже слабый сигнал. Поэтому для уточнения данных мы обратились к параметру, в рамках которого сигнал, полученный при рассеивании света, нормируется на суммарный объём, который занимают частицы конкретного размера. Применяв указанный метод, мы получили график, на котором каждому препарату шаперонинов соответствует один пик, то есть один размер частиц

(рис. 13Б). Этот результат подтверждает, что популяция частиц, гидродинамический диаметр которых отличается от 12 нм в случае шаперонина GroEL и от 18 нм в случае эукариотического TRiC, настолько мала, что мы можем ей пренебречь и посчитать наши препараты достаточно гомогенными, чтобы продолжить работать с ними.

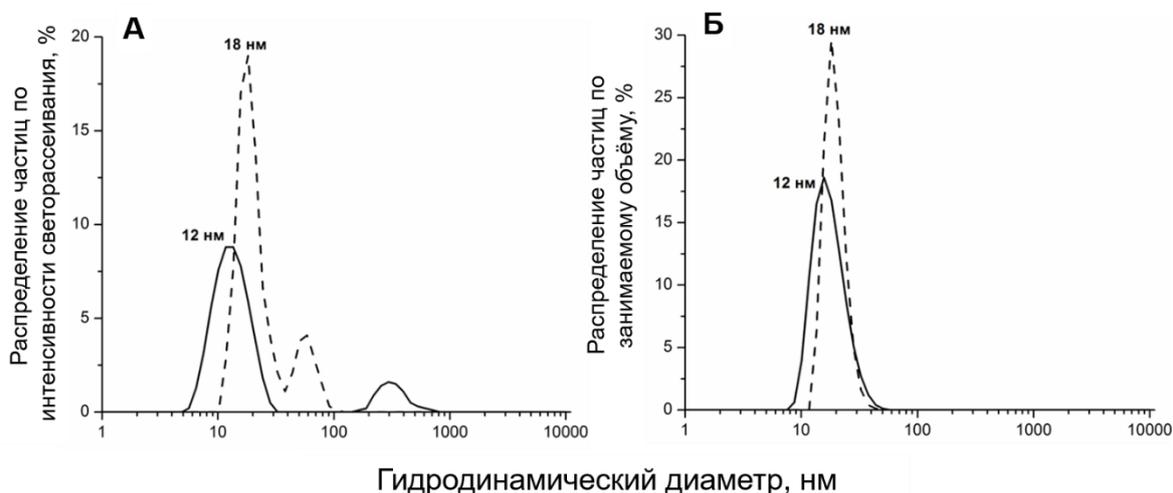


Рисунок 13. Распределение числа частиц по интенсивности светорассеивания (А) и по занимаемому ими объёму (Б) в образцах, содержащих 0,6 мкМ бактериального шаперонина GroEL (сплошная линия) или эукариотического TRiC (пунктирная линия).

Измерение проводили в 10 мМ калий-фосфатном буфере, рН 7,5, содержащем 1 мМ ЭДТА при 20°C и постоянном.

2. Получение разных форм прионного белка

В ходе отработки методики, согласно которой из мономеров прионного белка должны образовываться олигомеры (см. Материалы и методы, раздел 2), нами была получена гомогенная популяция частиц, размер которых больше олигомеров, но меньше фибрилл. Данная популяция была названа «протофибриллами». Таким образом, нам удалось поработать с 4 формами PrP: мономерами, олигомерами, «протофибриллами» и фибриллами.

Мы изучили популяции разных форм PrP с помощью динамического светорассеивания (рис. 14). Как и в случае с шаперонинами, распределение частиц по занимаемому объёму позволяет нам говорить об относительной гомогенности препаратов, с которыми мы проводили дальнейшие исследования.

Алгоритм, который используется в методе динамического светорассеивания, производит расчёт гидродинамического диаметра молекулы, вписывая её в гипотетический шар. Протофибриллы и фибриллы прионного белка имеют форму стопки монет, то есть одна из осей молекулы значительно длиннее двух других. Поэтому гидродинамический диаметр этих частиц определяется условно, что отображено на рисунке 14 с помощью заключения соответствующих значений в кавычки.

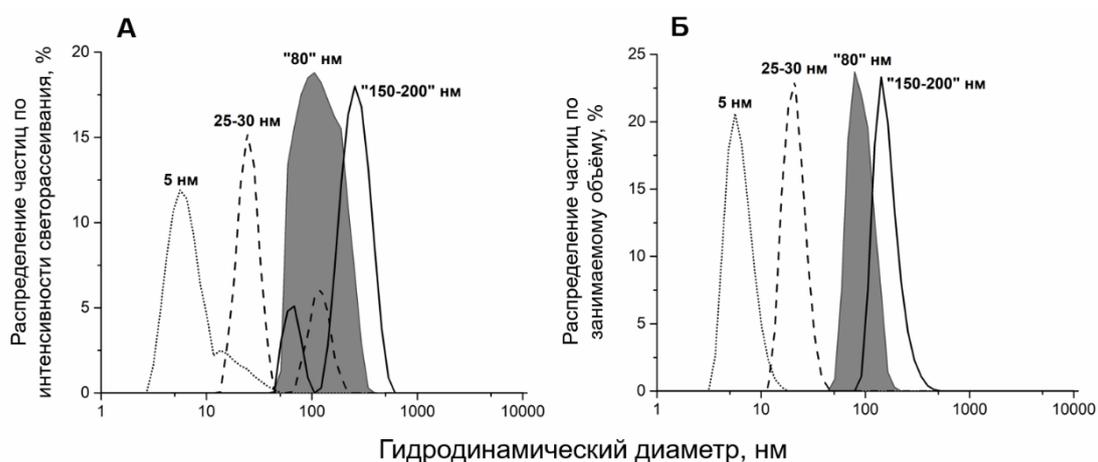


Рисунок 14. Распределение числа частиц по интенсивности светорассеивания (А) и по занимаемому ими объёму (Б) в образцах, содержащих 0,6 мкМ разных форм прионного белка. Линией из коротких точек обозначены мономеры PrP, пунктирной – олигомеры, сплошной – фибриллы, серым цветом – протофибриллы. Измерение проводили в 10 мМ калий-фосфатном буфере, рН 7,5, содержащем 1 мМ ЭДТА при 20°C и постоянном

Мы также подтверждали амилоидную природу полученных фибрилл и протофибрилл прионного белка, инкубируя PrP с тиофлавином Т. По спектрам флуоресценции ThT, представленным на рисунке 15, видно, как растёт количество бета-складчатых структур в составе разных форм PrP.

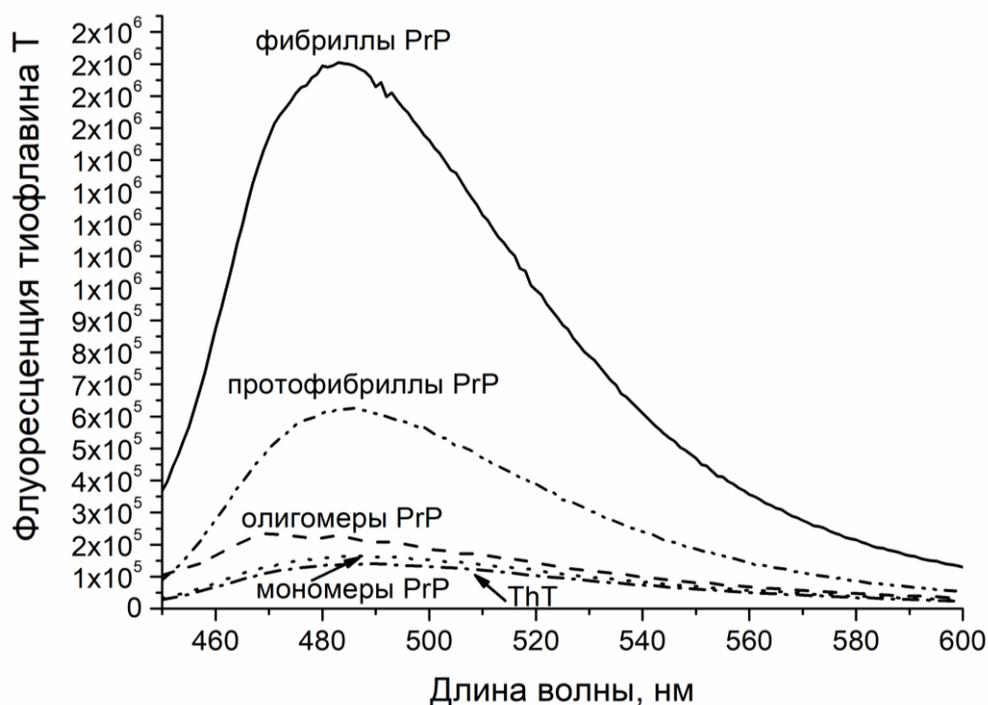


Рисунок 15. Спектры флуоресценции тиофлавина Т в присутствии 0,6 мкМ разных форм прионного белка.

0,6 мкМ белка в расчёте на мономер инкубировали с 6 мкМ ThT в 10 мМ калий-фосфатном буфере, рН 7,5, содержащем 1 мМ ЭДТА, при 20°C в течение 10 мин.

3. 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.

3.1. 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, узнающих эпитоп Q²²⁰YQRES²²⁵, входящий в состав С-концевого домена PrP. Как следует из рисунка 16, использованные нами антитела эффективно связываются не только с мономерами прионного белка, но и с другими его формами, 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.

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 Mg²⁺, чтобы получить работающий комплекс GroEL-GroES. Метод динамического светорассеяния показал, что после двухчасовой инкубации мономерных (рис. 17А) и олигомерных (рис. 17Б) 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, который можно заметить при изучении спектров, представленных рисунке 18, указывает на то, что полученные белковые агрегаты обладают амилоидной структурой.

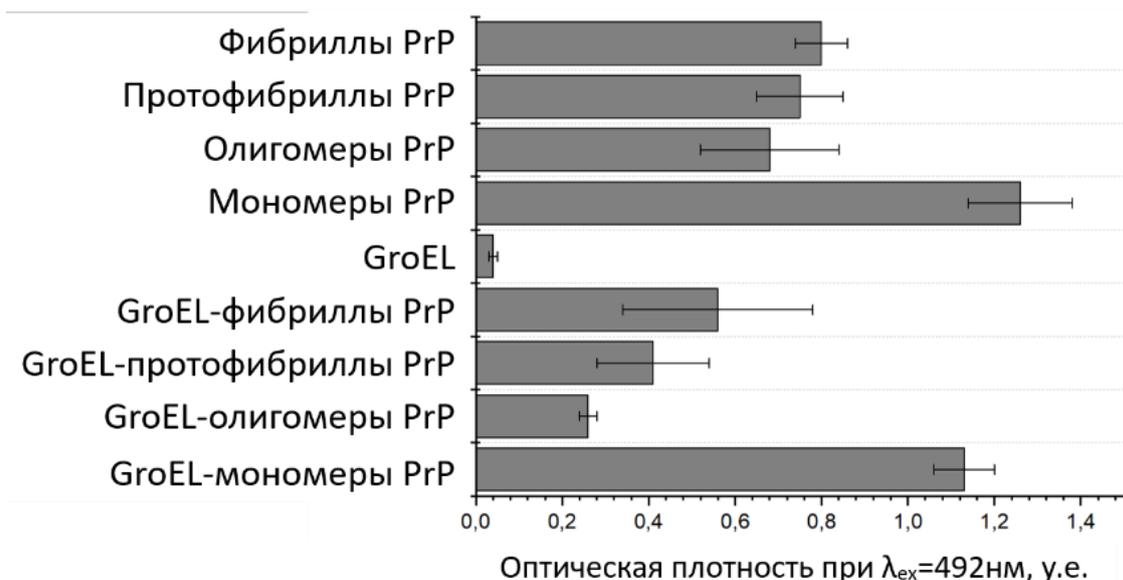


Рисунок 16. Взаимодействие бактериального шаперонина GroEL с разными формами прионного белка, выявленное методом иммуноферментного анализа с помощью антител на эпитоп, входящий в состав С-концевого домена PrP.

*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).*

То же самое справедливо и для агрегатов, которые получились при инкубировании комплекса шаперонинов с протофибриллами (рис. 17В) и фибриллами (рис. 17Г) PrP. Однако в этом случае мы наблюдали образование не только крупных, но и небольших частиц, которые своим размером напоминают либо одиночные мономеры либо мономеры, связанные с GroEL-GroES. Популяции этих частиц становятся заметны уже при использовании параметра “распределение частиц по интенсивности светорассеивания” и сохраняются при переходе к параметрам “распределение частиц по занимаемому объёму” и

“распределение частиц по размеру” (данные не представлены). 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.

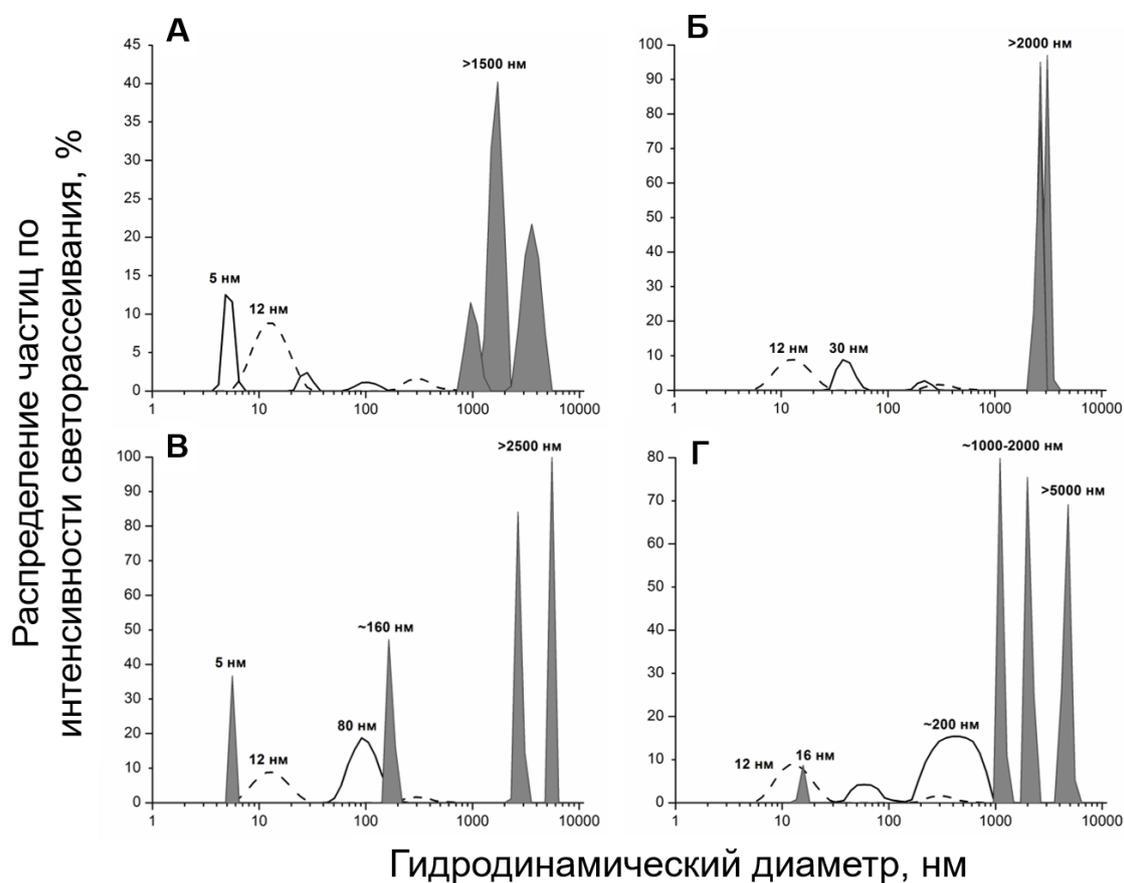


Рисунок 17. Распределение числа частиц по интенсивности светорассеивания в образцах после 2-часовой совместной инкубации разных форм прионного белка с комплексом GroEL-GroES в присутствии Mg-АТФ, определённое по измерению параметров динамического светорассеяния. Сплошной линией обозначены размеры разных формы PrP, пунктирной - комплекса GroEL-GroES, серым цветом - результаты совместной инкубации белков.

0,6 мкМ бактериального комплекса шаперонинов GroEL-GroES инкубировали с А) 0,6 мкМ мономеров; Б) 0,6 мкМ олигомеров; В) 0,6 мкМ “протофибрилл”; Г) 0,6 мкМ фибрилл прионного белка.

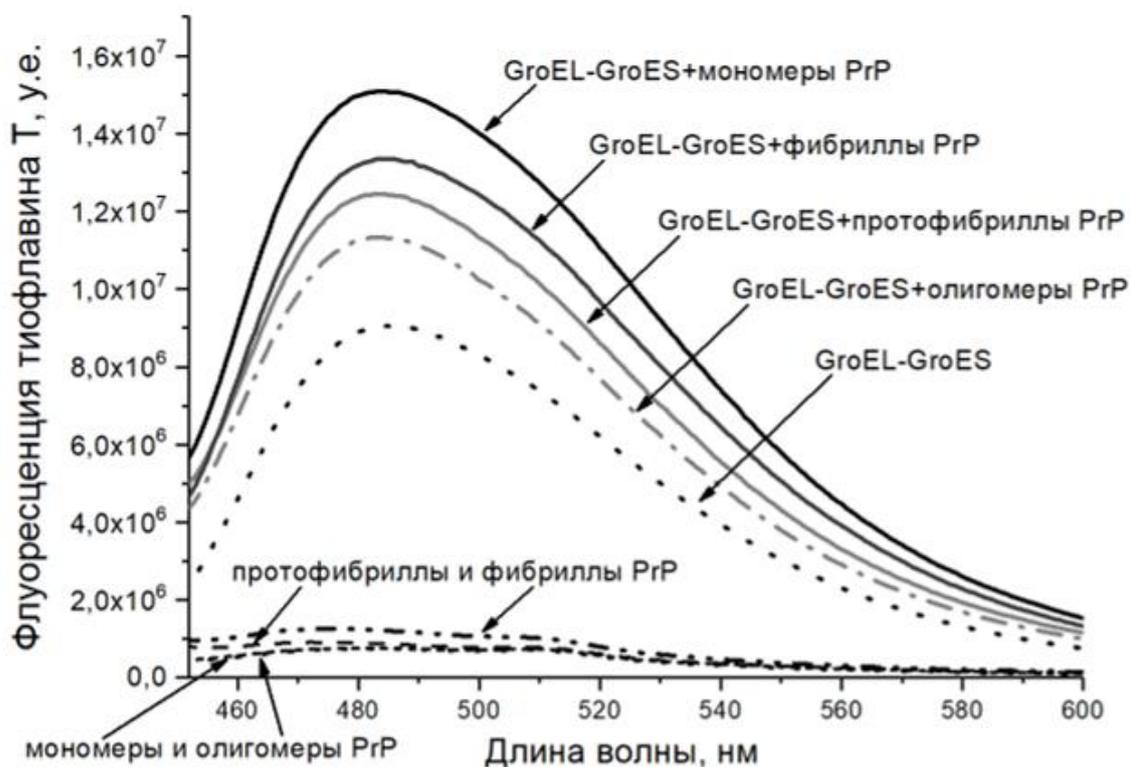


Рисунок 18. Спектры флуоресценции тιοфлавина Т в образцах, полученных после 2-часовой совместной инкубации разных форм прионного белка с комплексом GroEL-GroES в присутствии Mg-АТФ. 0,6 мкМ PrP (в расчёте на мономер белка) инкубировали с 0,6 мкМ GroEL и 1,2 мкМ GroES в 10 мМ калий-фосфатном буфере, рН 7,5, содержащем 1 мМ ЭДТА, 2 мМ АТФ и 2 мМ MgCl₂. Инкубацию проводили при 20°C и постоянном перемешивании.

3.2. Взаимодействие комплекса GroEL-GroES с альфа-синуклеином

На следующем этапе работы нами 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.

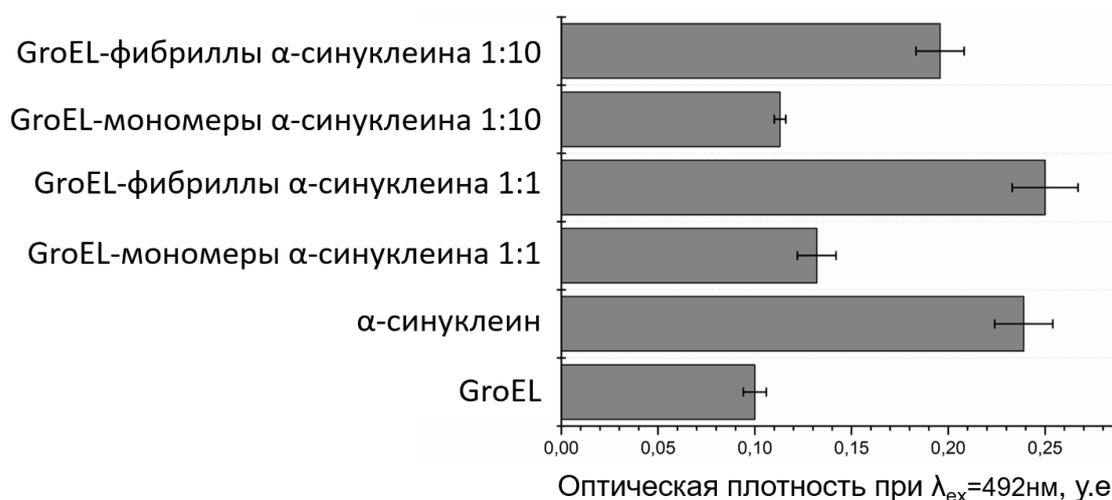


Рисунок 19. Взаимодействие бактериального шаперонина GroEL с разными формами альфа-синуклеина, выявленное методом иммуноферментного анализа с помощью моноклональных антител на альфа/бета-синуклеин. На диаграмме представлена величина оптической плотности при $\lambda=492$ нм в разных пробах. Альфа-синуклеин был взят в двух молярных соотношениях: 1 к 1 и в 10-кратном избытке по отношению к шаперонину. 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).

Как следует из приведенных на рисунке 19 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, где присутствовал только шаперонин 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 частиц может происходить глубоко в полости GroEL.

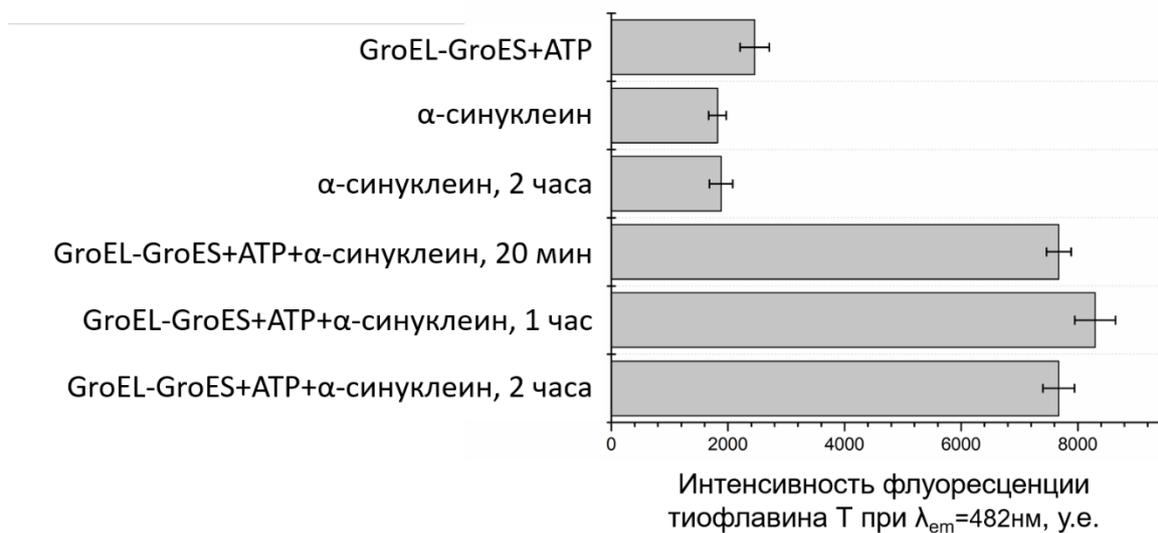


Рисунок 20. Флуоресценция тиофлавина Т при взаимодействии бактериального комплекса шаперонинов GroEL-GroES с 10-кратным избытком мономеров альфа-синуклеина в присутствии Mg-АТФ в течение разного времени. На диаграмме представлена интенсивность флуоресценции тиофлавина Т при $\lambda_{em}=482$ нм в разных пробах. Все данные представлены как экспериментальные значения ($n=6$) с указанием стандартного отклонения от среднего.

Кроме того, нами было исследовано влияние рабочего (в присутствии Mg^{2+} -АТФ) бактериального комплекса шаперонов GroEL-GroES на амилоидоизацию альфа-синуклеина, оцениваемую по увеличению флуоресценции тиофлавина Т в пробе. Данные, приведенные на рис. 20, 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 уже за первые 20 минут совместной инкубации. Данный факт указывает на то, что мономеры α -сун скорей всего всё же связываются с исследуемым шаперонином. Вероятно, при высоких концентрациях α -синуклеина GroEL стимулирует его фибриллизацию, например, за счёт

перехода в раствор измененных форм амилоидного белка, склонных к патологической агрегации. Нельзя исключить также, что связанный с шаперонином альфа-синуклеин является «затравкой» для образования фибрилл.

4. Изучение взаимодействия эукариотического шаперонина TRiC с разными формами прионного белка

Далее 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 нашим источником PrP, относят к семейству Полорогих.

Для начала мы убедились в том, что шаперонин TRiC способен связываться с разными формами PrP. Связывание белков было подтверждено методом иммуноферментного анализа (рис. 21) с применением тех же антител что и в случае с бактериальным шаперонином GroEL.

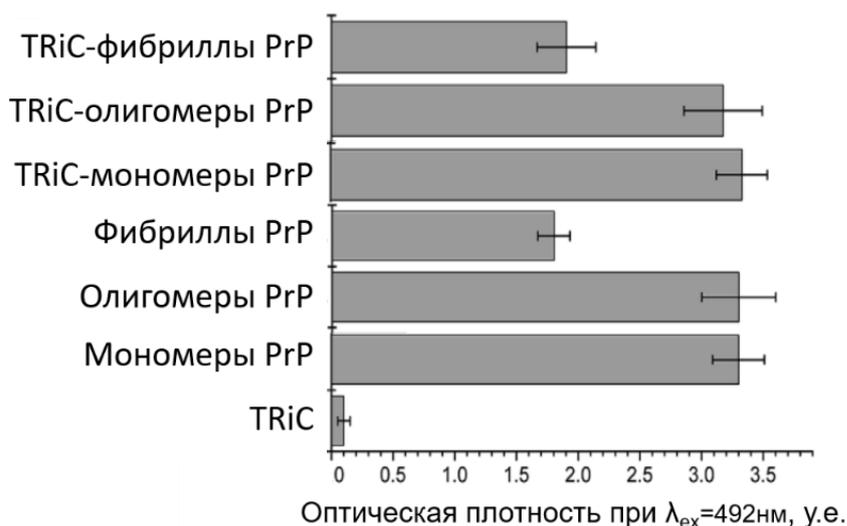


Рисунок 21. Взаимодействие эукариотического шаперонина TRiC с разными формами прионного белка, выявленное методом иммуноферментного анализа с помощью антител на эпитоп, входящий в состав С-концевого домена PrP На диаграмме представлена величина оптической плотности при $\lambda=492$ нм в разных пробах. 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).

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 (рис.22), с помощью флуоресценции тиофлавина Т (рис. 23), а также с помощью электронной микроскопии с применением негативного контрастирования (рис. 24).

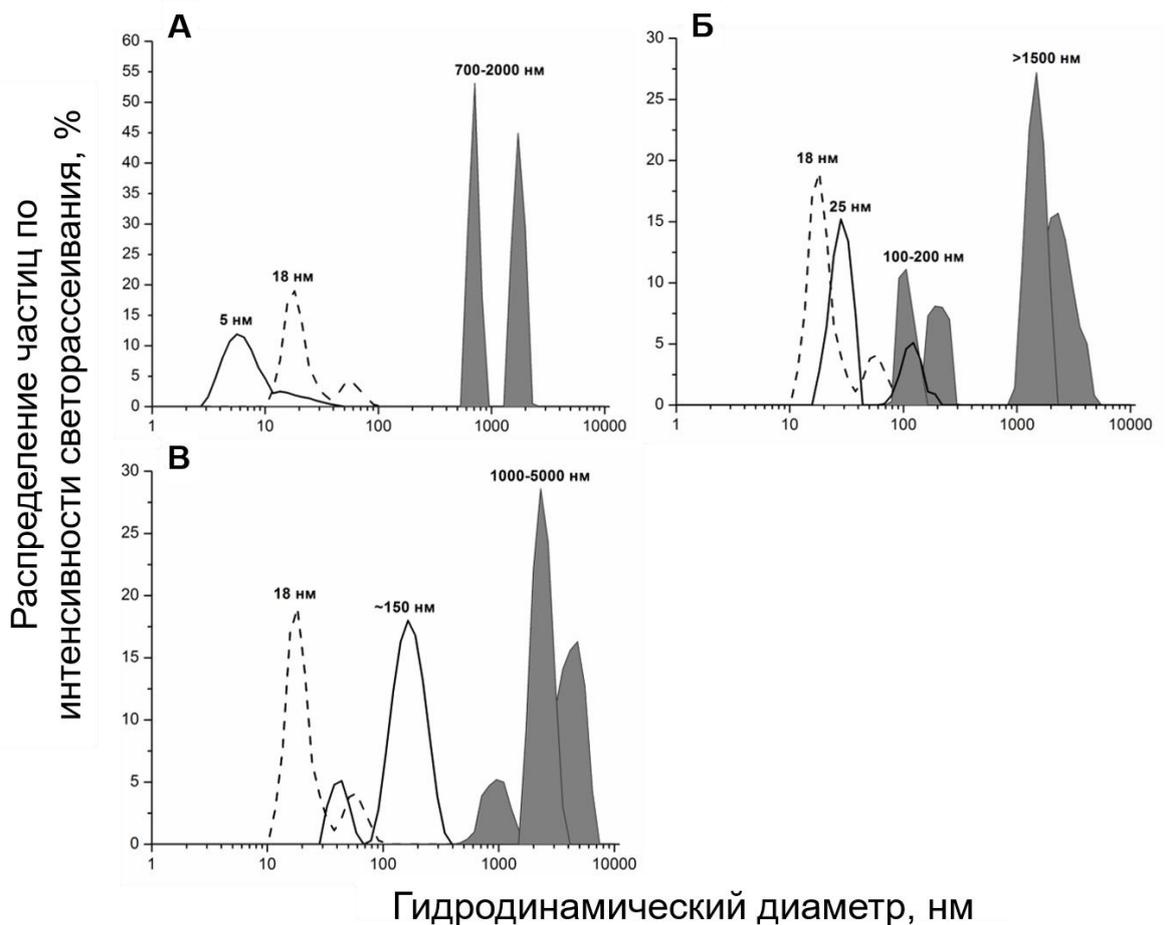


Рисунок 22. Распределение числа частиц по интенсивности светорассеивания в образцах после 2-часовой совместной инкубации разных форм прионного белка с эукариотическим шаперонином TRiC в присутствии Mg-АТФ, определенное по измерению параметров динамического светорассеяния. *Сплошной линией обозначены размеры разных формы PrP, пунктирной – шаперонина TRiC, серым цветом - результаты совместной инкубации белков.*

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

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 на рисунке 22, в свою очередь, указывает на амилоидную природу образовавшихся агрегатов.

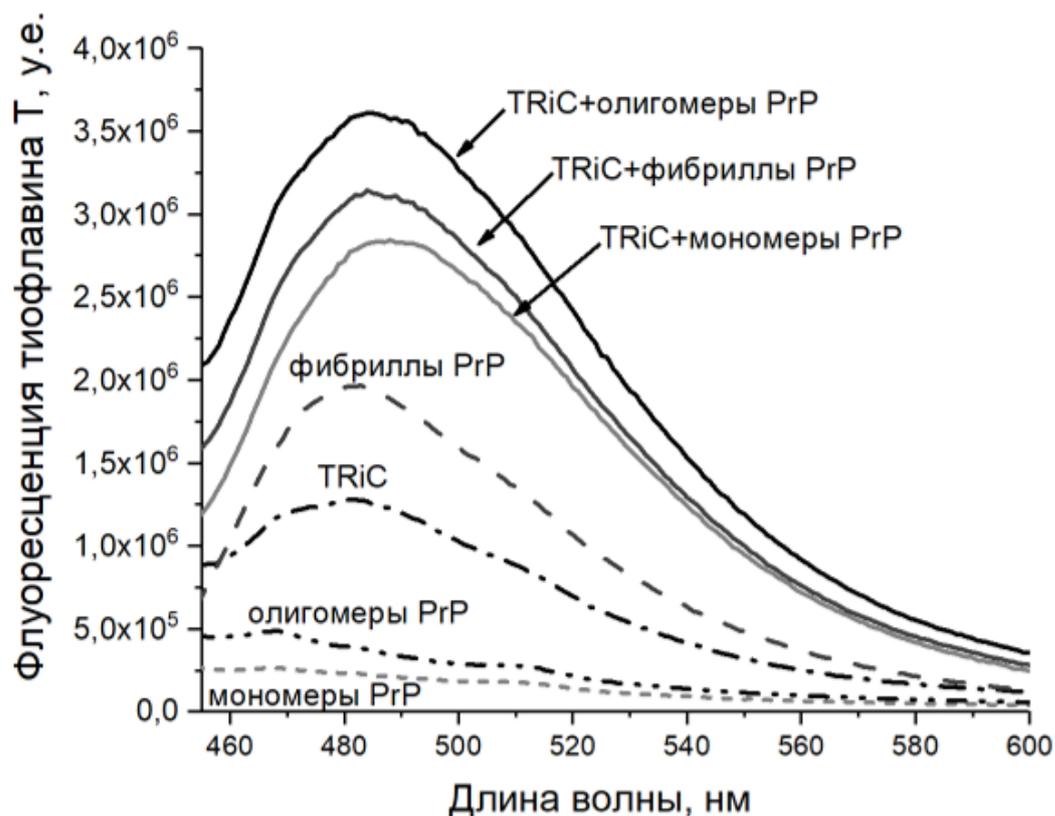


Рисунок 23. Спектры флуоресценции тιοфлавина Т в образцах, полученных после 2-часовой совместной инкубации разных форм прионного белка с эукариотическим шаперонином TRiC в присутствии Mg-АТФ. 0,6 мкМ PrP (в расчёте на мономер белка) инкубировали с 0,6 мкМ TRiC в 10 мМ калий-фосфатном буфере, рН 7,5, содержащем 1 мМ ЭДТА, 2 мМ АТФ и 2 мМ MgCl₂. Инкубацию проводили при 20°C и постоянном перемешивании.

Интересно то, что образование более крупных агрегатов наблюдается из мономеров PrP (рис. 22А), 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 более склонными к амилоидной агрегации. Эту закономерность подтверждают и данные, полученные с помощью электронной микроскопии:

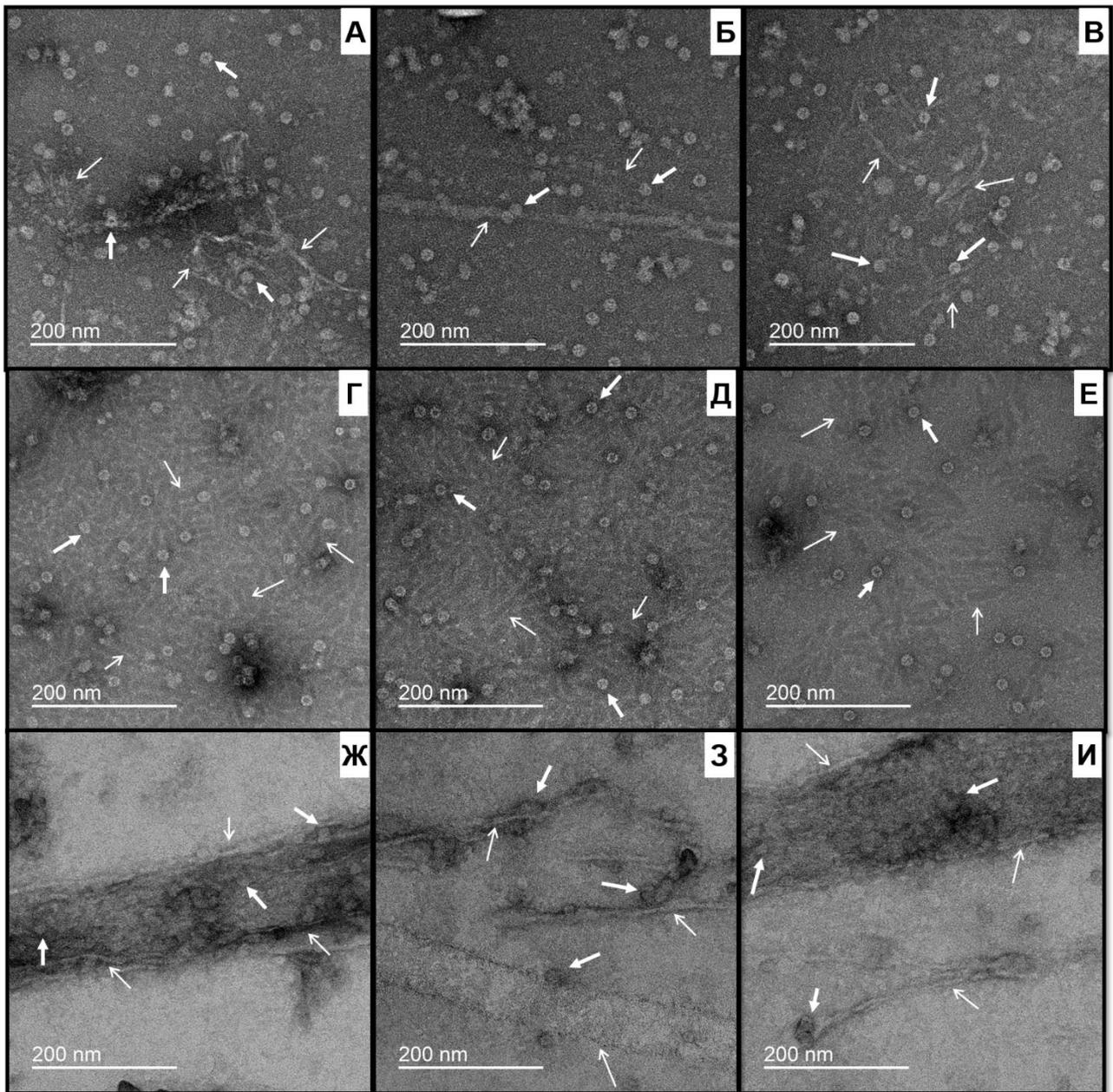


Рисунок 24. Микрографии агрегатов, обнаруженных в образцах после инкубации разных форм прионного белка с эукариотическим шаперонином TRiC. **А-В** – мономеры PrP; **Г-Е** – олигомеры PrP; **Ж-И** – фибриллы PrP. Тонкие стрелки указывают на агрегаты PrP, жирные – на TRiC. Формы PrP в концентрации 0,6 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, 2 мМ Mg^{2+} -АТФ, рН 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).

на рисунках 24А-В видно, что при инкубации шаперонина TRiC с мономерами PrP образуются преимущественно удлиненные фибриллы, а в случае олигомеров (рис. 24Г-Е) – 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. 24Ж-И).

5. 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 таких экспериментов данные криоэлектронной микроскопии были расшифрованы и оформлены в виде рисунков нашим коллегой Евгением Борисовичем Пичкуром из национального исследовательского центра "Курчатовский Институт".

5.1. Комплекс GroEL-GroES-нуклеотид

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. 25) мы выяснили, что за время инкубации GroEL с GroES, которое составило 60 минут, 80% АТФ превратилось в АДФ.

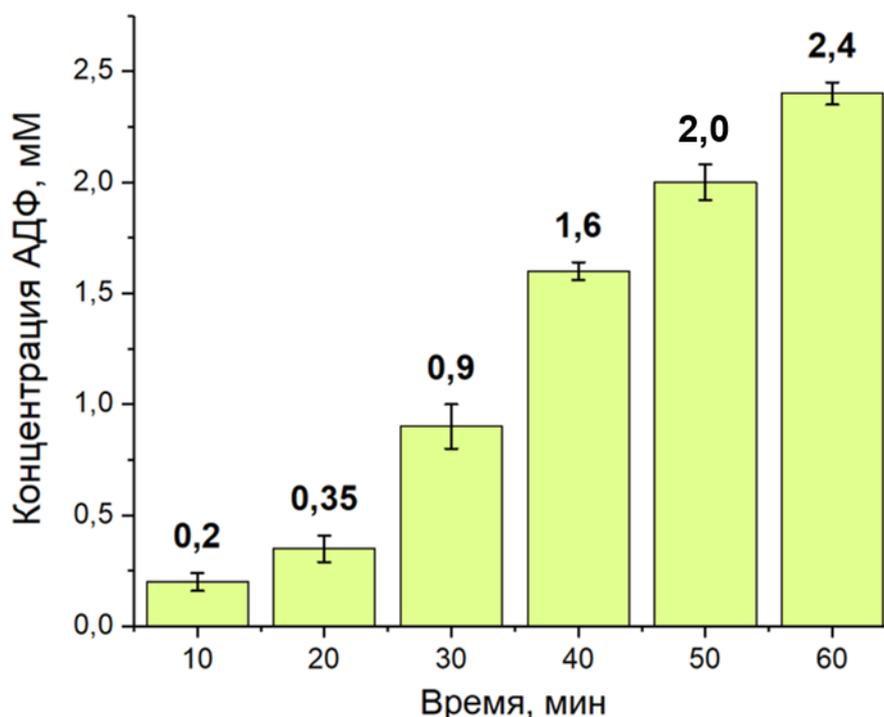


Рисунок 25. Изменение концентрации АДФ в среде, содержащей бактериальный комплекс шаперонинов GroEL-GroES, измеренное энзиматически. Реакционная смесь содержала 50 мМ HEPES-NaOH pH 8,0; 100 мМ KCl; 1 мМ MgCl₂; 2,5 мМ фосфоенолпирувата, 125 мкМ НАДН, по 40 ед/мл пируваткиназы и лактатдегидрогеназы. К 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.

Поскольку согласно общепринятой гипотезе о рабочем цикле шаперонинов диссоциация АДФ из комплекса происходит при связывании последним АТФ в противоположном кольце, мы предположили, что скорее всего замороженные нами образцы будут

содержать комплекс GroEL-GroES-АДФ. Этот комплекс в отсутствие 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.

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. 26В). В итоге, мы приняли решение в дальнейшем называть конформации “узкая” (рис. 26А) и “широкая” (рис. 26Б) соответственно. Среднее расчётное разрешение обоих комплексов составило 3,4 Å.

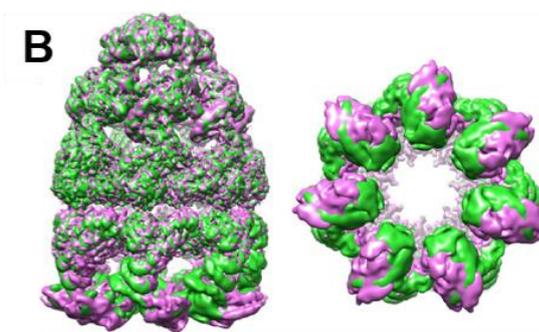
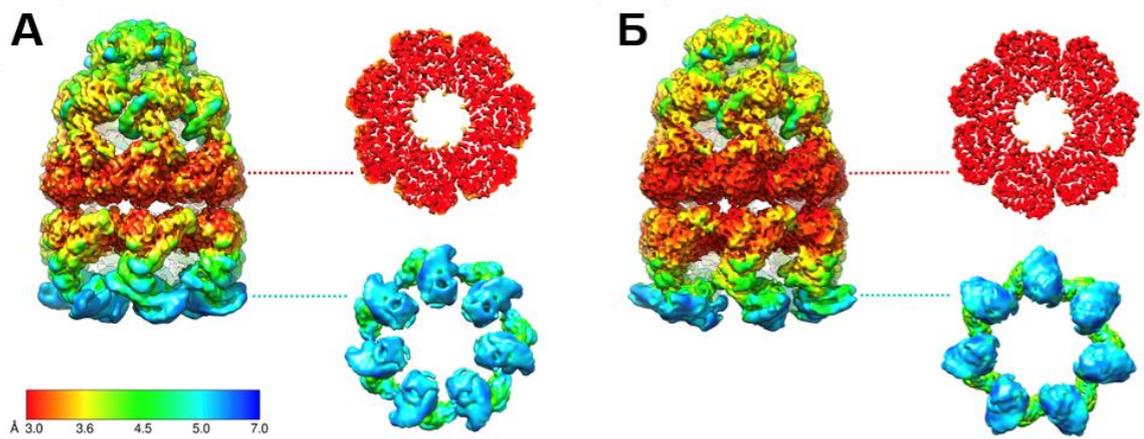


Рисунок 26. Структуры пулевидного комплекса GroEL-GroES-нуклеотиды с симметрией $C7$, полученные методом криоэлектронной микроскопии. Окрашенные в соответствии со своим локальным разрешением “узкая” (A) и “широкая” (B) конформации комплекса GroEL-GroES показаны вместе со срезами на уровне экваториальных 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.

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 (рис. 27).

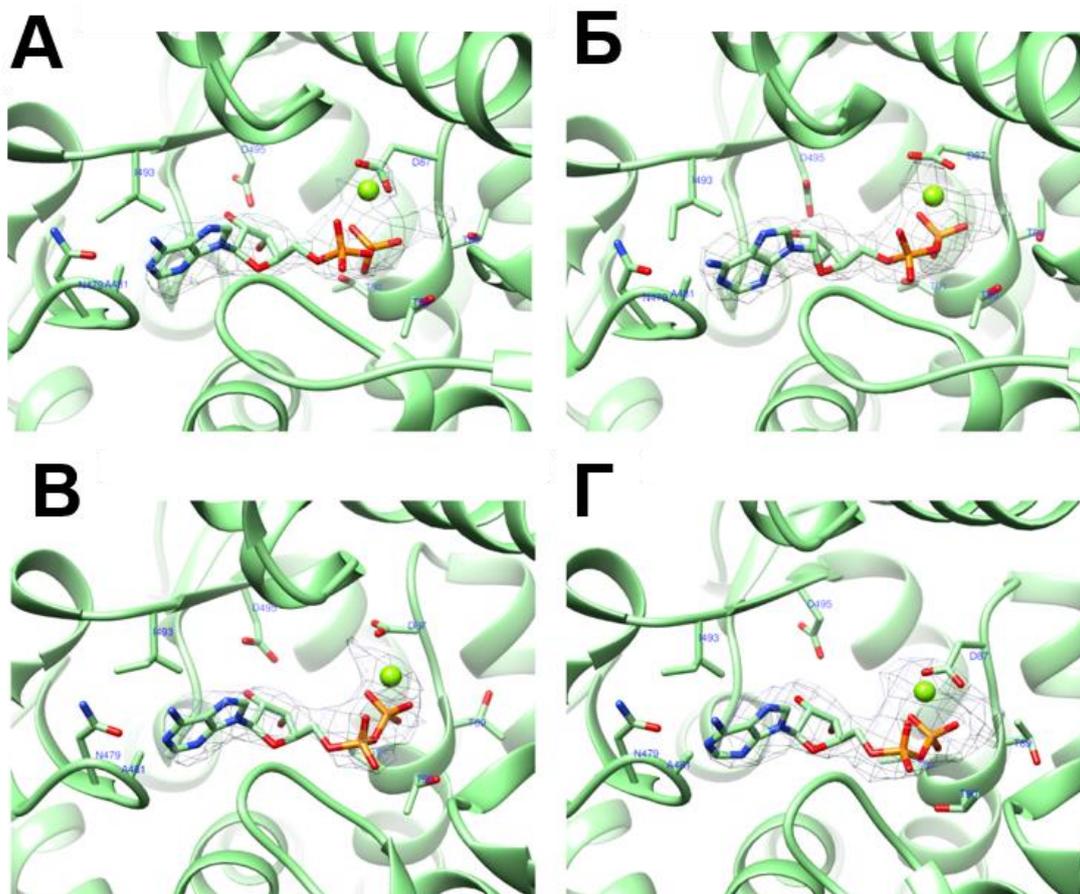


Рисунок 27. Вписывание (фитинг) молекулы АДФ и иона Mg^{2+} в дополнительную плотность (сетку), обнаруженную в нуклеотид-связывающих карманах экваториальных доменов полученных структур комплекса GroEL-GroES-нуклеотид. *А - цис-кольцо “широкой” конформации; Б - цис-кольцо “узкой” конформации; В - транс-кольцо “широкой” конформации; Г - транс-кольцо “узкой” конформации. . Данные получены и обработаны совместно с Е.Б. Пичкуром из НИЦ “Курчатовский Институт”*

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 [131, 177-180] или его негидролизуемый аналог АДФ-Mg-AlF₃ [178-179] были обнаружены только в том кольце, которое связано с кошаперонином 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 [142], либо его негидролизуемым аналогом АДФ-BeFx [137, 181]. 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. 28).

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 28 под цифрой 3, поэтому мы посчитали возможным предположить, какое место в обозначенном АТФ-азном цикле комплекса GroEL-GroES теоретически могут занимать наши структуры.

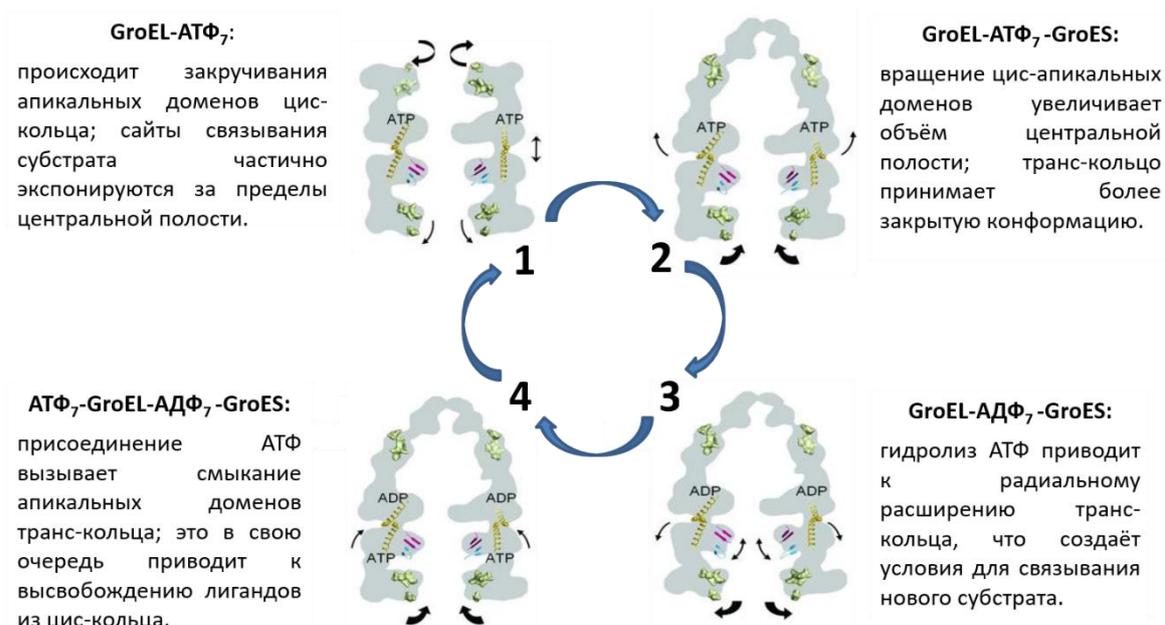


Рисунок 28. Схема аллостерических изменений в структурах бактериального шаперонина GroEL, происходящие на протяжении ATP-азного цикла, составленная на основе данных, взятых из статьи Ranson N.A., et al. 2006 г. [182]. Структуры, важные для рассмотрения аллостерического механизма, выделены цветом и наложены на осевое сечение GroEL. 1) Комплекс GroEL-ATP₇; связывание ATP с верхним кольцом вызывает удлинение всего комплекса с закручиванием апикальных доменов. 2) Комплекс GroEL-ATP₇-GroES. Транс-кольцо более замкнутое. 3) GroEL-ADP₇-GroES. Всё транс-кольцо расширяется радиально, создавая новое акцепторное состояние субстрата. 4) ATP₇-GroEL-ADP₇-GroES. Транс-кольцо сжимается, и внутрикольцевой контакт восстанавливается.

Предложенная нами гипотеза представлена на рисунке 29: “широкая” конформация может быть следующим шагом после стадии, обозначенной цифрой 3, когда комплекс GroEL-ADP₇-GroES начинает связывать молекулы ATP 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 28 обозначен цифрой 4.

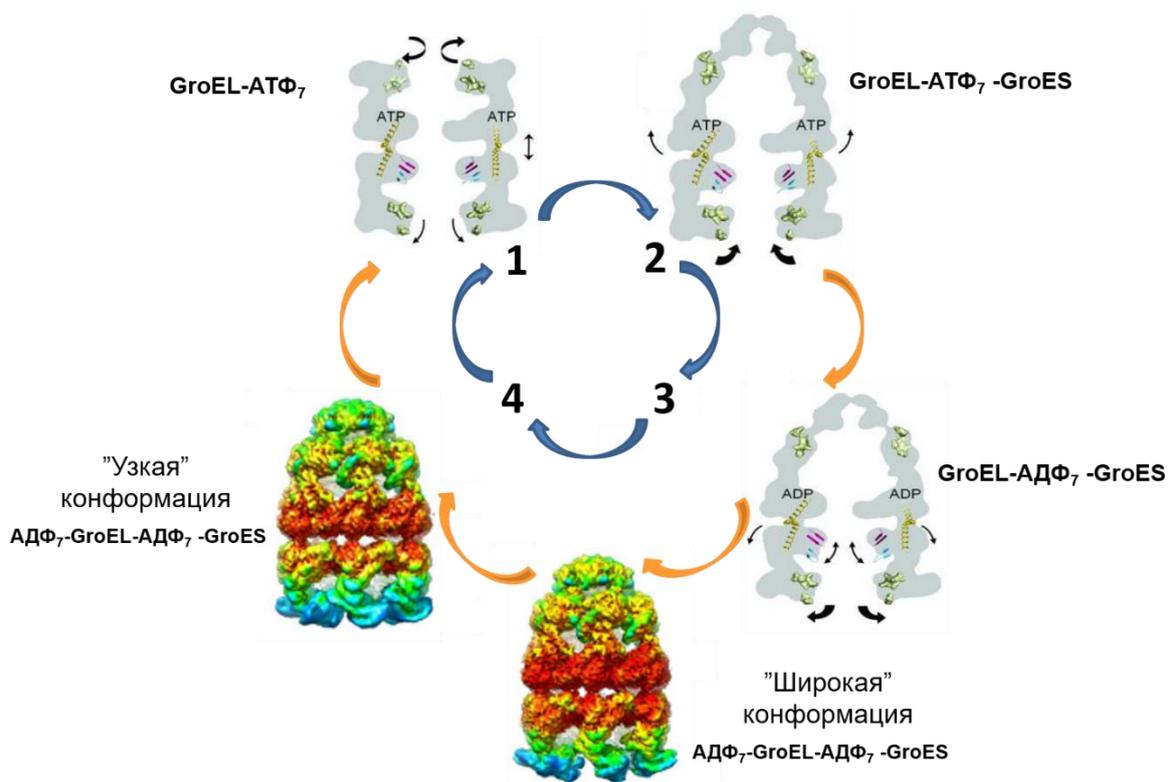


Рисунок 29. Дополненная полученными нами 3D-структурами схема, представленная на рисунке 28.

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 (рис. 30).

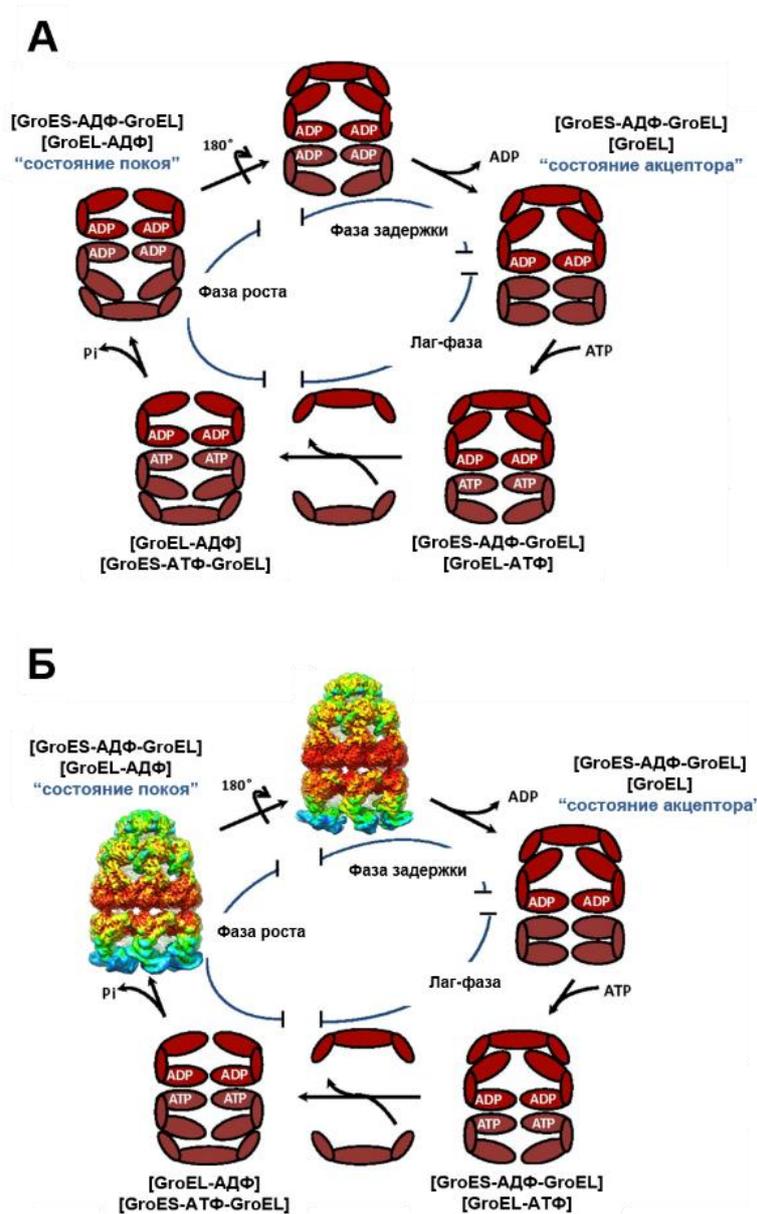


Рисунок 30. Схема асимметричного АТФазного цикла бактериального комплекса шаперонинов GroEL-GroES, который работает при отсутствии субстрата в среде. (А) Предложенная X. Ye и G. N. Lorimer в их статье 2013 года [140]. Весь цикл разделен на три части, соответствующие трём экспоненциальным фазам, выявленным высвобождением P_i в предстационарных кинетических измерениях. (Б) Дополненная полученными нами 3D-структурами

5.2. Комплекс бактериального шаперонина GroEL с прионным белком

Согласно полученным нами данным, GroEL способен связываться с прионным белком даже будучи в апоформе (рис. 15). Поэтому для начала мы решили изучить более простую систему и посмотреть структуру комплекса GroEL-PrP. В ходе исследования мы обнаружили, что полученная методом криоэлектронной микроскопии карта электронной плотности (рис. 31) содержит дополнительную плотность в области апикальных доменов одного из колец GroEL, если сравнить её со структурами апоформы шаперонина.

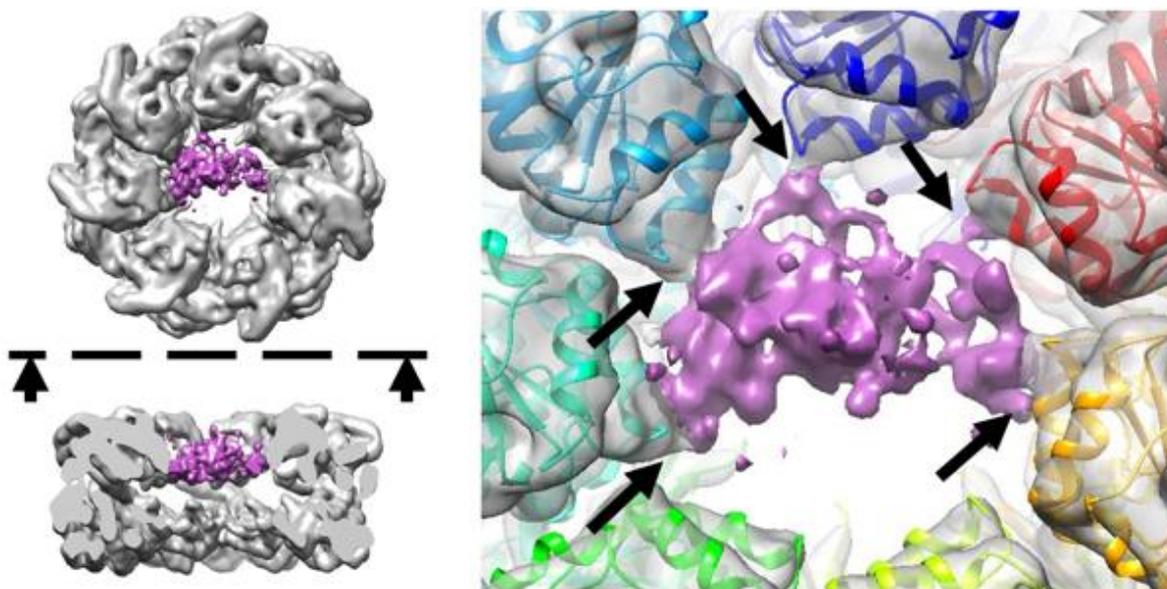


Рисунок 31. Карта электронной плотности образовавшегося комплекса бактериального шаперонина GroEL с мономером прионного белка, полученная методом криоэлектронной микроскопии. Вид сверху. Пунктирная линия и стрелки на левой части рисунка указывают направление разреза. Данные получены методом криоэлектронной 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 спиралью “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.

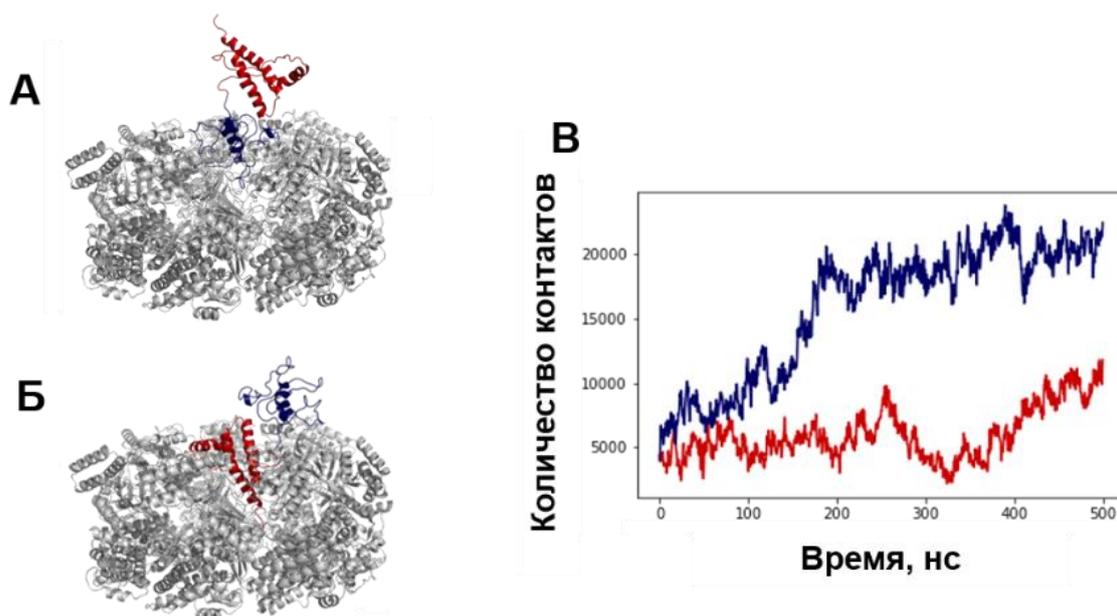


Рисунок 32. Формирование комплекса бактериального шаперонина GroEL с мономером прионного белка согласно данным, полученным методом молекулярной динамики. Серым цветом обозначен GroEL, синим - N-концевой домен PrP, красным - C-концевой домен PrP. А - визуализация гипотезы о том, что PrP взаимодействует с GroEL своим N-концевым доменом. В - визуализация гипотезы о том что, что PrP взаимодействует с GroEL своим C-концевым доменом. С - динамика числа контактов между GroEL и N-концевым доменом (синяя) и C-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.

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. 32А) или за счёт С-концевого - GroEL-PrP(C) (рис. 32Б). Исходя из полученных данных, мы видим, что количество контактов между GroEL и PrP увеличивается вдоль траекторий существования молекулярнодинамических симуляций (рис. 32В), 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 образования комплекса 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). Такой вывод был сделан на основании анализа матрицы контактов и динамики числа контактов, которые образовывались внутри комплексов GroEL-PrP(N) и GroEL-PrP(C) на протяжении траектории молекулярной динамики: была изучена динамика образования контактов между доменами прионного белка и каждой субъединицей шаперонина (технические данные не представлены ввиду их объёмности).

В результате мы можем с высокой долей вероятности 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 C-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 C-конец прионного белка.

5.3. 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. 20), 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 33 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. 31). 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 -суп не показали связывание GroEL с мономерами данного амилоидного белка (см. рис. 19).

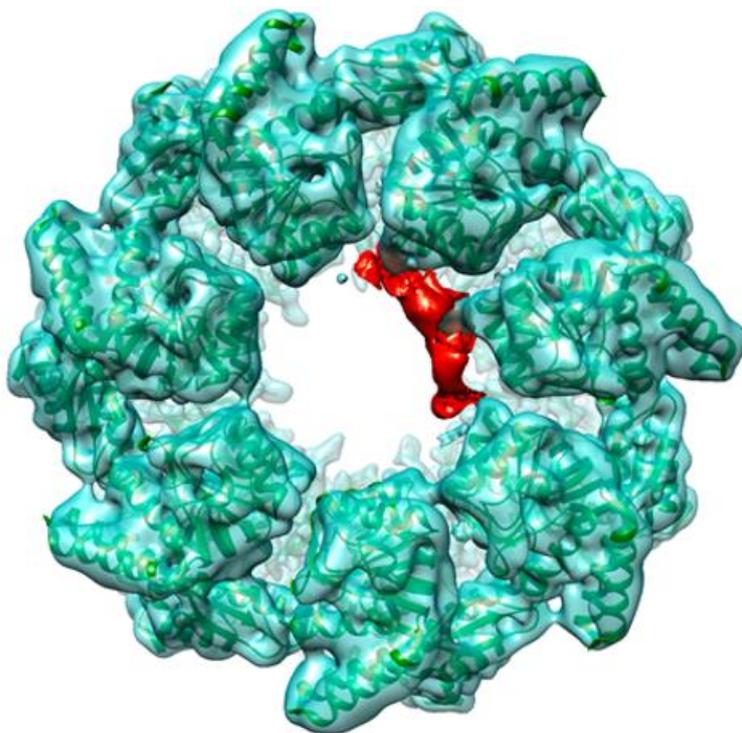


Рисунок 33. Карта электронной плотности образовавшегося комплекса бактериального шаперонина GroEL с мономером альфа-синуклеина, полученная методом криоэлектронной микроскопии. Вид сверху. Атомная модель для GroEL показана зелёным, участок карты, предположительно соответствующий α -синуклеину - красным. Данные получены и обработаны совместно с Е.Б. Пичкуром из НИЦ "Курчатовский Институт" с помощью микроскопа Titan Krios.

5.4. 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 (см. рис. 10А), при заморозке тех же проб в жидком этане шаперонин агрегировал (см. рис. 10Б), 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. Мы также сгруппировали и использовали для трехмерной классификации частицы, полученные без наклона и с наклоном 15° и 45° , чтобы повысить разрешение 3D-модели (см. раздел Материалы и методы, 12.4.1).

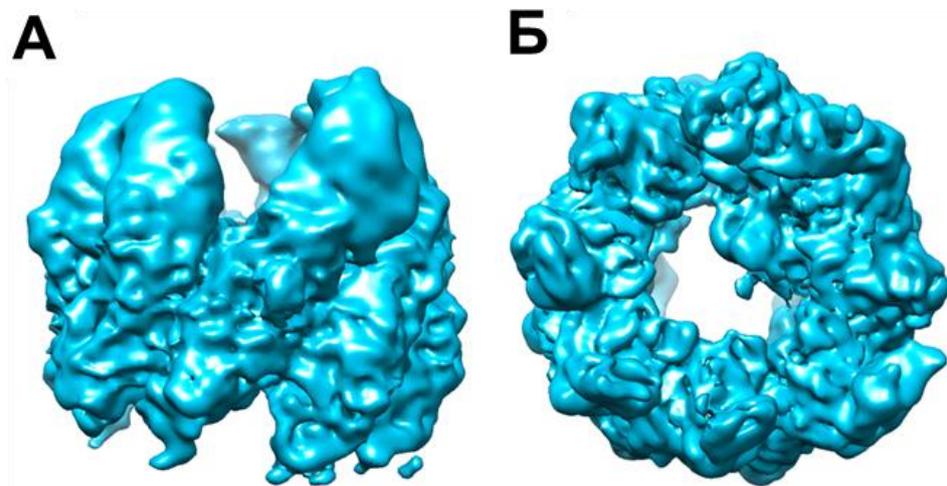


Рисунок 34. Карта электронной плотности комплекса эукариотического шаперонина TRiC с негидролизуемым аналогом АТФ (АТФ-гамма-S), полученная методом криоэлектронной микроскопии. Вид сбоку (А) и сверху (Б). Данные получены и обработаны совместно с Е.Б. Пичкуром из НИЦ "Курчатовский Институт" с помощью микроскопа Titan Krios.

Среднее разрешение частиц, полученных с образца №6 составило 6,2 Å, а с образца № 7 – 4,4 Å. Разрешение экваториальных доменов составило 4,5 Å, в то время как апикальные домены разрешены существенно хуже. Результат финальной 3D реконструкции представлен на рисунке 34.

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.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И 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 15 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.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает благодарность своему научному руководителю, заведующему отделом биохимии животной клетки, Владимиру Израилевичу Муронцу за направление исследования, ценные советы и внимательное отношение.

Автор выражает благодарность Е.Б. Пичкуру, А.В. Моисеенко, И.С. Паниной и Т.Б. Станишневой-Коноваловой за незаменимую помощь в проведении исследований, в обработке полученных данных и подготовке иллюстраций.

Автор также выражает признательность коллективу отдела биохимии животной клетки, в особенности Л.П. Курочкиной и Е. Лейси за помощь в выполнении данной работы и создание комфортной атмосферы в лаборатории.

Автор выражает благодарность своей семье за поддержку стремления заниматься наукой и интерес к результатам исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ross CA, Poirier MA. Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nat Med*. 2004;10(S7):S10-S17. doi:10.1038/nm1066
2. Chiti F, Dobson CM. Protein Misfolding, Functional Amyloid, and Human Disease. *Annu Rev Biochem*. 2006;75(1):333-366. doi:10.1146/annurev.biochem.75.101304.123901
3. Nelson R, Sawaya MR, Balbirnie M, et al. Structure of the cross- β spine of amyloid-like fibrils. *Nature*. 2005;435(7043):773-778. doi:10.1038/nature03680
4. Petkova AT, Ishii Y, Balbach JJ, et al. A structural model for Alzheimer's β -amyloid fibrils based on experimental constraints from solid state NMR. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2002;99(26):16742-16747. doi:10.1073/pnas.262663499
5. Eichner T, Kalverda AP, Thompson GS, Homans SW, Radford SE. Conformational Conversion during Amyloid Formation at Atomic Resolution. *Mol Cell*. 2011;41(2):161-172. doi:10.1016/j.molcel.2010.11.028
6. Almeida ZL, Brito RMM. Structure and Aggregation Mechanisms in Amyloids. *Molecules*. 2020;25(5):1195. doi:10.3390/molecules25051195
7. Tuttle MD, Comellas G, Nieuwkoop AJ, et al. Solid-state NMR structure of a pathogenic fibril of full-length human α -synuclein. *Nat Struct Mol Biol*. 2016;23(5):409-415. doi:10.1038/nsmb.3194
8. Ciechanover A, Kwon YT. Protein Quality Control by Molecular Chaperones in Neurodegeneration. *Front Neurosci*. 2017;11. doi:10.3389/fnins.2017.00185
9. Guzhova I V, Lazarev VF, Kaznacheeva A V, et al. Novel mechanism of Hsp70 chaperone-mediated prevention of polyglutamine aggregates in a

- cellular model of huntington disease. *Hum Mol Genet.* 2011;20(20):3953-3963. doi:10.1093/hmg/ddr314
10. Tittelmeier J, Nachman E, Nussbaum-Krammer C. Molecular Chaperones: A Double-Edged Sword in Neurodegenerative Diseases. *Front Aging Neurosci.* 2020;12:581374. doi:10.3389/fnagi.2020.581374
 11. Kampinga HH, Craig EA. The HSP70 chaperone machinery: J proteins as drivers of functional specificity. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010;11(8):579-592. doi:10.1038/nrm2941
 12. Bukau B, Weissman J, Horwich A. Molecular Chaperones and Protein Quality Control. *Cell.* 2006;125(3):443-451. doi:10.1016/j.cell.2006.04.014
 13. Wentink A, Nussbaum-Krammer C, Bukau B. Modulation of Amyloid States by Molecular Chaperones. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2019;11(7):a033969. doi:10.1101/cshperspect.a033969
 14. Kampinga HH, Bergink S. Heat shock proteins as potential targets for protective strategies in neurodegeneration. *Lancet Neurol.* 2016;15(7):748-759. doi:10.1016/S1474-4422(16)00099-5
 15. Hartl FU, Bracher A, Hayer-Hartl M. Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature.* 2011;475(7356):324-332. doi:10.1038/nature10317
 16. Kim YE, Hipp MS, Bracher A, Hayer-Hartl M, Ulrich Hartl F. Molecular Chaperone Functions in Protein Folding and Proteostasis. *Annu Rev Biochem.* 2013;82(1):323-355. doi:10.1146/annurev-biochem-060208-092442
 17. Skjaerven L, Cuellar J, Martinez A, Valpuesta JM. Dynamics, flexibility, and allostery in molecular chaperonins. *FEBS Lett.* 2015;589(19PartA):2522-2532. doi:10.1016/j.febslet.2015.06.019
 18. Webster JM, Darling AL, Uversky VN, Blair LJ. Small Heat Shock Proteins, Big Impact on Protein Aggregation in Neurodegenerative

- Disease. *Front Pharmacol.* 2019;10:1047.
doi:10.3389/fphar.2019.01047
19. Kiselev GG, Naletova IN, Sheval E V., et al. Chaperonins induce an amyloid-like transformation of ovine prion protein: The fundamental difference in action between eukaryotic TRiC and bacterial GroEL. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics.* 2011;1814(12):1730-1738. doi:10.1016/j.bbapap.2011.08.006
 20. Ford MJ, Burton LJ, Morris RJ, Hall SM. Selective expression of prion protein in peripheral tissues of the adult mouse. *Neuroscience.* 2002;113(1):177-192. doi:10.1016/S0306-4522(02)00155-0
 21. Mironov A, Latawiec D, Wille H, et al. Cytosolic Prion Protein in Neurons. *The Journal of Neuroscience.* 2003;23(18):7183-7193. doi:10.1523/JNEUROSCI.23-18-07183.2003
 22. Roucou X, Guo Q, Zhang Y, Goodyer CG, LeBlanc AC. Cytosolic Prion Protein Is Not Toxic and Protects against Bax-mediated Cell Death in Human Primary Neurons. *Journal of Biological Chemistry.* 2003;278(42):40877-40881. doi:10.1074/jbc.M306177200
 23. Braakman I, Hebert DN. Protein Folding in the Endoplasmic Reticulum. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013;5(5):a013201-a013201. doi:10.1101/cshperspect.a013201
 24. Hebert DN, Garman SC, Molinari M. The glycan code of the endoplasmic reticulum: asparagine-linked carbohydrates as protein maturation and quality-control tags. *Trends Cell Biol.* 2005;15(7):364-370. doi:10.1016/j.tcb.2005.05.007
 25. Ron D, Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8(7):519-529. doi:10.1038/nrm2199
 26. Hetz C, Papa FR. The Unfolded Protein Response and Cell Fate Control. *Mol Cell.* 2018;69(2):169-181. doi:10.1016/j.molcel.2017.06.017

27. Rodriguez D, Rojas-Rivera D, Hetz C. Integrating stress signals at the endoplasmic reticulum: The BCL-2 protein family rheostat. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2011;1813(4):564-574. doi:10.1016/j.bbamcr.2010.11.012
28. Krance SH, Luke R, Shenouda M, et al. Cellular models for discovering prion disease therapeutics: Progress and challenges. *J Neurochem*. 2020;153(2):150-172. doi:10.1111/jnc.14956
29. Brandner S, Jaunmuktane Z. Prion disease: experimental models and reality. *Acta Neuropathol*. 2017;133(2):197-222. doi:10.1007/s00401-017-1670-5
30. Hetz C, Soto C. Stressing Out the ER: A Role of the Unfolded Protein Response in Prion-Related Disorders. *Curr Mol Med*. 2006;6(1):37-43. doi:10.2174/156652406775574578
31. Hetz C. Caspase-12 and endoplasmic reticulum stress mediate neurotoxicity of pathological prion protein. *EMBO J*. 2003;22(20):5435-5445. doi:10.1093/emboj/cdg537
32. Kopp MC, Larburu N, Durairaj V, Adams CJ, Ali MMU. UPR proteins IRE1 and PERK switch BiP from chaperone to ER stress sensor. *Nat Struct Mol Biol*. 2019;26(11):1053-1062. doi:10.1038/s41594-019-0324-9
33. Karlin S, Brocchieri L. Heat Shock Protein 70 Family: Multiple Sequence Comparisons, Function, and Evolution. *J Mol Evol*. 1998;47(5):565-577. doi:10.1007/PL00006413
34. Bakunts A, Orsi A, Vitale M, et al. Ratiometric sensing of BiP-client versus BiP levels by the unfolded protein response determines its signaling amplitude. *Elife*. 2017;6:e27518. doi:10.7554/eLife.27518
35. Jin T, Gu Y, Zanusso G, et al. The Chaperone Protein BiP Binds to a Mutant Prion Protein and Mediates Its Degradation by the Proteasome.

- Journal of Biological Chemistry*. 2000;275(49):38699-38704.
doi:10.1074/jbc.M005543200
36. Peters SL, Déry MA, LeBlanc AC. Familial prion protein mutants inhibit Hrd1-mediated retrotranslocation of misfolded proteins by depleting misfolded protein sensor BiP. *Hum Mol Genet*. 2016;25(5):976-988. doi:10.1093/hmg/ddv630
 37. Torres M, Castillo K, Armisen R, Stutzin A, Soto C, Hetz C. Prion Protein Misfolding Affects Calcium Homeostasis and Sensitizes Cells to Endoplasmic Reticulum Stress. Deli MA, ed. *PLoS One*. 2010;5(12):e15658. doi:10.1371/journal.pone.0015658
 38. Hetz C, Russelakis-Carneiro M, Wälchli S, et al. The Disulfide Isomerase Grp58 Is a Protective Factor against Prion Neurotoxicity. *The Journal of Neuroscience*. 2005;25(11):2793-2802. doi:10.1523/JNEUROSCI.4090-04.2005
 39. Laszlo L, Lowe J, Self T, et al. Lysosomes as key organelles in the pathogenesis of prion encephalopathies. *J Pathol*. 1992;166(4):333-341. doi:10.1002/path.1711660404
 40. Zhu T, Chen JL, Wang Q, Shao W, Qi B. Modulation of Mitochondrial Dynamics in Neurodegenerative Diseases: An Insight Into Prion Diseases. *Front Aging Neurosci*. 2018;10. doi:10.3389/fnagi.2018.00336
 41. Brown CR, Martin RL, Hansen WJ, Beckmann RP, Welch WJ. The constitutive and stress inducible forms of hsp 70 exhibit functional similarities and interact with one another in an ATP-dependent fashion. *Journal of Cell Biology*. 1993;120(5):1101-1112. doi:10.1083/jcb.120.5.1101
 42. Kenward N, Hope J, Landon M, Mayer RJ. Expression of Polyubiquitin and Heat-Shock Protein 70 Genes Increases in the Later Stages of Disease Progression in Scrapie-Infected Mouse Brain. *J Neurochem*. 2008;62(5):1870-1877. doi:10.1046/j.1471-4159.1994.62051870.x

43. Kushnirov V V, Dergalev AA, Alexandrov AI. Amyloid Fragmentation and Disaggregation in Yeast and Animals. *Biomolecules*. 2021;11(12):1884. doi:10.3390/biom11121884
44. Paushkin S V, Kushnirov V V, Smirnov VN, Ter-Avanesyan MD. Propagation of the yeast prion-like [psi+] determinant is mediated by oligomerization of the SUP35-encoded polypeptide chain release factor. *EMBO J*. 1996;15(12):3127-3134. doi:10.1002/j.1460-2075.1996.tb00675.x
45. Chernova TA, Chernoff YO, Wilkinson KD. Prion-based memory of heat stress in yeast. *Prion*. 2017;11(3):151-161. doi:10.1080/19336896.2017.1328342
46. Chernoff YO, Uptain SM, Lindquist SL. Analysis of prion factors in yeast. In: *Methods in Enzymology*. Vol 351. Elsevier; 2002:499-538. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S007668790251867X>
47. Rikhvanov EG, Romanova N, Chernoff YO. Chaperone Effects on Prion and Nonprion Aggregates. *Prion*. 2007;1(4):217-222. doi:10.4161/pri.1.4.5058
48. Rubel AA, Ryzhova TA, Antonets KS, Chernoff YO, Galkin AP. Identification of PrP sequences essential for the interaction between the PrP polymers and A β peptide in a yeast-based assay. *Prion*. 2013;7(6):469-476. doi:10.4161/pri.26867
49. Ulmer TS, Bax A, Cole NB, Nussbaum RL. Structure and Dynamics of Micelle-bound Human α -Synuclein. *Journal of Biological Chemistry*. 2005;280(10):9595-9603. doi:10.1074/jbc.M411805200
50. Goedert M, Spillantini MG, Del Tredici K, Braak H. 100 years of Lewy pathology. *Nat Rev Neurol*. 2013;9(1):13-24. doi:10.1038/nrneurol.2012.242

51. Roberts H, Brown D. Seeking a Mechanism for the Toxicity of Oligomeric α -Synuclein. *Biomolecules*. 2015;5(2):282-305. doi:10.3390/biom5020282
52. Cox D, Selig E, Griffin MDW, Carver JA, Ecroyd H. Small Heat-shock Proteins Prevent α -Synuclein Aggregation via Transient Interactions and Their Efficacy Is Affected by the Rate of Aggregation. *Journal of Biological Chemistry*. 2016;291(43):22618-22629. doi:10.1074/jbc.M116.739250
53. Waudby CA, Knowles TPJ, Devlin GL, et al. The Interaction of α B-Crystallin with Mature α -Synuclein Amyloid Fibrils Inhibits Their Elongation. *Biophys J*. 2010;98(5):843-851. doi:10.1016/j.bpj.2009.10.056
54. Cox D, Whiten DR, Brown JWP, et al. The small heat shock protein Hsp27 binds α -synuclein fibrils, preventing elongation and cytotoxicity. *Journal of Biological Chemistry*. 2018;293(12):4486-4497. doi:10.1074/jbc.M117.813865
55. Selig EE, Zlatic CO, Cox D, et al. N- and C-terminal regions of α B-crystallin and Hsp27 mediate inhibition of amyloid nucleation, fibril binding, and fibril disaggregation. *Journal of Biological Chemistry*. 2020;295(29):9838-9854. doi:10.1074/jbc.RA120.012748
56. Gaspar R, Gating T, Stradner A. Eye lens crystallin proteins inhibit the autocatalytic amyloid amplification nature of mature α -synuclein fibrils. Schuck P, ed. *PLoS One*. 2020;15(6):e0235198. doi:10.1371/journal.pone.0235198
57. Luk KC, Mills IP, Trojanowski JQ, Lee VMY. Interactions between Hsp70 and the Hydrophobic Core of α -Synuclein Inhibit Fibril Assembly. *Biochemistry*. 2008;47(47):12614-12625. doi:10.1021/bi801475r
58. Pemberton S, Madiona K, Pieri L, Kabani M, Bousset L, Melki R. Hsc70 Protein Interaction with Soluble and Fibrillar α -Synuclein. *Journal of*

- Biological Chemistry*. 2011;286(40):34690-34699. doi:10.1074/jbc.M111.261321
59. Dedmon MM, Christodoulou J, Wilson MR, Dobson CM. Heat Shock Protein 70 Inhibits α -Synuclein Fibril Formation via Preferential Binding to Prefibrillar Species. *Journal of Biological Chemistry*. 2005;280(15):14733-14740. doi:10.1074/jbc.M413024200
60. Tao J, Berthet A, Citron YR, et al. Hsp70 chaperone blocks α -synuclein oligomer formation via a novel engagement mechanism. *Journal of Biological Chemistry*. 2021;296:100613. doi:10.1016/j.jbc.2021.100613
61. Roodveldt C, Bertoncini CW, Andersson A, et al. Chaperone proteostasis in Parkinson's disease: stabilization of the Hsp70/ α -synuclein complex by Hip. *EMBO J*. 2009;28(23):3758-3770. doi:10.1038/emboj.2009.298
62. Gao X, Carroni M, Nussbaum-Krammer C, et al. Human Hsp70 Disaggregase Reverses Parkinson's-Linked α -Synuclein Amyloid Fibrils. *Mol Cell*. 2015;59(5):781-793. doi:10.1016/j.molcel.2015.07.012
63. Yamamoto H, Fukui N, Adachi M, et al. Human Molecular Chaperone Hsp60 and Its Apical Domain Suppress Amyloid Fibril Formation of α -Synuclein. *Int J Mol Sci*. 2019;21(1):47. doi:10.3390/ijms21010047
64. Fukui N, Araki K, Hongo K, Mizobata T, Kawata Y. Modulating the Effects of the Bacterial Chaperonin GroEL on Fibrillogenic Polypeptides through Modification of Domain Hinge Architecture. *Journal of Biological Chemistry*. 2016;291(48):25217-25226. doi:10.1074/jbc.M116.751925
65. Ojha B, Fukui N, Hongo K, Mizobata T, Kawata Y. Suppression of amyloid fibrils using the GroEL apical domain. *Sci Rep*. 2016;6(1):31041. doi:10.1038/srep31041
66. Sot B, Rubio-Muñoz A, Leal-Quintero A, et al. The chaperonin CCT inhibits assembly of α -synuclein amyloid fibrils by a specific,

- conformation-dependent interaction. *Sci Rep.* 2017;7(1):40859. doi:10.1038/srep40859
67. Falsone SF, Kungl AJ, Rek A, Cappai R, Zangger K. The Molecular Chaperone Hsp90 Modulates Intermediate Steps of Amyloid Assembly of the Parkinson-related Protein α -Synuclein. *Journal of Biological Chemistry.* 2009;284(45):31190-31199. doi:10.1074/jbc.M109.057240
68. Tittelmeier J, Sandhof CA, Ries HM, et al. The HSP110/HSP70 disaggregation system generates spreading-competent toxic α -synuclein species. *EMBO J.* 2020;39(13):e103954. doi:10.15252/emj.2019103954
69. Mamchur AA, Moiseenko A V, Panina IS, et al. Structural and Computational Study of the GroEL–Prion Protein Complex. *Biomedicines.* 2021;9(11):1649. doi:10.3390/biomedicines9111649
70. Naletova IN, Muronetz VI, Schmalhausen E V. Unfolded, oxidized, and thermoinactivated forms of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase interact with the chaperonin GroEL in different ways. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics.* 2006;1764(4):831-838. doi:10.1016/j.bbapap.2006.02.002
71. Kudryavtseva SS, Stroylova YY, Kurochkina LP, Muronetz VI. The chaperonin TRiC is blocked by native and glycosylated prion protein. *Arch Biochem Biophys.* 2020;683:108319. doi:10.1016/j.abb.2020.108319
72. Barinova K, Khomyakova E, Semenyuk P, Schmalhausen E, Muronetz V. Binding of alpha-synuclein to partially oxidized glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase induces subsequent inactivation of the enzyme. *Arch Biochem Biophys.* 2018;642:10-22. doi:10.1016/j.abb.2018.02.002
73. D'Argenio V, Sarnataro D. Microbiome Influence in the Pathogenesis of Prion and Alzheimer's Diseases. *Int J Mol Sci.* 2019;20(19):4704. doi:10.3390/ijms20194704

74. Sun M, Ma K, Wen J, et al. A Review of the Brain-Gut-Microbiome Axis and the Potential Role of Microbiota in Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2020;73(3):849-865. doi:10.3233/JAD-190872
75. Kim MS, Kim Y, Choi H, et al. Transfer of a healthy microbiota reduces amyloid and tau pathology in an Alzheimer's disease animal model. *Gut*. 2020;69(2):283-294. doi:10.1136/gutjnl-2018-317431
76. Pistollato F, Sumalla Cano S, Elio I, Masias Vergara M, Giampieri F, Battino M. Role of gut microbiota and nutrients in amyloid formation and pathogenesis of Alzheimer disease. *Nutr Rev*. 2016;74(10):624-634. doi:10.1093/nutrit/nuw023
77. Nishiwaki H, Ito M, Ishida T, et al. META-ANALYSIS of Gut Dysbiosis in Parkinson's Disease. *Movement Disorders*. 2020;35(9):1626-1635. doi:10.1002/mds.28119
78. Nishiwaki H, Hamaguchi T, Ito M, et al. Short-Chain Fatty Acid-Producing Gut Microbiota Is Decreased in Parkinson's Disease but Not in Rapid-Eye-Movement Sleep Behavior Disorder. Manichanh C, ed. *mSystems*. 2020;5(6):e00797-20. doi:10.1128/mSystems.00797-20
79. Holmqvist S, Chutna O, Bousset L, et al. Direct evidence of Parkinson pathology spread from the gastrointestinal tract to the brain in rats. *Acta Neuropathol*. 2014;128(6):805-820. doi:10.1007/s00401-014-1343-6
80. Uemura N, Yagi H, Uemura MT, Hatanaka Y, Yamakado H, Takahashi R. Inoculation of α -synuclein preformed fibrils into the mouse gastrointestinal tract induces Lewy body-like aggregates in the brainstem via the vagus nerve. *Mol Neurodegener*. 2018;13(1):21. doi:10.1186/s13024-018-0257-5
81. Chandra R, Hiniker A, Kuo YM, Nussbaum RL, Liddle RA. α -Synuclein in gut endocrine cells and its implications for Parkinson's disease. *JCI Insight*. 2017;2(12):e92295. doi:10.1172/jci.insight.92295

82. Liddle RA. Parkinson's disease from the gut. *Brain Res.* 2018;1693:201-206. doi:10.1016/j.brainres.2018.01.010
83. Hornemann S, Korth C, Oesch B, et al. Recombinant full-length murine prion protein, *m* PrP(23-231): purification and spectroscopic characterization. *FEBS Lett.* 1997;413(2):277-281. doi:10.1016/S0014-5793(97)00921-6
84. Bosques CJ, Imperiali B. The interplay of glycosylation and disulfide formation influences fibrillization in a prion protein fragment. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2003;100(13):7593-7598. doi:10.1073/pnas.1232504100
85. Haraguchi T, Fisher S, Olofsson S, et al. Asparagine-linked glycosylation of the scrapie and cellular prion proteins. *Arch Biochem Biophys.* 1989;274(1):1-13. doi:10.1016/0003-9861(89)90409-8
86. Stahl N. Scrapie prion protein contains a phosphatidylinositol glycolipid. *Cell.* 1987;51(2):229-240. doi:10.1016/0092-8674(87)90150-4
87. Maglio LE, Martins VR, Izquierdo I, Ramirez OA. Role of cellular prion protein on LTP expression in aged mice. *Brain Res.* 2006;1097(1):11-18. doi:10.1016/j.brainres.2006.04.056
88. Huang Z, Gabriel JM, Baldwin MA, Fletterick RJ, Prusiner SB, Cohen FE. Proposed three-dimensional structure for the cellular prion protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 1994;91(15):7139-7143. doi:10.1073/pnas.91.15.7139
89. Acevedo-Morantes C, Wille H. The Structure of Human Prions: From Biology to Structural Models—Considerations and Pitfalls. *Viruses.* 2014;6(10):3875-3892. doi:10.3390/v6103875
90. Roucou X, Gains M, LeBlanc AC. Neuroprotective functions of prion protein. *J Neurosci Res.* 2004;75(2):153-161. doi:10.1002/jnr.10864
91. Kaneko K, Vey M, Scott M, Pilkuhn S, Cohen FE, Prusiner SB. COOH-terminal sequence of the cellular prion protein directs subcellular

- trafficking and controls conversion into the scrapie isoform. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1997;94(6):2333-2338. doi:10.1073/pnas.94.6.2333
92. Wadia JS, Stan R V, Dowdy SF. Transducible TAT-HA fusogenic peptide enhances escape of TAT-fusion proteins after lipid raft macropinocytosis. *Nat Med*. 2004;10(3):310-315. doi:10.1038/nm996
 93. Stys PK, You H, Zamponi GW. Copper-dependent regulation of NMDA receptors by cellular prion protein: implications for neurodegenerative disorders. *J Physiol*. 2012;590(6):1357-1368. doi:10.1113/jphysiol.2011.225276
 94. Aguzzi A, Polymenidou M. Mammalian Prion Biology. *Cell*. 2004;116(2):313-327. doi:10.1016/S0092-8674(03)01031-6
 95. Vassallo N, Herms J. Cellular prion protein function in copper homeostasis and redox signalling at the synapse. *J Neurochem*. 2003;86(3):538-544. doi:10.1046/j.1471-4159.2003.01882.x
 96. Brockes JP. Topics in prion cell biology. *Curr Opin Neurobiol*. 1999;9(5):571-577. doi:10.1016/S0959-4388(99)00016-1
 97. Goedert M. Alpha-synuclein and neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci*. 2001;2(7):492-501. doi:10.1038/35081564
 98. Alexander GE. Biology of Parkinson's disease: pathogenesis and pathophysiology of a multisystem neurodegenerative disorder. *Dialogues Clin Neurosci*. 2004;6(3):259-280. doi:10.31887/DCNS.2004.6.3/galexander
 99. Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VMY, Trojanowski JQ, Jakes R, Goedert M. α -Synuclein in Lewy bodies. *Nature*. 1997;388(6645):839-840. doi:10.1038/42166
 100. Jankovic J. Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2008;79(4):368-376. doi:10.1136/jnnp.2007.131045

101. Chaudhuri KR, Healy DG, Schapira AH. Non-motor symptoms of Parkinson's disease: diagnosis and management. *Lancet Neurol.* 2006;5(3):235-245. doi:10.1016/S1474-4422(06)70373-8
102. Uéda K, Fukushima H, Masliah E, et al. Molecular cloning of cDNA encoding an unrecognized component of amyloid in Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 1993;90(23):11282-11286. doi:10.1073/pnas.90.23.11282
103. Eliezer D, Kutluay E, Bussell R, Browne G. Conformational properties of α -synuclein in its free and lipid-associated states 1 Edited by P. E. Wright. *J Mol Biol.* 2001;307(4):1061-1073. doi:10.1006/jmbi.2001.4538
104. Iwai A, Yoshimoto M, Masliah E, Saitoh T. Non-A β Component of Alzheimer's Disease Amyloid (NAC) is Amyloidogenic. *Biochemistry.* 1995;34(32):10139-10145. doi:10.1021/bi00032a006
105. Fortin DL, Troyer MD, Nakamura K, Kubo S ichiro, Anthony MD, Edwards RH. Lipid Rafts Mediate the Synaptic Localization of α -Synuclein. *The Journal of Neuroscience.* 2004;24(30):6715-6723. doi:10.1523/JNEUROSCI.1594-04.2004
106. Pujols J, Peña-Díaz S, Conde-Giménez M, et al. High-Throughput Screening Methodology to Identify Alpha-Synuclein Aggregation Inhibitors. *Int J Mol Sci.* 2017;18(3):478. doi:10.3390/ijms18030478
107. Burré J, Sharma M, Tsetsenis T, Buchman V, Etherton MR, Südhof TC. α -Synuclein Promotes SNARE-Complex Assembly in Vivo and in Vitro. *Science* (1979). 2010;329(5999):1663-1667. doi:10.1126/science.1195227
108. Donaghy PC, McKeith IG. The clinical characteristics of dementia with Lewy bodies and a consideration of prodromal diagnosis. *Alzheimers Res Ther.* 2014;6(4):46. doi:10.1186/alzrt274

109. Ramirez E, Vonsattel J. Neuropathologic Changes of Multiple System Atrophy and Diffuse Lewy Body Disease. *Semin Neurol.* 2014;34(02):210-216. doi:10.1055/s-0034-1381732
110. Lin DJ, Hermann KL, Schmahmann JD. Multiple system atrophy of the cerebellar type: Clinical state of the art: Multiple System Atrophy Cerebellar Type. *Movement Disorders.* 2014;29(3):294-304. doi:10.1002/mds.25847
111. Garland EM, Hooper WB, Robertson D. Pure autonomic failure. In: *Handbook of Clinical Neurology.* Vol 117. Elsevier; 2013:243-257. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780444534910000201>
112. Minton AP. Implications of macromolecular crowding for protein assembly. *Curr Opin Struct Biol.* 2000;10(1):34-39. doi:10.1016/S0959-440X(99)00045-7
113. Martin J, Ulrich Hartl F. Chaperone-assisted protein folding. *Curr Opin Struct Biol.* 1997;7(1):41-52. doi:10.1016/S0959-440X(97)80006-1
114. Bose D, Chakrabarti A. Substrate specificity in the context of molecular chaperones. *IUBMB Life.* 2017;69(9):647-659. doi:10.1002/iub.1656
115. Lund PA. Microbial molecular chaperones. In: *Advances in Microbial Physiology.* Vol 44. Elsevier; 2001:93-140. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065291101440124>
116. Large AT, Goldberg MD, Lund PA. Chaperones and protein folding in the archaea. *Biochem Soc Trans.* 2009;37(1):46-51. doi:10.1042/BST0370046
117. Bogumil D, Alvarez-Ponce D, Landan G, McInerney JO, Dagan T. Integration of Two Ancestral Chaperone Systems into One: The Evolution of Eukaryotic Molecular Chaperones in Light of Eukaryogenesis. *Mol Biol Evol.* 2014;31(2):410-418. doi:10.1093/molbev/mst212

118. Kurochkina LP, Semenyuk PI, Orlov VN, Robben J, Sykilinda NN, Mesyanzhinov V V. Expression and Functional Characterization of the First Bacteriophage-Encoded Chaperonin. *J Virol.* 2012;86(18):10103-10111. doi:10.1128/JVI.00940-12
119. Stanishneva-Konovalova TB, Semenyuk PI, Kurochkina LP, et al. Cryo-EM reveals an asymmetry in a novel single-ring viral chaperonin. *J Struct Biol.* 2020;209(2):107439. doi:10.1016/j.jsb.2019.107439
120. Bracher A, Paul SS, Wang H, Wischnewski N, Hartl FU, Hayer-Hartl M. Structure and conformational cycle of a bacteriophage-encoded chaperonin. Zeth K, ed. *PLoS One.* 2020;15(4):e0230090. doi:10.1371/journal.pone.0230090
121. Lorimer GH. A quantitative assessment of the role of the chaperonin proteins in protein folding in vivo. *The FASEB Journal.* 1996;10(1):5-9. doi:10.1096/fasebj.10.1.8566548
122. Kerner MJ, Naylor DJ, Ishihama Y, et al. Proteome-wide Analysis of Chaperonin-Dependent Protein Folding in Escherichia coli. *Cell.* 2005;122(2):209-220. doi:10.1016/j.cell.2005.05.028
123. Calloni G, Chen T, Schermann SM, et al. DnaK Functions as a Central Hub in the E. coli Chaperone Network. *Cell Rep.* 2012;1(3):251-264. doi:10.1016/j.celrep.2011.12.007
124. Soufi B, Krug K, Harst A, Macek B. Characterization of the E. coli proteome and its modifications during growth and ethanol stress. *Front Microbiol.* 2015;6. doi:10.3389/fmicb.2015.00103
125. Horwich AL, Farr GW, Fenton WA. GroEL–GroES-Mediated Protein Folding. *Chem Rev.* 2006;106(5):1917-1930. doi:10.1021/cr040435v
126. Braig K, Otwinowski Z, Hegde R, et al. The crystal structure of the bacterial chaperonin GroEL at 2.8 Å. *Nature.* 1994;371(6498):578-586. doi:10.1038/371578a0

127. Braig K, Adams PD, Brünger AT. Conformational variability in the refined structure of the chaperonin GroEL at 2.8 Å resolution. *Nat Struct Mol Biol.* 1995;2(12):1083-1094. doi:10.1038/nsb1295-1083
128. Fenton WA, Kashi Y, Furtak K, Norwich AL. Residues in chaperonin GroEL required for polypeptide binding and release. *Nature.* 1994;371(6498):614-619. doi:10.1038/371614a0
129. Buckle AM, Zahn R, Fersht AR. A structural model for GroEL–polypeptide recognition. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 1997;94(8):3571-3575. doi:10.1073/pnas.94.8.3571
130. Chen L, Sigler PB. The Crystal Structure of a GroEL/Peptide Complex. *Cell.* 1999;99(7):757-768. doi:10.1016/S0092-8674(00)81673-6
131. Xu Z, Horwich AL, Sigler PB. The crystal structure of the asymmetric GroEL–GroES–(ADP)₇ chaperonin complex. *Nature.* 1997;388(6644):741-750. doi:10.1038/41944
132. Hunt JF, Weaver AJ, Landry SJ, Gierasch L, Deisenhofer J. The crystal structure of the GroES co-chaperonin at 2.8 Å resolution. *Nature.* 1996;379(6560):37-45. doi:10.1038/379037a0
133. Chaudhuri TK, Gupta P. Factors governing the substrate recognition by GroEL chaperone: a sequence correlation approach. *Cell Stress Chaperones.* 2005;10(1):24. doi:10.1379/CSC-64R1.1
134. Niwa T, Fujiwara K, Taguchi H. Identification of novel *in vivo* obligate GroEL/ES substrates based on data from a cell-free proteomics approach. Valencia A, ed. *FEBS Lett.* 2016;590(2):251-257. doi:10.1002/1873-3468.12036
135. Sot B, Bañuelos S, Valpuesta JM, Muga A. GroEL Stability and Function. *Journal of Biological Chemistry.* 2003;278(34):32083-32090. doi:10.1074/jbc.M303958200
136. Lorimer GH, Fei X, Ye X. The GroEL chaperonin: a protein machine with pistons driven by ATP binding and hydrolysis. *Philosophical*

- Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2018;373(1749):20170179. doi:10.1098/rstb.2017.0179
137. Fei X, Ye X, LaRonde NA, Lorimer GH. Formation and structures of GroEL:GroES₂ chaperonin footballs, the protein-folding functional form. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2014;111(35):12775-12780. doi:10.1073/pnas.1412922111
138. Saibil HR, Fenton WA, Clare DK, Horwich AL. Structure and Allostery of the Chaperonin GroEL. *J Mol Biol*. 2013;425(9):1476-1487. doi:10.1016/j.jmb.2012.11.028
139. Hayer-Hartl M, Bracher A, Hartl FU. The GroEL–GroES Chaperonin Machine: A Nano-Cage for Protein Folding. *Trends Biochem Sci*. 2016;41(1):62-76. doi:10.1016/j.tibs.2015.07.009
140. Ye X, Lorimer GH. Substrate protein switches GroE chaperonins from asymmetric to symmetric cycling by catalyzing nucleotide exchange. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2013;110(46). doi:10.1073/pnas.1317702110
141. Lin Z, Rye HS. GroEL-Mediated Protein Folding: Making the Impossible, Possible. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2006;41(4):211-239. doi:10.1080/10409230600760382
142. Koike-Takeshita A, Arakawa T, Taguchi H, Shimamura T. Crystal Structure of a Symmetric Football-Shaped GroEL:GroES₂-ATP₁₄ Complex Determined at 3.8 Å Reveals Rearrangement between Two GroEL Rings. *J Mol Biol*. 2014;426(21):3634-3641. doi:10.1016/j.jmb.2014.08.017
143. Inobe T, Takahashi K, Maki K, et al. Asymmetry of the GroEL-GroES Complex under Physiological Conditions as Revealed by Small-Angle X-Ray Scattering. *Biophys J*. 2008;94(4):1392-1402. doi:10.1529/biophysj.107.114710

144. Haldar S, Gupta AJ, Yan X, Miličić G, Hartl FU, Hayer-Hartl M. Chaperonin-Assisted Protein Folding: Relative Population of Asymmetric and Symmetric GroEL:GroES Complexes. *J Mol Biol.* 2015;427(12):2244-2255. doi:10.1016/j.jmb.2015.04.009
145. Sameshima T, Iizuka R, Ueno T, Funatsu T. Denatured proteins facilitate the formation of the football-shaped GroEL-(GroES)₂ complex. *Biochemical Journal.* 2010;427(2):247-254. doi:10.1042/BJ20091845
146. Yang D, Ye X, Lorimer GH. Symmetric GroEL:GroES₂ complexes are the protein-folding functional form of the chaperonin nanomachine. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2013;110(46). doi:10.1073/pnas.1318862110
147. Araki K, Suenaga A, Kusano H, et al. Functional profiling of asymmetrically-organized human CCT/TRiC chaperonin. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016;481(3-4):232-238. doi:10.1016/j.bbrc.2016.10.120
148. Kim S, Willison KR, Horwich AL. Cytosolic chaperonin subunits have a conserved ATPase domain but diverged polypeptide-binding domains. *Trends Biochem Sci.* 1994;19(12):543-548. doi:10.1016/0968-0004(94)90058-2
149. Todd MJ, Lorimer GH, Thirumalai D. Chaperonin-facilitated protein folding: optimization of rate and yield by an iterative annealing mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 1996;93(9):4030-4035. doi:10.1073/pnas.93.9.4030
150. Valpuesta JM, Martín-Benito J, Gómez-Puertas P, Carrascosa JL, Willison KR. Structure and function of a protein folding machine: the eukaryotic cytosolic chaperonin CCT. *FEBS Lett.* 2002;529(1):11-16. doi:10.1016/S0014-5793(02)03180-0

151. Spiess C, Meyer AS, Reissmann S, Frydman J. Mechanism of the eukaryotic chaperonin: protein folding in the chamber of secrets. *Trends Cell Biol.* 2004;14(11):598-604. doi:10.1016/j.tcb.2004.09.015
152. Gómez-Puertas P, Martín-Benito J, Carrascosa JL, Willison KR, Valpuesta JM. The substrate recognition mechanisms in chaperonins. *Journal of Molecular Recognition.* 2004;17(2):85-94. doi:10.1002/jmr.654
153. Booth CR, Meyer AS, Cong Y, et al. Mechanism of lid closure in the eukaryotic chaperonin TRiC/CCT. *Nat Struct Mol Biol.* 2008;15(7):746-753. doi:10.1038/nsmb.1436
154. Llorca O. The “sequential allosteric ring” mechanism in the eukaryotic chaperonin-assisted folding of actin and tubulin. *EMBO J.* 2001;20(15):4065-4075. doi:10.1093/emboj/20.15.4065
155. Naletova IN, Popova KM, Eldarov MA, et al. Chaperonin TRiC assists the refolding of sperm-specific glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Arch Biochem Biophys.* 2011;516(1):75-83. doi:10.1016/j.abb.2011.09.010
156. Ferreyra RG, Frydman J. Purification of the Cytosolic Chaperonin TRiC from Bovine Testis. In: *Chaperonin Protocols*. Vol 140. Humana Press; 2000:153-160. <http://link.springer.com/10.1385/1-59259-061-6:153>
157. Norcum MT. Novel isolation method and structural stability of a eukaryotic chaperonin: The TCP-1 ring complex from rabbit reticulocytes. *Protein Science.* 1996;5(7):1366-1375. doi:10.1002/pro.5560050715
158. Rezaei H, Marc D, Choiset Y, et al. High yield purification and physico-chemical properties of full-length recombinant allelic variants of sheep prion protein linked to scrapie susceptibility. *Eur J Biochem.* 2000;267(10):2833-2839. doi:10.1046/j.1432-1033.2000.01347.x

159. Biancalana M, Koide S. Molecular mechanism of Thioflavin-T binding to amyloid fibrils. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*. 2010;1804(7):1405-1412. doi:10.1016/j.bbapap.2010.04.001
160. Bruce F. Scharschmidt, Emmet B. Keefe, Nancy M. Blankenship, Robert K. Ockner. Validation of a recording spectrophotometric method for measurement of membrane-associated Mg²⁺ and NaK-ATPase activity. *J Lab Clin Med*. 1979;93(5):790-799.
161. Laemmli UK. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227(5259):680-685. doi:10.1038/227680a0
162. Tegunov D, Cramer P. Real-time cryo-electron microscopy data preprocessing with Warp. *Nat Methods*. 2019;16(11):1146-1152. doi:10.1038/s41592-019-0580-y
163. Zivanov J, Nakane T, Forsberg BO, et al. New tools for automated high-resolution cryo-EM structure determination in RELION-3. *Elife*. 2018;7:e42166. doi:10.7554/eLife.42166
164. Grant T, Rohou A, Grigorieff N. cisTEM, user-friendly software for single-particle image processing. *Elife*. 2018;7:e35383. doi:10.7554/eLife.35383
165. Punjani A, Rubinstein JL, Fleet DJ, Brubaker MA. cryoSPARC: algorithms for rapid unsupervised cryo-EM structure determination. *Nat Methods*. 2017;14(3):290-296. doi:10.1038/nmeth.4169
166. Punjani A, Fleet DJ. 3D variability analysis: Resolving continuous flexibility and discrete heterogeneity from single particle cryo-EM. *J Struct Biol*. 2021;213(2):107702. doi:10.1016/j.jsb.2021.107702
167. Wagner T, Merino F, Stabrin M, et al. SPHIRE-crYOLO is a fast and accurate fully automated particle picker for cryo-EM. *Commun Biol*. 2019;2(1):218. doi:10.1038/s42003-019-0437-z

168. Scheres SHW. RELION: Implementation of a Bayesian approach to cryo-EM structure determination. *J Struct Biol.* 2012;180(3):519-530. doi:10.1016/j.jsb.2012.09.006
169. Yang Z, Fang J, Chittuluru J, Asturias FJ, Penczek PA. Iterative Stable Alignment and Clustering of 2D Transmission Electron Microscope Images. *Structure.* 2012;20(2):237-247. doi:10.1016/j.str.2011.12.007
170. Panina IS, Mamchur AA, Yaroshevich IA, et al. Study of GroEL Conformational Mobility by Cryo-Electron Microscopy and Molecular Dynamics. *Crystallography Reports.* 2021;66(5):846-853. doi:10.1134/S1063774521050163
171. Abraham MJ, Murtola T, Schulz R, et al. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX.* 2015;1-2:19-25. doi:10.1016/j.softx.2015.06.001
172. Robustelli P, Piana S, Shaw DE. Developing a molecular dynamics force field for both folded and disordered protein states. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2018;115(21). doi:10.1073/pnas.1800690115
173. Bussi G, Donadio D, Parrinello M. Canonical sampling through velocity rescaling. *J Chem Phys.* 2007;126(1):014101. doi:10.1063/1.2408420
174. Parrinello M, Rahman A. Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method. *J Appl Phys.* 1981;52(12):7182-7190. doi:10.1063/1.328693
175. Essmann U, Perera L, Berkowitz ML, Darden T, Lee H, Pedersen LG. A smooth particle mesh Ewald method. *J Chem Phys.* 1995;103(19):8577-8593. doi:10.1063/1.470117
176. Piana S, Donchev AG, Robustelli P, Shaw DE. Water Dispersion Interactions Strongly Influence Simulated Structural Properties of

- Disordered Protein States. *J Phys Chem B*. 2015;119(16):5113-5123. doi:10.1021/jp508971m
177. Shimamura T, Koike-Takeshita A, Yokoyama K, et al. Crystal Structure of the Native Chaperonin Complex from *Thermus thermophilus* Revealed Unexpected Asymmetry at the cis-Cavity. *Structure*. 2004;12(8):1471-1480. doi:10.1016/j.str.2004.05.020
178. Chaudhry C, Horwich AL, Brunger AT, Adams PD. Exploring the Structural Dynamics of the E.coli Chaperonin GroEL Using Translation-libration-screw Crystallographic Refinement of Intermediate States. *J Mol Biol*. 2004;342(1):229-245. doi:10.1016/j.jmb.2004.07.015
179. Chaudhry C. Role of the γ -phosphate of ATP in triggering protein folding by GroEL-GroES: function, structure and energetics. *EMBO J*. 2003;22(19):4877-4887. doi:10.1093/emboj/cdg477
180. Chen DH, Madan D, Weaver J, et al. Visualizing GroEL/ES in the Act of Encapsulating a Folding Protein. *Cell*. 2013;153(6):1354-1365. doi:10.1016/j.cell.2013.04.052
181. Yan X, Shi Q, Bracher A, et al. GroEL Ring Separation and Exchange in the Chaperonin Reaction. *Cell*. 2018;172(3):605-617.e11. doi:10.1016/j.cell.2017.12.010
182. Ranson NA, Clare DK, Farr GW, Houldershaw D, Horwich AL, Saibil HR. Allosteric signaling of ATP hydrolysis in GroEL–GroES complexes. *Nat Struct Mol Biol*. 2006;13(2):147-152. doi:10.1038/nsmb1046