

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

имени М.В. ЛОМОНОСОВА

ФАКУЛЬТЕТ БИОИНЖЕНЕРИИ И БИОИНФОРМАТИКИ

На правах рукописи

Лейси Евгения Викторовна

**Влияние фаговых шаперонинов на патологическую
трансформацию амилоидных белков**

1.1.10. Биомеханика и биоинженерия

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научные руководители:

д.б.н., профессор Муронец Владимир Израилевич

к.х.н. Курочкина Лидия Петровна

Москва – 2025

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	6
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	14
1. Структура и функции шаперонинов	14
1.1. Особенности фаговых шаперонинов	17
1.2. Характеристика двухкольцевого шаперонина EL	18
1.3. Характеристика однокольцевого шаперонина OBP	20
2. Характеристика альфа-синуклеина	21
2.1. Структура и функции альфа-синуклеина	21
2.2. Патологическая трансформация альфа-синуклеина	23
2.3. Этиология болезни Паркинсона	25
2.4. Влияние шаперонинов на патологическую трансформацию альфа-синуклеина	30
3. Характеристика прионного белка	31
3.1. Структура и функции прионного белка	31
3.2. Патологическая трансформация прионного белка	33
3.3. Этиология прионных заболеваний	35
3.4. Взаимодействие шаперонинов с прионным белком и их влияние на патологическую трансформацию прионного белка	37
МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	40
1. Конструирование плазмидного вектора, содержащего ген альфа-синуклеина с дополнительным стоп кодоном	40
1.1. Амплификация гена альфа-синуклеина дикого типа методом ПЦР ..	40
1.2. Рестрикция вектора	40
1.3. Мутагенез гена	40
1.4. Лигирование	41
1.5. Электрофорез ДНК в агарозном геле	42
1.6. Трансформация бактериальных клеток	42
2. Экспрессия, выделение и очистка белков	43
2.1. Экспрессия, выделение и очистка альфа-синуклеина	43
2.2. Экспрессия, выделение и очистка овечьего прионного белка	44
2.3. Экспрессия, выделение и очистка шаперонина GroEL и его кошаперонина GroES	45

2.4. Экспрессия, выделение и очистка вирусных шаперонинов.....	47
3. Определение функциональной активности шаперонинов.....	48
3.1. АТРазная активность.....	48
3.2. Реактивация лактатдегидрогеназы (ЛДГ)	49
3.3. Анализ агрегации эндолизина	50
4. Взаимодействие шаперонинов с разными формами альфа-синуклеина..	51
4.1. Получение разных форм альфа-синуклеина	51
4.2. Твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА)	51
5. Изучение влияния шаперонинов на агрегацию амилоидных белков при их инкубации <i>in vitro</i>	52
5.1. Фибриллизация альфа-синуклеина	52
5.2. Фибриллизация прионного белка.....	53
5.3. Вычисление продолжительности лаг-фаз и скорости роста фибрилл	54
5.4. Измерение мутности растворов (турбидиметрический метод)	54
5.5. Оценка токсичности образуемых агрегатов для клеток методом МТТ-теста.....	55
6. Исследования на эукариотических клетках, трансфицированных плазмидами, содержащими гены шаперонина ОВР и альфа-синуклеина А53Т.....	56
6.1. Конструирование плазмид для трансфекции НЕК293Т и SH-SY5Y .	56
6.2. Клеточная культура	57
6.3. Экспрессия белка в клетках НЕК293Т и иммуноблоттинг	57
6.4. Иммуноцитохимия.....	58
6.5. Оценка жизнеспособности клеток с помощью МТТ-теста	59
7. Характеристика агрегатов амилоидогенных белков	59
7.1. Распределение белков между осадком и супернатантом	59
7.2. Подготовка фибрилл.....	60
7.3. Динамическое рассеяние света (ДРС)	60
7.4. Трансмиссионная электронная микроскопия (ТЭМ).....	60
7.5. Протеолитическое расщепление фибрилл	60
8. Статистический анализ.....	61
РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	62
1. Выделение и очистка белков	62

1.1. Получение альфа-синуклеина с дополнительным стоп-кодоном	62
1.2. Выделение и очистка альфа-синуклеина.....	63
1.3. Экспрессия, выделение и очистка прионного белка.....	64
1.4. Экспрессия, выделение и очистка бактериального шаперонина GroEL и его кошаперонина GroES	65
1.5. Экспрессия, выделение и очистка вирусных шаперонинов.....	66
2. Функциональная активность шаперонинов	68
2.1. Функциональная активность GroE	68
2.2. Функциональная активность фаговых шаперонинов	69
2.3. Сравнение функциональной активности ОВР и ОВРΔAD	71
3. Связывание вирусных шаперонинов с различными формами альфа-синуклеина.....	74
4. Влияние шаперонинов на агрегацию альфа-синуклеина	78
4.1. Оптимизация методики фибриллизации альфа-синуклеина	78
4.2. Влияние бактериального шаперонина GroE на агрегацию альфа-синуклеина A53T	82
4.3. Влияние двухкольцевого шаперонина EL и однокольцевого шаперонина ОВР на агрегацию альфа-синуклеина.....	85
5. Влияние однокольцевого шаперонина ОВР на агрегацию альфа-синуклеина A53T при коэкспрессии их генов в клетках млекопитающих. ..	94
5.1. Экспрессия шаперонина ОВР и альфа-синуклеина A53T при отдельной трансфекции клеток НЕК293Т плазмидами, содержащими их гены	94
5.2. Оценка агрегации альфа-синуклеина A53T в НЕК293Т при коэкспрессии альфа-синуклеина A53T и ОВР в клетках.....	96
5.3. Влияние коэкспрессии генов альфа-синуклеина A53T и ОВР на выживаемость эукариотических клеток	99
6. Влияние делеционных мутантов ОВР на агрегацию альфа-синуклеина A53T.....	101
6.1. Влияние апикального домена ОВР на амилоидизацию альфа-синуклеина A53T	101
6.2. Влияние мутантной формы ОВР, лишенной апикальных доменов, на фибриллизацию альфа-синуклеина A53T	103
7. Влияние фаговых шаперонинов на агрегацию прионного белка	105

7.1. Влияние однокольцевого ОВР и двухкольцевого EL на агрегацию прионного белка.....	105
7.2. Влияние агрегатов, образуемых под действием шаперонина ОВР, на выживаемость эукариотических клеток	113
7.3. Влияние мутантной формы шаперонина ОВР без апикальных доменов на агрегацию прионного белка	116
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	119
ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ	122
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ	123
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	125

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности

Вследствие неправильного сворачивания (мисфолдинга) и агрегации некоторых белков развивается ряд нейродегенеративных заболеваний. В частности, мисфолдинг и агрегация альфа-синуклеина приводит к развитию синуклеинопатий, к которым относится болезнь Паркинсона. Данное заболевание является вторым по распространённости нейродегенеративным расстройством. По глобальной оценке, в 2018 году свыше 8,5 миллионов человек страдали от болезни Паркинсона [1,2]. Неправильное сворачивание и агрегация другого белка, а именно прионного белка, приводит к развитию прионных заболеваний, таких как синдром Крейцфельдта–Якоба, куру, синдром Герстманна–Штройслера–Шейнкера и хроническая семейная бессонница у человека, почесуха овец (скрепи) и губчатая энцефалопатия коров [3,4].

При этом, с образовавшимися агрегатами так или иначе взаимодействует клеточная система шаперонов [5]. В последние годы роль различных шаперонов в регуляции патологической трансформации амилоидогенных белков была пересмотрена. На смену представлениям о благотворном влиянии всех шаперонов на течение амилоидных заболеваний, связанным с данными о разрушении шаперонами фибриллярных структур, пришло понимание двойственного действия шаперонов на формирование и деградацию амилоидных образований. Было признано, что образование из фибрилл более мелких фрагментов, например, олигомеров, лишь стимулирует амилоидозы, поскольку именно олигомеры обладают высокой нейротоксичностью [6-9]. Возможно, формирование фибрилл из амилодогенных белков является защитной реакцией, предотвращающей пагубное воздействие мономерных и олигомерных форм амилоидных белков. Таким образом, шапероны, разрушающие фибриллы, скорее всего, не защищают от развития нейродегенеративных заболеваний, а способствуют их развитию. Более того, было обнаружено, что в некоторых случаях в

определенном функциональном состоянии шапероны стимулируют образование амилоидных структур, изменяя нативную конформацию мономерных амилоидогенных белков на патологическую [10-12]. Однако, в настоящее время практически отсутствуют полноценные данные о сравнении влияния разных шаперонов на патологическую трансформацию альфа-синуклеина и прионного белка.

Альфа-синуклеин в настоящее время является популярным объектом исследования. По данным PubMed начиная с 2015 года ежегодно публикуется более тысячи статей, так или иначе связанных с изучением этого белка. Однако, несмотря на актуальность и высокий прогресс в исследованиях, многие вопросы, касающиеся этого белка, до сих пор остаются не до конца разрешенными. Это также относится и к самим заболеваниям, называемым синуклеинопатиями, которые возникают вследствие неправильного сворачивания альфа-синуклеина. Так, до конца не ясны факторы, вызывающие изменение структуры альфа-синуклеина и его последующую агрегацию в живых организмах, из-за чего также неоднозначны представления об этиологии заболеваний [13,14]. Кроме того, в настоящее время основным способом терапии синуклеинопатий является компенсация потери дофамина, что по сути лишь облегчает симптомы болезни и позволяет замедлить ее развитие, но не излечить [15].

То же касается и прионного белка. По данным PubMed по запросу «prion protein» за последние 20 лет вышло более 15 тысяч статей. Однако, несмотря на огромное количество исследований, многие аспекты до сих пор остаются непонятными. Как и в случае с альфа-синуклеином, до конца не ясны факторы, вызывающие изменение нормальной структуры белка на патологическую [16,17].

Несмотря на популярность объектов исследования, тема взаимодействия шаперонинов с амилоидогенными белками в настоящее время остается малоизученной. Известно, что человеческий HSP60, а также некоторые его мутантные формы, взаимодействуют с мономерами и

олигомерами альфа-синуклеина и предотвращают его агрегацию. Помимо этого, было показано, что изолированный апикальный домен HSP60 подавляет агрегацию альфа-синуклеина внутри клеток [18]. Кроме того, другие шаперонины, а именно GroEL и TRiC, связывают мономеры и олигомеры альфа-синуклеина и, тем самым, препятствуют его агрегации и снижают его токсичность для клеток [19-21].

В то же время, в случае прионного белка, шаперонины, вероятно, напрямую участвуют в его неправильном сворачивании [10]. Было показано, что HSP60 специфично взаимодействует с PrP^C [22]. Также, показано, что GroEL может АТФ-зависимо индуцировать образование агрегатов прионного белка из мономеров рекомбинантного белка *de novo* [11]. Показано, что при связывании мономеров прионного белка с апикальным доменом GroEL происходит разворачивание альфа-спирали прионного белка, что, вероятно, играет роль в его трансформации [12]. Кроме того, взаимодействие прионного белка с шаперонинами может усугубить развитие патологии. Так, при связывании шаперонинов GroEL или TRiC с мономерами и олигомерами прионного белка происходит блокирование функции шаперонинов, что может приводить к накоплению неправильно свернутых и агрегированных белков [23-26].

Цели и задачи исследования

Целью данной работы является выяснение влияния фаговых шаперонинов на патологическую трансформацию альфа-синуклеина и прионного белка.

Для реализации данной цели были поставлены следующие задачи:

- 1) Оценить влияние фаговых шаперонинов, а именно двухкольцевого EL и однокольцевого ОВР, на патологическую трансформацию альфа-синуклеина.

- 2) Продemonстрировать влияние коэкспрессии генов мутантной формы альфа-синуклеина A53T и шаперонина OBP в клетках HEK293T на агрегацию альфа-синуклеина.
- 3) Сравнить влияние делеционных мутантов шаперонина OBP, а именно его апикального домена и мутантной формы, лишенной этих доменов, на амилоидную трансформацию альфа-синуклеина A53T.
- 4) Оценить влияние шаперонинов EL и OBP на агрегацию прионного белка.

Научная новизна работы

Впервые показано, что вирусные шаперонины могут влиять на агрегацию амилоидогенных белков при инкубации *in vitro*. С помощью электронной микроскопии и биохимических методов установлено, что шаперонины EL и OBP в отсутствие АТР препятствуют образованию амилоидных фибрилл альфа-синуклеина. Инкубация альфа-синуклеина с EL или OBP в присутствии АТР, напротив, стимулирует образование амилоидных фибрилл альфа-синуклеина, токсичных для клеток HEK293T и SH-SY5Y. Показано влияние делеционных мутантов OBP, а именно: его апикального домена и мутантной формы, лишенной этих доменов, на амилоидную трансформацию альфа-синуклеина A53T.

Впервые показано, что коэкспрессия генов шаперонина OBP и мутантной формы альфа-синуклеина A53T в эукариотических клетках HEK293T приводит к образованию небольшого количества агрегатов альфа-синуклеина, которые не влияют на жизнеспособность клеток.

Впервые показано, что при инкубации *in vitro* шаперонина OBP с мономерами прионного белка в присутствии АТР образуются крупные агрегаты прионного белка, отличающиеся по морфологии и свойствам от фибрилл, формирующихся спонтанно.

Теоретическая и практическая значимость

Полученные результаты дополняют теоретические представления о влиянии шаперонинов на патологическую трансформацию амилоидных белков: альфа-синуклеина и прионного белка. Дальнейшее развитие данного исследования позволит разработать белковые препараты на основе шаперонинов и их фрагментов для лечения болезни Паркинсона и прионных заболеваний. Кроме того, модель коэкспрессии генов мутантной формы альфа-синуклеина A53T и шаперонина ОВР в эукариотических клетках позволит прояснить роль шаперонинов в трансформации альфа-синуклеина.

Методология исследования

В исследовании были использованы биоинженерные, молекулярно-генетические, биохимические методы и методы работы с культурами клеток млекопитающих. Все использованные методики были применены в соответствии с общепринятыми мировыми стандартами и с надлежащими контролями. Методы выделения рекомбинантного альфа-синуклеина и фаговых шаперонинов были разработаны коллективом лаборатории и модифицированы при выполнении данной работы.

Основные положения, выносимые на защиту

- 1) Фаговые шаперонины EL и ОВР оказывают влияние на агрегацию альфа-синуклеина при инкубации *in vitro*: в отсутствие АТР оба шаперонина препятствуют образованию амилоидных фибрилл, а в присутствии АТР вызывают образование фибрилл альфа-синуклеина, токсичных для клеток HEK293T и SH-SY5Y;
- 2) Коэкспрессия генов мутантной формы альфа-синуклеина A53T и шаперонина ОВР в клетках HEK293T приводит к образованию небольшого количества агрегатов альфа-синуклеина, что не влияет на жизнеспособность клеток;

- 3) Делеционные мутанты шаперонина ОВР влияют на амилоидную трансформацию альфа-синуклеина A53T: апикальный домен шаперонина ОВР препятствует амилоидной трансформации, а мутантная форма, лишенная апикальных доменов, воздействует на агрегацию альфа-синуклеина в зависимости от присутствия АТР, то есть так же, как и полноразмерный ОВР;
- 4) Инкубация шаперонинов EL и ОВР с мономерами прионного белка *in vitro* приводит к образованию крупных агрегатов прионного белка, но только в присутствии АТР.

Достоверность результатов

Обзор литературы подготовлен с использованием актуальных публикаций по теме диссертации. Данные, представленные в работе, получены с использованием современных биоинженерных, молекулярно-биологических, биохимических методик и методик работы с культурами клеток млекопитающих и воспроизводимы. Для выявления значимых различий между выборками была проведена статистическая обработка результатов с помощью языка R и программных пакетов в RStudio. Основные результаты опубликованы в международных рецензируемых журналах

Место выполнения работы и личный вклад соискателя

Основные результаты работы были получены самим автором. Личный вклад заключается в анализе научной литературы, планировании и проведении экспериментов, обработке и анализе полученных данных, подготовке статей к публикации, участии в научных конференциях. Ведение клеточных линий и измерение цитотоксичности проводились при участии Д.В. Поздышева. Эксперименты по трансфекции и иммуноцитохимический анализ проводились при участии Д.В. Поздышева. Электронная микроскопия проводилась при участии С.А. Голышева. Делеционные мутанты шаперонина ОВР (AD и ОВРΔAD) были предоставлены У.Ф. Джус.

Публикации по теме исследования

Основные идеи и положения работы изложены в 6 научных трудах автора, в том числе в 6 статьях, опубликованных в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальности 1.1.10 – «Биомеханика и биоинженерия» биологических наук. Все 6 статей опубликованы в индексируемых в наукометрических базах данных Web of Science, Scopus и РИНЦ. Из них 4 статьи опубликованы в изданиях первого квартиля по базе «Белого списка» и «ScimagoJR».

1) **Leisi E.V.**, Barinova K.V., Kudryavtseva S.S., Moiseenko A.V., Muronetz V.I., Kurochkina L.P. Effect of bacteriophage-encoded chaperonins on amyloid transformation of α -synuclein // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2022. – V. 622, P. 136-142. doi: 10.1016/j.bbrc.2022.07.015. Импакт-фактор 2,5 (JIF), (0,8/0,31)¹

2) **Leisi E.V.**, Moiseenko A.V., Kudryavtseva S.S., Pozdyshev D.V., Muronetz V.I., Kurochkina L.P. Bacteriophage-encoded chaperonins stimulate prion protein fibrillation in an ATP-dependent manner // *Biochimica et biophysica acta. Proteins and proteomics*. – 2023. – V. 1872, P. 140965. doi: 10.1016/j.bbapap.2023.140965. Импакт-фактор 2,9 (JIF), (1,04/0,45)¹

3) Muronetz V.I., Kurochkina L.P., **Leisi E.V.**, Kudryavtseva S.S. Are gastrointestinal microorganisms involved in the onset and development of amyloid neurodegenerative diseases? // *Microbiology Research*. – 2023. – V. 14, P. 1942-1955. doi: 10.3390/microbiolres14040131. Импакт-фактор 2,1 (JIF), (1,64/0,4)¹

4) Pozdyshev D.V., **Leisi E.V.**, Muronetz V.I., Golyshev S.A., Kurochkina L.P. Cytotoxicity of α -synuclein amyloid fibrils generated with phage chaperonin OBP // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2025. – V. 742, P. 151127, doi: 10.1016/j.bbrc.2024.151127. Импакт-фактор 2,5 (JIF), (1,04/0,2)¹

5) Муронец В.И., Кудрявцева С.С., Курочкина Л.П., **Лейси Е.В.**, Стройлова Ю.Ю., Шмальгаузен Е.В. Факторы, влияющие на патологическую трансформацию амилоидных белков: от посттрансляционных модификаций

¹ В скобках приведен объем публикации в печатных листах и вклад автора в печатных листах

до шаперонов // *Успехи биологической химии (Biochemistry Moscow)*. – 2025. – Т. 65, С. 237-280. doi: 10.1134/S0006297924604003. Импакт-фактор 2,59 (РИНЦ), (3,35/1,01)¹

6) **Leisi E.V.**, Zyurkalova D.V., Dzhus U.F., Nikulin A.D., Golyshev S.A., Muronetz V.I., Kurochkina L.P. Interaction of phage chaperonin OBP domains with amyloidogenic proteins // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. – 2025. – V. 771, P. 110493. doi: 10.1016/j.abb.2025.110493. Импакт-фактор 3,6 (JIF), (1,08/0,4)¹

Апробация результатов

Результаты работы были представлены на конференциях: Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2023» (Россия, Москва, 2023); «Биосистемы: организация, поведение, управление»: 77-я Международная школа-конференция 145 молодых ученых (Россия, Нижний Новгород, 2024); «Физико-химическая биология в год 270-летия МГУ» (Россия, Москва, 2025).

Структура и объем диссертационной работы

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, полученных результатов и их обсуждения, заключения, основных результатов, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 148 страницах, иллюстрирована 38 рисунками и 2 таблицами. Список цитируемой литературы включает 201 наименование.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1. Структура и функции шаперонинов

В клетках присутствует большое количество различных классов молекул, которые помогают белкам принять их функционально активную конформацию, при этом они не входят в состав сворачивающихся структур и не участвуют в их функционировании. Эти молекулы называют шаперонами. Их также называют белками теплового шока («heat shock proteins» (HSP)), поскольку при различных стрессовых воздействиях, включая тепловое, существенно усиливается их синтез. Кроме того, сначала были обнаружены именно белки теплового шока, а уже затем была установлена их функция. Шапероны участвуют во множестве процессов поддержания функционального протеома клетки, таких как сворачивание *de novo*, рефолдинге белков, денатурированных под действием стресса, сборке олигомеров, транспортировке белков и помощи в протеолитической деградации [27,28].

Обычно шапероны классифицируют в соответствии с молекулярной массой их субъединиц. Примерами семейств этих белков можно привести sHSP (малые белки теплового шока), HSP60, HSP70, HSP90. В данной работе мы исследовали только белки семейства HSP60, которые называются шаперонинами.

Шаперонины представляют собой многокомпонентные молекулярные машины, которые играют важную роль в способствовании правильному сворачиванию возникающих и частично свернутых полипептидов в их соответствующие трехмерные структуры. Шаперонины способны связывать различные белки, при этом связывание субстрата и нуклеотида происходит внутри полости, образованной субъединицами шаперонина. Обычно HSP60 распознают боковые цепи гидрофобных аминокислот. Связывание с гидрофобными участками ненативного белка временно блокирует агрегацию. Высвобождение, запускаемое АТР, позволяет сворачиванию продолжаться [29,30].

Известные шаперонины можно разделить на 2 группы, в зависимости от их происхождения и структуры. Шаперонины группы I обнаружены в эубактериях, хлоропластах и митохондриях. Они имеют двухкольцевую структуру и функционируют совместно с кошаперонинами. Одним из наиболее полно изученных представителей данной группы является бактериальная система GroEL-GroES [31], которая далее в работе будет обозначаться как GroE.

GroEL представляет собой цилиндрический комплекс из двух симметричных колец с полостью внутри. Каждое кольцо состоит из семи субъединиц с молекулярной массой 57 кДа. Субъединицы состоят из трех доменов: экваториального АТР-связывающего домена, промежуточного шарнирного домена и апикального домена, отвечающего за связывание субстрата и GroES. GroES – относительно небольшой белок, который имеет куполообразную форму и состоит из семи субъединиц с молекулярной массой 10 кДа. GroES связывается с концами цилиндра GroEL АТР-зависимым образом, закрывая внутреннюю полость шаперонина, в которой происходит сворачивание ненативного белка. Иными словами, этот кошаперонин действует как крышка, предотвращающая выход субстрата [32].

Кольцо GroEL может находиться в двух состояниях: 1) *транс*- – имеет высокое сродство к субстрату и низкое к GroES, полость GroEL выстлана гидрофобными аминокислотами; 2) *цис*- – высокое сродство к GroES. Переход между *цис*- и *транс*- состояниями происходит АТР-зависимым образом. Кольца GroEL функционируют асимметрично: одно находится в *цис*-состоянии, другое – в *транс*- [33,34].

Механизм работы системы можно представить следующим образом. Ненативный белок связывается с апикальным доменом GroEL (*транс*-кольцо), а именно с его гидрофобными остатками. При связывании АТР кольцо GroEL изменяет свою конформацию с *транс*- на *цис*- [35,36]. Далее GroES связывается с этим кольцом, а белок инкапсулируется в полость

шаперонина. Тем временем на противоположном кольце происходит диссоциация ADP и GroES и высвобождение нативного белка, кольцо переходит из *цис*- в *транс*- [35]. Во время гидролиза АТР происходит сворачивание субстрата в полости шаперонина. Когда АТР и GroES свяжутся с *транс*-кольцом, ADP, GroES и субстрат высвобождаются из *цис*-комплекса [35,37].

Шаперонины группы II встречаются у архей и эукариот. Они представляют собой олигомерные комплексы в форме кольца и функционируют без кошаперонина. Вместо этого они содержат встроенную крышку, которая открывается и закрывается над центральной полостью шаперонина. В качестве примеров можно привести TRiC, встречающийся у эукариот, и термосому архей [33,38].

TRiC – гетероолигомерный комплекс, имеющий общую массу около 1 МДа. Он состоит из двух уложенных друг на друга колец, каждое из которых состоит из восьми различных субъединиц. Каждая субъединица состоит из трех доменов: субстрат-связывающего апикального, АТР-связывающего экваториального и промежуточного шарнирного. На каждом апикальном домене есть дополнительный фрагмент, который обеспечивает открытие и закрытие доступа в полость шаперонина во время АТР-цикла. TRiC играет важную роль в сворачивании многих структурных и цитоплазматических белков, с ним взаимодействуют до 10% цитозольных белков [33].

Термосома – шаперонин архей, гомолог эукариотического TRiC. Он также состоит из двух колец по 8 субъединиц, однако, в отличие от TRiC, в его состав могут входить от 1 до 8 различных классов субъединиц (в зависимости от вида архей). Весь комплекс имеет шарообразную форму [39].

Продуктивное сворачивание белков шаперонинами II группы также является АТР-зависимым процессом.

Механизм работы в общих чертах можно представить следующим образом:

1) Связывание белка;

2) Связывание АТФ и формирование замкнутого шаперонинового комплекса. При гидролизе АТФ происходят конформационные перестройки внутри молекулы шаперонина, и в итоге изменяются внутри- и межсубъединичные контакты. В результате это приводит к сближению фрагмента крышки и закрытию полости шаперонина;

3) Высвобождение ADP из активного сайта и открытие крышки. Этот этап ограничивает скорость процесса [33].

1.1. Особенности фаговых шаперонинов

Шаперонины являются важными агентами в процессе сворачивания белков у всех групп живых организмов. Известно, что вирусы бактерий для сборки белков капсида или хвоста используют шаперонины клетки хозяина. Однако, некоторые бактериофаги кодируют собственные шаперонины. Показано, что из 2178 последовательностей в GenBank 165 несут ген GroES или его гомолога, 10 имеют ген субъединицы GroEL и 2 имеют оба гена [40]. Анализ метагеномных последовательностей показал, что гены шаперонинов сравнительно распространены у водных вирусов. К тому же у данных групп организмов были обнаружены аналоги термосомы архей [41].

В данной работе мы исследовали шаперонины псевдомонадных фагов ОВР и EL, структура и свойства которых будут рассмотрены подробно. Данные белки были аннотированы в базе данных как GroEL-подобные. Они также представляют собой кольцевые структуры, состоящие из семи субъединиц, имеющих молекулярную массу около 60 кДа. Каждая субъединица также состоит из трех доменов: апикального, экваториального и интермедиатного. В то же время, фаговые шаперонины имеют ряд характерных особенностей, которые отличают их как от шаперонинов группы I, так и от шаперонинов, относящихся к группе II. Главным их отличием является то, что они функционируют без кошаперонина, при этом у

них отсутствует так называемая «встроенная крышка». Помимо этого, данные шаперонины различаются между собой по архитектуре [42].

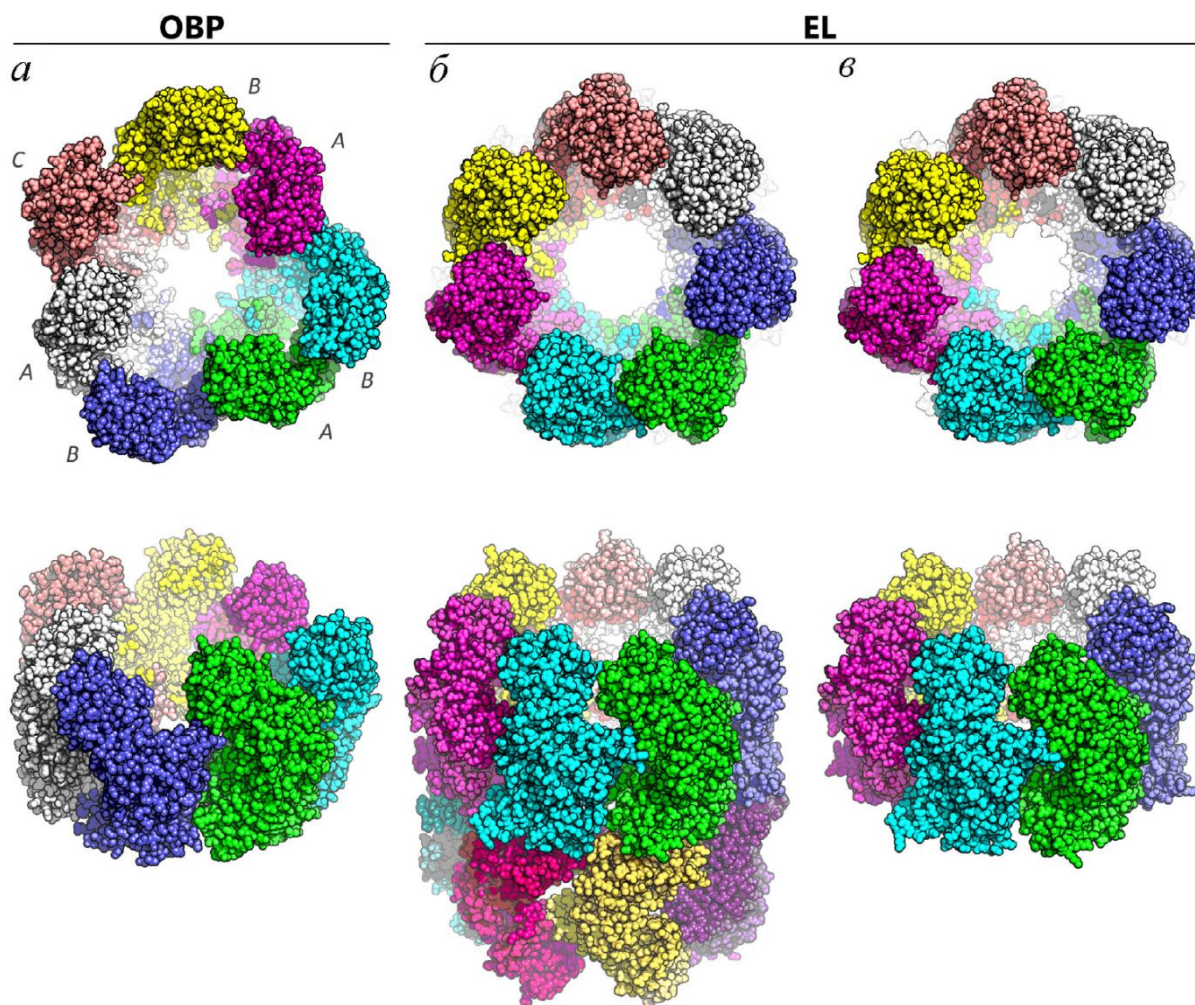


Рисунок 1. Сравнение структур однокольцевого шаперонина OBP и двухкольцевого шаперонина EL (верхний ряд – вид сверху, нижний – вид сбоку под углом); субъединицы окрашены разными цветами. *а, б* – Апо-формы шаперонинов OBP и EL, полученные с помощью криоэлектронной микроскопии; коды PDB: 6hdd и 6tmv, соответственно. Субъединицы OBP, образующие три пары, обозначены буквами *A* и *B*, а непарная подвижная субъединица – буквой *C*. *в* – Кристаллическая структура шаперонина EL в присутствии ATP–BeFx; код PDB: 6tmu.

1.2. Характеристика двухкольцевого шаперонина EL

Шаперонин фага EL *Pseudomonas aeruginosa*, кодируемый геном 146, впервые был идентифицирован и выделен в 2005 г. в лаборатории

молекулярной биоинженерии ИБХ РАН. Свойства двухкольцевого шаперонина EL были изучены различными физико-химическими методами [43]. Структура EL была установлена методами криоэлектронной микроскопии (CryoEM) и рентгеноструктурного анализа [44].

Установлено, что шаперонин обладает слабой АТРазной активностью. Методами иммунопреципитации и масс-спектрометрии был идентифицирован его белок-субстрат – фаговый эндолизин (gp188) [45]. Показано, что EL защищает эндолизин от термической агрегации АТР-зависимым образом. Более того, подобно GroEL, в отсутствие АТР он образует стабильный комплекс со своим субстратом, что также защищает эндолизин от агрегации [46].

Гипотетический АТРазный цикл EL можно представить следующим образом:

- 1) В апо-форме двухкольцевой шаперонин с асимметричной ориентацией апикальных доменов имеет низкое сродство к белку-субстрату;
- 2) Связывание АТР приводит к изменению ориентации апикальных доменов на симметричную, а также к диссоциации колец (при физиологической концентрации соли). Сродство к субстрату высокое;
- 3) Гидролиз АТР в трех чередующихся субъединицах, в результате которого конформация кольца становится похожей на апо-форму. Взаимодействие с субстратом при этом может ослабляться;
- 4) После гидролиза АТР в 4 оставшихся субъединицах происходит полная диссоциации ADP, субстрат высвобождается, а шаперонин EL регенерируется в двухкольцевую апо-форму.

На всех этапах АТРазного цикла шаперонин находится в открытой конформации, то есть не инкапсулирует субстрат в полости шаперонина [42, 44].

1.3. Характеристика однокольцевого шаперонина ОВР

Помимо EL позднее были охарактеризованы еще 2 вирусных шаперонина. Это шаперонин фага ОВР *Pseudomonas fluorescens*, кодируемый геном 246 [47], и шаперонин фага AR9 *Bacillus subtilis*, который кодируется геном 228 [46,48]. Далее в данной работе именуемые соответственно ОВР и AR9.

Оба шаперонина представляют собой олигомерные комплексы в виде единственного кольца с полостью внутри, сформированного из семи субъединиц. В данной работе исследования проводили с участием шаперонина ОВР.

Кольцо ОВР имеет ширину 13 нм в экваториальной части и высоту 7 нм. Субъединицы имеют молекулярную массу 57,8 кДа. Согласно CryoEM изображениям, в апо-форме вращательная симметрия C7 наблюдается только на уровне экваториальных доменов. На уровне интермедиатных доменов симметрия нарушается, а для апикальных доменов характерна явно выраженная асимметрия субъединиц в кольце [42]. Можно выделить три пары субъединиц, обозначаемые А и В и 1 непарную – С. Субъединицы А имеют низкое сродство к АТР и соответствуют открытой конформации GroEL. Субъединицы В имеют низкую аффинность к АТР и соответствуют закрытой конформации GroEL. Субъединица С, вероятно, имеет динамичный характер и находится в непрерывном движении между конформациями А и В. Связывание как АТР, так и АТРγS вызывает увеличение конформационной подвижности субъединиц А и В [49]. Однако, в отличие от апо-формы, статичной остается только 1 пара субъединиц А и В, в то время как остальные становятся динамичными, [42]. Таким образом, субъединицы шаперонина имеют 2 типа нуклеотид-связывающих сайтов, которые согласно кривым титрования, различаются константами связывания и тепловым эффектом [46,47].

Как известно, переход GroEL из закрытого в открытое состояние происходит за счет вращения апикальных доменов. Это вращение

обеспечивается функционированием верхнего шарнира, соединяющего промежуточный и апикальный домены. В отличие от GroEL, верхний шарнир в ОВР нефункционален, вследствие чего, можно предположить, что данный шаперонин находится в открытой конформации на всех этапах АТРазного цикла [42,44,49,50].

При изучении функциональной активности ОВР, показано, что он обладает АТРазной активностью, а также препятствуют термической агрегации фагового эндолизина. Следует отметить, что шаперонин проявляет свою антиагрегационную активность только в присутствии АТР [46,49]. Помимо этого, экспериментально было подтверждено, что ОВР при повышении температуры намного более эффективно препятствует агрегации небольших белков, таких как эндолизин, чем крупных [43,46].

2. Характеристика альфа-синуклеина

2.1. Структура и функции альфа-синуклеина

Некоторые белки имеют способность формировать амилоидные фибриллы. В таких структурах белковая цепь организована в многослойные сэндвичи, содержащие параллельные бета-структуры. Бета-листы в этих амилоидах соединены водородными связями, ориентированными вдоль оси, и плотно упакованы в протофиламенты, которые далее образуют длинные амилоидные нити. В таких бета-листах бета-тяжи располагаются перпендикулярно оси фибриллы [51-53]. Амилоидные фибриллы, как правило, обладают характерной структурой кросс-бета-шипа. В этой структуре бета-слои, в которых гидрофобные боковые цепи направлены друг к другу, переплетаются, образуя стерическую молнию [54,55].

Альфа-синуклеин – белок с молекулярной массой 14,4 кДа, кодируемый геном SNCA. В мозге он главным образом локализуется в пресинаптических окончаниях нейронов. Однако альфа-синуклеин присутствует также в других клетках и биологических жидкостях. В последовательности альфа-синуклеина можно выделить 3 домена: (1) N-

концевой домен, (2) NAC-домен и (3) отрицательно заряженный С-концевой домен [56]. N-конец богат лизином и состоит из семи повторов по 11 аминокислотных остатков с консенсусной последовательностью KTKEGV [57]. NAC-домен высокогидрофобен и склонен к агрегации. Изначально он был обнаружен при нейропатологии при болезни Альцгеймера, вследствие чего и получил свое название [58]. С-концевой домен отрицательно заряжен и богат глутаматом. Неструктурированный С-конец отвечает за связывание с белками, ионами металлов, поликатионами и полианионами. Также он модулирует связывание альфа-синуклеина с мембранами и защищает его от агрегации [59-62]. Кроме того, он включает несколько участков фосфорилирования, в частности, по остаткам тирозина 125, 133 и 136, а также по остатку серина 129. Эти модификации имеют существенное значение для выполнения физиологических функций альфа-синуклеина, а также для защиты от агрегации и развития патологий [63-65].

Структура альфа-синуклеина зависит от окружения. Так, в водном растворе белок не упорядочен, так как не имеет фиксированной трехмерной структуры. При связывании альфа-синуклеина с липидами N-конец и NAC-домен образуют альфа-спираль, структура которой зависит от кривизны мембраны. На мембранах с более высокой кривизной образуется разорванная спираль. Считается, что такая структура спирали является физиологически важной, при этом альфа-синуклеин образует мультимеры, стыкующиеся альфа-спиралями [66].

Также сообщалось о существовании в растворе спирально свернутого тетрамера альфа-синуклеина, устойчивого к агрегации, однако его существование оказалось весьма спорным [67].

Функция альфа-синуклеина дискутируема. Однако, известно, что мембранный альфа-синуклеин связывается своим С-концом с N-концом VAMP2/Synaptobrevin-2. Такое взаимодействие способствует сборке комплекса SNARE и кластеризации везикул [66,68].

2.2. Патологическая трансформация альфа-синуклеина

Помимо физиологических функций, альфа-синуклеин при определенных условиях способен изменять свою конформацию и образовывать ряд патологических форм. Одними из таких форм считаются олигомеры и фибриллы.

Здесь следует отметить, что изучение структуры и свойств олигомеров альфа-синуклеина является сложной задачей из-за их нестабильности и вариабельности. Во время фибриллизации *in vitro* образуются различные типы олигомеров, и лишь часть из них может дать начало фибриллам. Вероятно, существует 2 типа олигомеров (А и Б), способных дать начало фибриллам, причем тип Б, скорее всего, образуется в результате реорганизации типа А. Тип Б имеет более стабильную структуру и более устойчив к протеиназе К, чем тип А [69]. Дальнейшее исследование олигомеров типа Б показало, что они представляют собой кольцевые структуры полый цилиндрической формы и имеют размер 9-14 нм [70]. Оба типа олигомеров обладают высокоподвижной С-концевой областью, однако тип Б имеет подвижный N-конец. Кроме того, тип А также содержит подвижные участки в области NAC. В общем, для типа А более характерна структура случайного клубка, в то время как структура типа Б богата бета-листами [71].

Амилоидные фибриллы представляют собой высокоупорядоченные белковые полимеры. На сегодняшний день определено множество различных типов фибрилл альфа-синуклеина. В общих чертах все они имеют схожую морфологию. Чаще всего амилоидные фибриллы состоят из 1 или 2 скрученных или не имеющих скручивания протофиламентов. Ядро фибриллы упорядочено и образовано остатками, относящимися к NAC- и N-концевому домену, которые располагаются в виде 9-12 бета-листов (складка Леви). С-конец и часто часть N-конца мономера альфа-синуклеина в фибрилле не упорядочены. Ядро фибриллы гидрофобно. Бета-слои в фибрилле могут располагаться параллельно или антипараллельно. Разные

штаммы фибрилл в основном различаются деталями строения ядра, степенью скрученности и, как следствие, биохимическими и патологическими свойствами [55,72-74].

В основе превращения белка из мономерной формы в фибриллы лежат процессы первичной и вторичной нуклеации. Первичная нуклеация, также называемая зародышеобразованием, подразумевает процесс изменения структуры неупорядоченной растворимой формы альфа-синуклеина и образование им небольших агрегатов. Данный процесс энергетически не выгоден и является лимитирующей стадией реакции [75]. Кроме того, лишь часть образуемых агрегатов, а именно те, что имеют определенную кросс- β -структуру, может в дальнейшем давать начало фибриллам [76]. Когда образуется достаточное количество таких стабильных агрегатов, называемых ядрами агрегации, вторичная нуклеация начинает преобладать над первичной. В процессе вторичной нуклеации происходит удлинение образуемых агрегатов за счет изменения структуры и встраивания мономера в их конец [77].

Кинетику фибриллизации альфа-синуклеина можно разделить на 3 стадии: 1) лаг-фаза; 2) фаза роста; 3) плато [78]. Во время лаг-фазы преобладают процессы первичной нуклеации, затем следует фаза быстрого роста за счет процессов вторичной нуклеации и фрагментации фибрилл. При истощении мономеров наступает фаза плато, когда в растворе преобладают фибриллы альфа-синуклеина. Во время этой фазы в основном не происходит удлинения фибрилл, однако может идти их созревание и слипание в более крупные агрегаты [75,79].

В общих чертах процесс фибриллизации альфа-синуклеина можно описать следующим образом. В самом начале в растворе присутствуют только мономеры альфа-синуклеина. При определенных условиях неупорядоченные растворимые мономеры альфа-синуклеина меняют свою конформацию на преимущественно бета-слоистую. Такие структуры могут агрегировать с образованием димеров и олигомеров. Затем, по всей

вероятности, в олигомерах происходит структурная перестройка, конечным итогом которой является образование протофибрилл. Протофибриллы, как и фибриллы, могут менять конформацию мономера альфа-синуклеина на патологическую, вследствие чего он встраивается в конец такой растущей фибриллы [80-83]. Показано, что для формирования стабильной фибриллы и ее дальнейшего удлинения протофиламент должен содержать, по крайней мере, 70 мономеров [84].

Для лучшего понимания данной работы также необходимо выделить мутантную форму альфа-синуклеина A53T, которая связана с семейной формой болезни Паркинсона и характерна для начала заболевания. При этой мутации происходит критически важная замена аланина на треонин в N-концевой части белка. Такая замена приводит к исчезновению взаимодействий между доменами альфа-синуклеина, и образуемая альфа-спираль становится более рыхлой. Помимо этого, замена расширяет и стабилизирует бета-слой. В результате альфа-синуклеину становится легче образовывать олигомеры, и фибриллизация ускоряется [85-87].

2.3. Этиология болезни Паркинсона

Накопление патологических форм белка приводит к развитию ряда хронических нейродегенеративных заболеваний с общим названием синуклеинопатии. Особо следует выделить болезнь Паркинсона. Болезнь характеризуется потерей дофаминовых нейронов в компактной части черной субстанции [88] и накоплением нерастворимых цитоплазматических белков во включениях, называемых тельцами Леви и нейритами Леви [89]. Клинически болезнь проявляется нарушением произвольных движений [90] и рядом немоторных проявлений [91]. Эпидемиологические данные свидетельствуют о значительном увеличении распространенности болезни Паркинсона за последние 25 лет, достигнув в 2018 году, по оценкам, более 8,5 миллионов случаев [1,2]. Этиология болезни в настоящее время неясна, вероятно, здесь имеет место множество факторов, которые тем или иным

способом могут модулировать развитие заболевания. Среди факторов риска можно выделить: старческий возраст, мужской пол, проживание в сельской местности, нарушения сна и депрессию [14]. Также, определенным образом оказывают воздействие различные токсины окружающей среды, такие как пестициды, растворители и металлы. К тому же, немаловажна роль генетических факторов, а также их взаимодействие с факторами окружающей среды. Однако, возможно, накопление с возрастом повреждений ДНК, истощение теломер и эпигенетические изменения способствуют воспалению, что в свою очередь усугубляет нейродегенерацию. К тому же ухудшается функция митохондрий. В конечном итоге это приводит к митохондриальной дисфункции и окислительному стрессу, что способствует агрегации альфа-синуклеина. Помимо этого, дефекты репарации ДНК могут нарушать функцию дофаминергической оси, что увеличивает риск болезни Паркинсона [92].

Здесь следует отметить, что болезнь также может проявляться и в более молодом возрасте. Чаще всего это связано с наличием мутаций [93]. Согласно одному из крупнейших meta-GWAS анализу, выделено 90 независимых сигналов риска на уровне всего генома, которые объясняют от 16% до 36% генетической предрасположенности болезни Паркинсона [94].

Среди наследуемых по аутосомно-доминантному типу наиболее распространенными и хорошо изученными вариантами являются мутации в генах *SNCA* (p.A53T) и *LRRK2* (p.G2019S). Относительно часто также встречаются дупликации *SNCA* [95]. Среди аутосомно рецессивных форм наиболее распространёнными являются мутации в гене *PRKN*, которые составляют около 14% случаев болезни Паркинсона с ранним началом. Также относительно частой причиной болезни Паркинсона с ранним началом являются мутации в гене, кодирующем *PINK1* [96]. Наиболее спорным является вклад мутаций *GBA*, так как в данном случае уровень риска различается для разных популяций и распространенность варьируется от 2% до 31% [95,97].

В группе риска по болезни Паркинсона находятся люди, проживающие в сельской местности, что, вероятно, связано с потенциальным контактом с пестицидами [98,99]. Исследования на клетках и животных моделях действительно подтверждают, что пестициды, например, такие как ротенон и паракват, вызывают гибель дофаминовых нейронов. Помимо этого, применение дитиокарбаматов, таких как манеб, вызывает патофизиологические изменения путей, связанных с болезнью Паркинсона [100,101], и приводит к развитию двигательных нарушений [102].

Ионы металлов также могут играть важную роль в развитии болезни Паркинсона. Согласно литературным данным у пациентов с болезнью Паркинсона наблюдают накопление железа [103] и значимое снижение уровня меди и марганца [104] в черной субстанции мозга. Также повышен риск развития паркинсонизма у лиц, подвергшихся воздействию сварочного дыма, содержащего марганец [105]. В экспериментах *in vitro* марганец индуцирует секрецию альфа-синуклеина в экзосомах, что в дальнейшем вызывает воспалительные реакции, а также способствует распространению патологического альфа-синуклеина, что в конечном итоге приводит к нейродегенерации [106]. Мета-анализ для пациентов с болезнью Паркинсона показал значимое снижение уровня цинка в сыворотке у пациентов из азиатских стран, при этом в европейских странах значимых ассоциаций не обнаружено [107].

Несмотря на данные по влиянию многих металлов на развитие болезни Паркинсона, полученные на экспериментальных моделях, на сегодняшний день на людях достаточно подробно изучена только роль железа в этиологии болезни. Так, анализ данных о связи повышения уровня железа и развития болезни Паркинсона с помощью критериев Брэдфорда-Хилла подтвердил причинно-следственную связь [108].

Одним из мест возникновения синуклеинопатий может быть кишечник. Согласно гипотезе Браака, патогены окружающей среды или токсины могут запускать образование патологических форм альфа-синуклеина в кишечнике и

обонятельной луковице, которые затем прионоподобным образом распространяются в ЦНС через блуждающий и обонятельный нервы [109]. В дальнейшем гипотеза Браака получила множество подтверждений. Так, в исследованиях на мышах показано, что при инъекциях лизатов головного мозга людей с болезнью Паркинсона [110] или предварительно сформированных фибрилл [111] в стенку двенадцатиперстной кишки патологичный альфа-синуклеин распространяется по блуждающему нерву далее в мозг. В конечном итоге, после инъекций у мышей происходит значительная потеря дофаминовых нейронов в черной субстанции, а также наблюдаются психологические и двигательные нарушения [112]. С другой стороны, инъекции не всегда могут приводить к развитию патологий ЦНС [113,114], что, вероятно, связано с низкой концентрацией вводимых фибрилл или слабой иннервацией места инъекции.

В пользу гипотезы говорит тот факт, что кишечные симптомы, такие как запор [115-117] и некоторые воспалительные заболевания кишечника [118-120], часто развиваются за несколько лет до появления моторных симптомов у пациентов и значительно повышают риск развития заболевания.

Подтверждает гипотезу Браака также тот факт, что у части пациентов с болезнью Паркинсона обнаруживаются накопления альфа-синуклеина в желудочной и кишечной тканях за 5-8 лет до появления двигательных симптомов [121-123]. Хотя экспрессия альфа-синуклеина в норме увеличивается с возрастом [124], однако количество нейронов, содержащих патологичный альфа-синуклеин, значительно выше у пациентов с болезнью Паркинсона по сравнению со здоровыми [125].

Прогрессирование болезни Паркинсона действительно может стимулироваться пероральным и внутрибрюшинным введением токсинов. Так, одним из факторов риска болезни Паркинсона считается паракват. Данный гербицид дозозависимо ускоряет фибриллизацию альфа-синуклеина, а также увеличивает количество альфа-синуклеина и способствует его агрегации в мозге мышей [126]. Кроме того, паракват вызывает

митохондриальную дисфункцию и окислительный стресс, тем самым способствуя нейродегенерации [127]. При пероральном и внутрибрюшинном введении параквата крысам, в том числе в сочетании с лектинами или манебом, неправильно свернутый альфа-синуклеин обнаруживается в базальных ядрах блуждающего нерва, а через 4 и более недель у животных развиваются симптомы паркинсонизма [128,129]. С другой стороны, при пероральном введении другого пестицида ротенона, который также является митохондриальным токсином, используемым в модели болезни Паркинсона, несмотря на развитие двигательных нарушений, не происходит накопления неправильно свернутого альфа-синуклеина в энтеральной нервной системе, а также отсутствуют нарушения ЖКТ, характерные для болезни Паркинсона [130].

Однако, здесь следует отметить, что у многих пациентов развитие патологий не соответствует системе стадирования Браака. Часто агрегированный альфа-синуклеин в энтеральной нервной системе обнаруживается на поздних стадиях болезни Паркинсона, либо патологии в энтеральной нервной системе вообще не выявляются. Кроме того, животные модели недостаточно воспроизводят болезнь Паркинсона человека, а между имеющимися исследованиями имеются существенные противоречия. В доказательство гипотезы часто приводят исследования, показывающие, что ваготомия и аппендэктомия связаны со сниженным риском развития болезни Паркинсона, однако более детальные исследования не обнаруживают такого эффекта [131].

Роль микробиома в этиологии болезни Паркинсона в настоящее время дискутируема. Согласно систематическому обзору, проведенному Boertien et al., состав микробиоты сильно зависит от продолжительности заболевания, географического происхождения, возраста и пола. Также вклад в гетерогенность вносят отличия в методологии забора материала, его транспортировки и хранения, протоколов секвенирования и обработки данных. Тем не менее, во многих исследованиях при болезни Паркинсона

воспроизводится общее уменьшение разнообразия микробных таксонов, а также увеличение относительной численности микроорганизмов родов *Verrucomicrobiaceae* и *Akkermansia* и уменьшение *Prevotellaceae* [132]. Более значимую информацию дает изучение микробного функционирования. У пациентов с болезнью Паркинсона обнаружены сниженное содержание короткоцепочечных жирных кислот и повышение концентрации эндотоксинов, что коррелирует с ухудшением моторных и немоторных симптомов. Понижение уровня короткоцепочечных жирных кислот также повышает проницаемость кишечника и повышает риск отложения альфа-синуклеина в ЖКТ [133].

Несмотря на указанные противоречия, приведенные примеры достаточно убедительно показывают, что кишечник действительно может играть роль в возникновении болезни Паркинсона, по крайней мере в части случаев. Также следует отметить потенциал воздействия на микробиоту при терапии. Согласно клиническим испытаниям, трансплантация фекальной микробиоты улучшает двигательные симптомы у пациентов с болезнью Паркинсона и повышает доступность леводопы [134-136].

2.4. Влияние шаперонинов на патологическую трансформацию альфа-синуклеина

Различные шапероны, включая те, что принадлежат классу HSP60, способны предотвращать образование фибрилл. В частности, человеческий HSP60 взаимодействует с мономерами или олигомерами альфа-синуклеина, ингибируя процесс фибриллизации. Интересна также мутантная форма шаперонина HSP60 – GW. В данном случае, глицин в области шарнира замещен на триптофан, вследствие чего шаперонин всегда находится в открытой конформации. Такая мутантная форма шаперонина показывает даже большую эффективность, чем человеческий HSP60 дикого типа. Кроме того, исследовалось влияние изолированного апикального домена HSP60 – HSP60 AD(Cys). Для повышения термостабильности в N- и C-концы данного белка

вводили остатки цистеина. Как оказалось, HSP60 AD(Cys) подавляет агрегацию альфа-синуклеина внутри клеток и снижает его цитотоксичность [18].

Бактериальный шаперонин GroEL в настоящее время считается скорее модельным объектом, поэтому его участие в развитии синуклеинопатий подробно не изучалось. Однако известно, что шаперонин дикого типа, а также его изолированный апикальный домен и некоторые мутантные формы связывают альфа-синуклеин, причем для апикального домена существует несколько механизмов связывания. Показано, что данные белки в отсутствие АТФ уменьшают скорость образования амилоидных фибрилл. При этом белки могут увеличивать продолжительность лаг-фазы, либо снижать скорость роста агрегатов [19,20]. В то же время может изменяться морфология образуемых агрегатов. В присутствии мутантных форм GroEL образуются короткие скрученные фибриллы [19]. В присутствии апикального домена GroEL образуются длинные и тонкие фибриллы [20].

То же самое можно сказать и о некоторых шаперонинах группы II. Так, в присутствии эукариотического шаперонина TRiC в реакции фибриллизации альфа-синуклеина *in vitro* образуются в основном аморфные агрегаты. TRiC связывает олигомеры альфа-синуклеина внутри своей полости, хотя они зачастую и не могут быть полностью инкапсулированы в полость шаперонина из-за большого размера. При инкубировании TRiC с клетками нейробластомы (SH-SY5Y) снижается токсичность внеклеточных олигомеров [21].

3. Характеристика прионного белка

3.1. Структура и функции прионного белка

Прионный белок – высококонсервативный небольшой белок. Он существует в двух формах: клеточная изоформа (PrP^C) и инфекционная изоформа (PrP^{Sc}) [137].

PrP^C в основном экспрессируется в центральной и периферической нервных системах и главным образом присутствует на клеточной поверхности нейронов [138]. PrP^C состоит из гибкого неструктурированного N-концевого домена и структурированного C-концевого домена. N-конец содержит область октаповтора, способного связывать ионы металлов Cu²⁺ и Zn²⁺ [139]. C-конец состоит из 3 альфа-спиралей и 2 бета-листов, дисульфидной связи, соединяющей цистеины 179 и 214 и двух N-гликанов на остатках 181 и 197. Белок закреплен на клеточной мембране с помощью GPI-якоря через C-конец [140].

PrP^C синтезируется как белок предшественник с N-концевыми сигнальными пептидами. После транслокации белка в эндоплазматический ретикулум сигнальные пептиды отщепляются, и к C-концу добавляется GPI-якорь, в результате чего образуется зрелый белок [141]. После прохождения через эндоплазматический ретикулум PrP^C перемещается в комплекс Гольджи, где созревают N-гликаны, и белок транспортируется к внеклеточной поверхности клеточной мембраны [142,143]. Зрелый PrP^C может подвергаться протеолитическому расщеплению посредством альфа-расщепления, бета-расщепления и гамма-расщепления. Альфа-расщепление происходит между остатками 110 и 111 и приводит к образованию растворимого фрагмента N1 и закрепленного на мембране фрагмента C1. Считается, что это имеет защитный эффект благодаря устойчивости C1 к неправильному сворачиванию и способности N1 связывать токсичные белковые сборки [144]. Бета-расщепление происходит в области октапептида и часто происходит при патологических состояниях [145]. Гамма-расщепление происходит в области C-конца и приводит к удалению GPI-якоря и высвобождению почти полноразмерного PrP^C во внеклеточное пространство [146].

Функция PrP^C в настоящее время до конца не ясна. Однако полагают, что она может быть связана с гомеостазом миелина [147,148], нейропротекцией [149][150] и межклеточной сигнализацией [151,152]. В

нейронах белок участвует в антероградном и ретроградном транспорте [153,154]. Не исключено, что PrP^C играет важную роль в нейрогенезе [155-157].

3.2. Патологическая трансформация прионного белка

PrP^C может трансформироваться в патологическую изоформу PrP^{Sc}, в которой, в отличие от PrP^C, преобладают бета-слои [158]. Форма PrP^{Sc} частично устойчива к протеиназе К и склонна к автокаталитической конверсии, то есть может менять конформацию клеточной формы на патологическую. Помимо этого, PrP^{Sc} склонна к агрегации с образованием нерастворимых агрегатов [159,160]. Накопление таких агрегатов может вызвать развитие прионных заболеваний, таких как болезнь Крейтцфельдта-Якоба (CJD), синдром Герстманна-Штреусслера-Шейнкера (GSS), фатальная семейная бессонница (FFI) и куру у людей, губчатая энцефалопатия крупного рогатого скота, скрепи у коз и овец и хроническая изнуряющая болезнь у оленей. У людей эти заболевания клинически схожи между собой и проявляются потерей функций мозга и памяти, деменцией, изменением личности, трудностями с движением и губчатой деформацией мозга [3,4].

При этом, все чаще описывают роль прионного белка в развитии других нейродегенеративных заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера и синуклеинопатии.

В пользу пагубной роли PrP^C в развитии болезни Альцгеймера говорит то, что он действует как рецептор для передачи токсического сигнала растворимых форм бета-амилоидного пептида. Когда олигомеры бета-амилоидного пептида связываются с PrP^C на дендритных шипиках нейрона, образуемый комплекс активирует Fyn-киназу, что приводит к гиперфосфорилированию тау-белка, а также фосфорилированию NR2B субъединицы NMDAR [161,162]. Помимо пагубных синаптических изменений, также сообщается о потере аксонов и нейронов под действием PrP^{Sc}. В результате это приводит к нарушению долговременной потенциации

гиппокампа и пространственной памяти, а также к убыли дендритных шипиков [163]. Кроме того, имеются убедительные доказательства, что PrP^C может разбирать амилоидные фибриллы бета-амилоидного пептида с образованием нейротоксичных олигомеров [164].

Участие PrP^C в развитии синуклеинопатий достаточно спорно и имеющиеся на данный момент исследования по этой теме достаточно противоречивы. Однако нельзя исключать, что PrP^C может взаимодействовать с олигомерами альфа-синуклеина, что также приводит к фосфорилированию NMDAR через Fyn-киназу, нарушая тем самым долговременную потенциацию гиппокампа [165].

При расщеплении PrP^{Sc} протеиназой К обычно наблюдается 3 основные полосы, соответствующие негликозилированной, а также моно- и дигликозилированным формам прионного белка. Размер и относительное количество этих трех форм обычно характерны для определенного варианта приона [166].

Хотя в целом структура образующихся фибрилл прионного белка схожа, выделяют несколько их типов. На сегодняшний день с достаточно высоким разрешением доступны CryoEM структуры инфекционных прионных фибрилл, полученных от больных грызунов (адаптированный к грызунам штамм 263K), овец (RML штаммы скреппи) [167] и людей (синдром Герстманна-Штреусслера-Шейнкера) [168]. Помимо этого, понимание структуры прионных фибрилл было получено в результате CryoEM исследований фибрилл рекомбинантного прионного белка человека, полученных из полноразмерного белка, из его фрагментов, а также мутантных форм белков. Как и фибриллы, полученные *ex vivo*, так и полученные *in vitro* имеют архитектуру PIRIBS (parallel in-register intermolecular β -sheet) и общие структурные мотивы, однако в случае рекомбинантных белков ядра, устойчивые к протеазе, были меньшего размера. При этом конформационные детали фибрилл и общая форма их

поперечного сечения существенно различаются [167], что также может быть связано с различиями в аминокислотной последовательности белков [169].

Механизмы, лежащие в основе преобразования PrP^C в PrP^{Sc}, в настоящее время до конца не ясны. Однозначно можно сказать, что амилоидные формы белка могут служить в качестве затравки для преобразования клеточной формы [170]. Одна из гипотез, объясняющих механизм преобразования, гласит, что короткие сегменты PrP^{Sc} взаимодействуют с PrP^C в «стерической молнии», в которой комплементарные боковые цепи аминокислот из двух бета-слоев плотно переплетаются и эффективно стабилизируют растущие фибриллы в основном за счет водородных связей [171,172].

3.3. Этиология прионных заболеваний

Процессы, приводящие к превращению PrP^C в PrP^{Sc}, в настоящее время не известны. Хотя доказано, что прионные заболевания могут передаваться подобно инфекции через употребление пищи или использование медицинских инструментов, зараженных PrP^{Sc}. Однако, на сегодняшний день на долю таких случаев у людей приходится менее 1% заболевших [173,174]. При этом на долю наследственных нарушений приходится 10-15% случаев заболевания. Почти все из них связаны со специфическими мутациями в гене *PRNP*, такими как мутация D178N, сопряженная с генотипом M129 и вызывающая фатальную семейную бессонницу [175,176]. Большинство же случаев (до 85%) составляют спорадические прионные заболевания [177,178]. Свой вклад могут вносить также внешние факторы, такие как окислительный стресс, возраст и воспалительные поражения.

Однозначно можно сказать, что абсолютным требованием для развития прионных заболеваний является экспрессия PrP^C. Так, у мышей, лишенных этого белка, не развивается заболевания после инъекций гомогенатов тканей, инфицированных прионами [179].

Одним из факторов может быть вирусная инфекция. На клеточных моделях было показано, что преобразование эндогенного прионного белка может провоцировать инфицирование нейротропным штаммом вируса гриппа, причем инъекция лизатов инфицированных клеток мышам приводит к развитию прионной болезни [180]. Вероятно, такой эффект связан с вирусной РНК. При фибриллизации прионного белка по методике РМСА (Protein misfolding cyclic amplification) было показано, что, в зависимости от состава, РНК может выступать кофактором в образовании PrP^{Sc} [181].

Помимо этого, может играть роль неисправность механизмов контроля качества белков в клетках, таких как шапероны. Было показано, что уровни шаперонов изменяются у мышей, зараженных прионным белком, и что вектор ответа зависит от штамма прионного белка. Уровни HSP60, HSP70, HSP90, Grp78 и Grp94 были повышены в штаммах ME7 и 87V, тогда как в штаммах 22L и 139A уровни HSP60 были снижены, а повышение уровней HSP70 и HSP90 было менее выраженным [182].

ЖКТ может быть одним из мест возникновения прионной инфекции. Как известно, заражение PrP^{Sc} происходит при поедании инфицированной пищи, после чего PrP^{Sc} распространяется через ПНС в ЦНС, вероятно, посредством ретроградного аксонального транспорта [183,184].

Влияние микробиоты на нейрональные процессы было также показано на мышах со стерильным кишечником. Так, микробная колонизация кишечника таких мышей запускала сигнальные механизмы, влияющие на нейронные цепи, участвующие в моторном контроле и тревожном поведении [185]. Кроме того, вероятно, микробиота связана с развитием внекишечных воспалительных заболеваний, таких как рассеянный склероз. Было установлено, что микробиота кишечника влияет на баланс между про- и противовоспалительными иммунными реакциями при экспериментальном аутоиммунном энцефаломиелите [186].

3.4. Взаимодействие шаперонинов с прионным белком и их влияние на патологическую трансформацию прионного белка

Основная функция шаперонинов в клетке заключается в правильном сворачивании белков и в предотвращении их агрегации [27,28]. Однако в случае прионного белка, шаперонины напрямую участвуют в его неправильном сворачивании [10].

Как показал скрининг библиотеки кДНК клеток HeLa, HSP60 является основным участником взаимодействия с PrP^C. В последующих исследованиях *in vitro* была подтверждена специфичность данного взаимодействия. Показано, что основной сайт взаимодействия находится между 180 и 210 аминокислотами прионного белка в районе альфа-спиралей [22].

На моделях *in vitro* было показано, что шаперонин GroEL может индуцировать образование агрегатов прионного белка из рекомбинантного белка *de novo*. Полученные агрегаты обладали некоторыми свойствами PrP^{Sc}, такими как устойчивость к протеиназе К и высокое содержание бета-слоев. Процесс неправильного сворачивания является АТР-зависимым, помимо этого критически важен сегмент прионного белка, содержащий остатки 23-126. Роль GroEL в данном случае, вероятно, заключается в образовании промежуточного продукта, который далее может идти по пути агрегации [11].

Позднее было показано, что мономерная форма прионного белка связывается с апикальным доменом GroEL, что, предположительно, приводит к изменению его структуры и последующему формированию амилоидных агрегатов. Эти выводы были сделаны на основании данных CryoEM и молекулярного моделирования. При таком взаимодействии происходит разворачивание альфа-спирали прионного белка [12]. Кроме того, образуемые олигомеры прионного белка могут также блокировать функции GroEL, тем самым препятствуя его способности правильно сворачивать другие белки [23,24]. То же самое было показано для эукариотического TRiC.

Данный шаперонин образует прочный комплекс с мономерами, олигомерами и фибриллами прионного белка, причем такое взаимодействие блокирует способность TRiC реактивировать один из его субстратов – спермоспецифическую глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу (GAPDH). Кроме того, взаимодействие шаперонина с мономерной формой прионного белка способствует амилоидной трансформации последнего [25,26]. В конечном итоге указанные процессы могут усугубить развитие данной патологии.

В дополнение к вышесказанному установлено, что инкубация рекомбинантного прионного белка овец в присутствии бактериального комплекса GroE приводит к формированию сферических амилоидных структур, диаметр которых составляет приблизительно 200 нм. Предполагается, что эти мицеллоподобные образования могут преодолевать барьеры желудочно-кишечного тракта, проникать в нервную ткань и индуцировать образование патологических амилоидных структур, вступая во взаимодействие с клеточными формами прионного белка. Было показано, что инкубация рекомбинантного прионного белка овец с лизатами клеток *E.coli* также стимулирует его амилоидную трансформацию. Лизаты клеток *E.coli* с избыточной продукцией GroE вызывают более выраженную амилоидную трансформацию, в то время как штаммы без GroE практически не влияют на прионный белок [26]. Исследования показали, что бактериальные шаперонины, выделяемые при разрушении кишечных бактерий, могут участвовать как в образовании амилоидных структур прионного белка, так и в процессах, обеспечивающих транспорт его агрегатов в нервные ткани посредством формирования мелких прионных частиц.

При исследовании механизмов заражения человека бактериями *Brucella abortus* была обнаружена необычная связь между GroEL-подобными шаперонинами (HSP60) и клеточной формой прионного белка. Прионный белок в значительных количествах экспрессируется на поверхности М-клеток кишечника человека, в то время как HSP60 экспрессируется на поверхности

клеток *Brucella abortus*. Существует гипотеза, что в случае оральной инфекции *Brucella abortus* может проникать в клетки хозяина через М-клетки, используя PrP^C в качестве рецептора, который связывает HSP60 [187,188]. Помимо М-клеток, аналогичный механизм облегчает проникновение *Brucella* в макрофаги, которые также экспрессируют PrP^C [189].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

1. Конструирование плазмидного вектора, содержащего ген альфа-синуклеина с дополнительным стоп кодоном

1.1. Амплификация гена альфа-синуклеина дикого типа методом ПЦР

ДНК альфа-синуклеина дикого типа выделяли из плазмиды pET33b(+), содержащей ген *SNCA* с мутацией Y136Y(TAC→TAT). Получение необходимого фрагмента ДНК проводили с помощью ПЦР, используя протокол Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific, США). Для присоединения дополнительных 2 стоп-кодонов TAA использовали прямой праймер фланкированный 5'-концевым сайтом рестрикции NcoI (5'- ACTCCATGGATGTATTTCATGAAAGGAC-3') и обратный, фланкированный 3'-концевым сайтом рестрикции NheI (5'- AGAGCTAGCTTATTATCAGGCTTCAGGTTTCGTAG-3'). Реакцию ПЦР проводили по следующей программе: 1) 98°C – 30 с; 2) 98°C – 10 с, 57°C – 30 с, 72°C – 30 с, 27 циклов; 3) 72°C – 5 мин 4) 4°C. Полученный фрагмент ДНК очищали, используя набор CleanUp mini (Евроген, Россия). Для контроля образования необходимого продукта пробы анализировали с помощью электрофореза в 2% агарозном геле (Материалы и методы, раздел 1.5).

1.2. Рестрикция вектора

Плазмиду pET28a(+) разрезали по сайтам рестрикции NcoI и NheI. Для этого 20 мкл пробы, содержащей 5 мкл Tango буфера, 5 мкл плазмиды, 8 мкл деионизированной воды и по 1 мкл необходимых рестриктаз инкубировали в течение 1 часа при 37°C. Полученную линейную плазмиду разделяли с помощью электрофореза в 1,5% агарозном геле и выделяли, используя набор CleanUp mini.

1.3. Мутагенез гена

Для получения альфа-синуклеина A53T с дополнительными стоп-кодонами, был выбран метод сайт-направленного мутагенеза, который

проводили с помощью ПЦР. В качестве прямого праймера использовали PhM_SynStop_F 5'-ТААТААТГАГАТССГГСТГСТААС-3', в качестве обратного PhM_SynStop_R_5'-GGCTTCAGGTTCA TAGTCTTG-3'. Используемые специфические праймеры, содержащие необходимую замену, были фосфорилированы с 5'-концов путем инкубирования с Т4 полинуклеотидкиназой. В качестве матрицы для ПЦР использовали плазмиду рЕТ33b(+), содержащую ген *SNCA* с мутациями А53Т(ГСА→АСА) и Y136Y(ТАС→ТАТ). Сайт-направленный мутагенез проводили в объеме 50 мкл с использованием набора Phusion Site-directed Mutagenesis Kit (Thermo Scientific, США) согласно рекомендациям производителя. Реакцию ПЦР проводили по следующей программе: 1) 98°C – 30 с; 2) 98°C - 10 с, 57,4°C – 30 с, 72°C – 2,5 мин. 5 циклов; 3) 98°C - 10 с, 61,4°C – 30 с, 72°C – 2,5 мин. 19 циклов; 4) 72°C – 5 мин. Для контроля образования гена альфа-синуклеина с необходимой мутацией 5 мкл смеси фрагментов ДНК после амплификации разделяли в 1,5% агарозном геле (Материалы и методы, раздел 1.5).

1.4. Лигирование

Полученный в результате ПЦР амплифицированный фрагмент ДНК альфа-синуклеина дикого типа клонировали в плазмиду рЕТ28a(+) между сайтами рестрикции NcoI и NheI путем инкубации линейной плазмиды с фрагментом ДНК. Реакцию проводили в объеме 10 мкл: 4 мкл рЕТ28a(+), 1 мкл ПЦР-продукта, 1 мкл Т4 ДНК-лигазы, 1 мкл лигирующего буфера, 3 мкл деионизированной воды. Лигазную смесь инкубировали в течение ночи при 4°C, после чего для остановки реакции пробы перемещали на -20°C.

В случае альфа-синуклеина А53Т, 5 мкл ПЦР-продукта инкубировали с 1 мкл DpnI в течение 15 мин при 37°C. Затем, полученную линейную плазмиду циклизовали с помощью лигирования. Реакцию проводили в объеме 9,5 мкл: 2 мкл ПЦР-продукта, 0,5 мкл Т4 ДНК-лигазы, 2 мкл лигирующего буфера, 5,5 мкл деионизированной воды. Лигазную смесь

инкубировали в течение 5 мин при 25°C, после чего для остановки реакции пробы перемещали на -20°C.

1.5. Электрофорез ДНК в агарозном геле

Фрагменты ДНК, полученные на разных стадиях работы, анализировали методом электрофореза в агарозном геле. Для анализа использовали 1-2% агарозный гель, в зависимости от длины полученного фрагмента ДНК. Гель готовили на трис-ацетатном (ТАЕ) буфере (0,04 М трис-ацетат, 1 мМ ЭДТА, рН 8,0), содержащем 0,5 мкг/мл бромистого этидия для визуализации ДНК. В анализируемые пробы добавляли 6-кратный краситель Loading Dye (Fermentas) до 1-кратной концентрации, для визуализации движения ДНК в геле во время электрофореза. В качестве стандартов длин фрагментов использовали маркеры 1 Kb DNA Ladder (Fermentas). Электрофоретическое разделение проводили в ТАЕ буфере при напряжении 80 В. Фрагменты ДНК в геле детектировали с помощью ультрафиолетового освещения на трансиллюминаторе UVT1 (biokom).

1.6. Трансформация бактериальных клеток

Для наращивания плазмиды использовали компетентные клетки *E.coli* штамма JM109, для наработки рекомбинантного альфа-синуклеина использовали компетентные клетки *E.coli* штамма BL21(DE3). Для трансформации 100 мкл замороженных клеток размораживали на льду, добавляли к ним по 5-20 нг плазмидной ДНК и инкубировали на льду 30 мин. Затем проводили тепловой шок. Для этого суспензии инкубировали в течение 1,5 мин при 42°C, после чего сразу помещали в лед. Затем к суспензиям добавляли 0,5 мл среды LB (Luria Broth, Sigma) без антибиотика и инкубировали в течение 40 мин при 37°C и перемешивании. Суспензии объемов 300-600 мкл, содержащие трансформированные клетки, высевали на чашки Петри, покрытые твердой средой LB-агар (1,5% агар, приготовленный

на среде LB), содержащей 25 мкг/мл канамицина. Чашки инкубировали при 37°C в течение 14-18 часов.

2. Экспрессия, выделение и очистка белков

2.1. Экспрессия, выделение и очистка альфа-синуклеина

Альфа-синуклеин дикого типа экспрессировали с использованием бактериальной культуры *E.coli* BL21 (DE3), трансформированной плазмидой pET33b(+), содержащей ген *SNCA* с мутацией Y136Y(TAC→TAT). Альфа-синуклеин A53T экспрессировали с использованием бактериальной культуры *E.coli* BL21 (DE3), трансформированной плазмидой pET28a(+), содержащей ген *SNCA* с мутацией Y136Y(TAC→TAT) и с мутацией A53T. Нарработку белков, а также их выделение и очистку проводили сходным образом. Бактериальную среду LB, содержащую 50 мкг/мл канамицина, заражали замороженной культурой и растили при 37°C и перемешивании 200 об/мин в течение ночи. Далее 10 мл ночной культуры помещали в колбы с 350 мл среды LB, содержащей 50 мкг/мл канамицина, и инкубировали в тех же условиях пока оптическая плотность при 600 нм не достигнет 0,6 о.е. Для индукции экспрессии белка добавляли изопропил-D-тиогаляктопиранозид (IPTG) до конечной концентрации 1 mM и культивировали клетки в течение 4-5 часов при 37°C и перемешивании 200 об/мин.

После наработки белка, клеточную массу центрифугировали в течение 20 мин при 5000g и 4°C. Полученный осадок суспендировали в 30 mM калий-фосфатном буфере (pH 7,5) и подвергали ультразвуковой обработке (Branson Ultrasonics Sonifier™ S-450) (3 импульса по 20 сек, амплитуда 20%). Полученную суспензию центрифугировали при 15000g и 4°C в течение 20 мин. Очистку белков проводили методом кислотного осаждения примесных белков. Для этого pH супернатанта доводили до 2,8 добавлением 9% HCl. Затем суспензию снова центрифугировали при 15000g и 4°C в течение 5 мин. Далее pH супернатанта доводили до 7-7,5 добавлением 1 M калий-фосфата (pH 11,0). Затем белок высаливали сухим (NH₄)₂SO₄ до 40% насыщения и

хранили при 4°C. Очищенный препарат переводили в деионизованную воду с помощью диализа (2 смены), лиофилизировали и хранили при -20°C. Перед использованием белки растворяли в необходимом буфере и центрифугировали 10 мин при 15000g.

2.2. Экспрессия, выделение и очистка овечьего прионного белка

Овечий прионный белок экспрессировали с использованием замороженной бактериальной культурой BL21(DE3) *E.coli* с плазмидой pET22b+, содержащей ген этого белка. Бактериальную среду LB, содержащую 100 мкг/мл ампициллина, заражали замороженной культурой и растили при 37°C и перемешивании 200 об/мин в течение ночи. Далее 15 мл ночной культуры добавляли в 500 мл среды LB, содержащей 100 мкг/мл ампициллина, и растили клетки пока оптическая плотность при 600 нм не достигнет 0,7 о.е. Затем индуцировали экспрессию гена добавлением IPTG до конечной концентрации 1 mM и инкубировали клетки при 37°C и перемешивании 200 об/мин в течение ночи. Затем культуру клеток центрифугировали 20 мин при 5000g и 4°C. Осадок бактериальных клеток отмывали 50 mM Трис-HCl буфером, pH 8,0 от среды.

Для выделения и очистки прионного белка клетки инкубировали в лизирующем буфере (50 mM Трис-HCl (pH 8,0), 10 mM ЭДТА, 0,5 мг/мл лизоцима, ингибитор протеаз (Sigma), 0,1% Тритон X100) при 37°C и перемешивании 200 об/мин, а затем подвергали ультразвуковой обработке (Branson Ultrasonics Sonifier™ S-450): 10 импульсов по 10 секунд при амплитуде 30%. Лизаты центрифугировали при 5000g при 4°C в течение 15 мин. Осадок, содержащий белок, промывали буфером и солубилизировали в 50 mM Трис-HCl буфере (pH 8,0) с 0,5 M NaCl и 6 M GuHCl (гуанидингидрохлорид) в течение ночи при 4°C, а затем центрифугировали 20 мин при 8000g.

Для дальнейшей очистки препарата использовали метод аффинной хроматографии на ионах никеля на колонке, заполненной носителем

Chelating Sepharose FF (GE Healthcare), с использованием хроматографической системы Äkta Prime с программным обеспечением Unicorn Control (Amersham Biosciences, Piscataway, США). Хроматографию проводили со скоростью 0,5-2 мл/мин. Фракции собирали в объеме 3-5 мл. Перед нанесением препарата, колонку, заполненную носителем, насыщали 0,2 М раствором $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ и промывали 20 мМ ацетатным буфером (pH 4,0). Затем, колонку уравнивали 20 мМ Трис-HCl буфером (pH 7,4), содержащим 8 М мочевины и 0,5 М NaCl, после чего препарат, содержащий прионный белок, наносили на колонку. После промывания колонки буфером до выхода оптической плотности на постоянный уровень осуществляли этап ренатурации белка, путем промывания колонки буфером, содержащим 20 мМ Трис-HCl (pH 7,4), 20 мМ имидазол и 0,3 М NaCl. Затем, прионный белок элюировали с колонки промыванием 300 мМ имидазольным буфером (pH 7,4), обладающим большей аффинностью к ионам никеля.

Очищенный препарат прионного белка переводили в 15 мМ ацетат-аммонийный буфер (pH 5,0) с помощью диализа (3 смены), затем лиофилизировали его и хранили при -20°C . Перед использованием белок растворяли в 20 мМ натрий-ацетатном буфере (pH 4,0), центрифугировали 10 мин при 15000g и переводили в нужный буфер на колонке PD MidiTrap с носителем Sephadex G-25 (GE Healthcare).

2.3. Экспрессия, выделение и очистка шаперонина GroEL и его кошаперонина GroES

Белки экспрессировали с использованием замороженной бактериальной культуры W3110 *E.coli* с плазмидой pOF39. Бактериальную среду LB, содержащую 50 мкг/мл ампициллина, заражали замороженной культурой и растили в течение ночи при 37°C и перемешивании 200 об/мин. Далее 5 мл ночной культуры добавляли в 200 мл среды LB, содержащей 50 мкг/мл канамицина, и культивировали при 37°C и перемешивании 200

об/мин в течение ночи, центрифугировали 20 мин при 5000g и 4°C и отмывали осадок 50 мМ Трис-HCl буфера (pH 8,0).

Для выделения и очистки белков осадок суспендировали в лизирующем буфере (100 мМ Трис-HCl (pH 8,1), 10 мМ ДТТ, 0,1 мМ ЭДТА и 0,2 мг/мл ингибиторов протеаз) и подвергали ультразвуковой обработке (Branson Ultrasonics Sonifier™ S-450): 2 импульса по 40 секунд при амплитуде 50%. Полученную суспензию центрифугировали в течение 30 мин при 15000g и 4°C. Супернатант высаливали до 30% насыщения сухим (NH₄)₂SO₄ и центрифугировали в тех же условиях. Полученный супернатант высаливали до 80% насыщения сухим (NH₄)₂SO₄ и снова центрифугировали при тех же условиях. Далее осадок растворяли в 50 мМ Трис-HCl буфере (pH 7,4), содержащем 2 мМ ДТТ и 0,1 мМ ЭДТА, и диализовали в течение ночи против этого же буфера.

После диализа смесь белков наносили на колонку с DEAE-Sepharose fast flow (Sigma), уравновешенную 50 мМ Трис-HCl буфером (pH 7,4), с 2 мМ ДТТ и 0,1 мМ ЭДТА. 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 6-8 мл. Далее отдельно объединяли фракции, содержащие GroEL и GroES.

Полученный препарат GroEL диализовали в течение ночи против 50 мМ Трис-HCl буфера (pH 7,4), с 2 мМ ДТТ и 0,1 мМ ЭДТА, а затем повторно очищали на DEAE-Sepharose fast flow по указанной выше методике. Собирали фракции в объеме 6 мл. Фракции, содержащие очищенный GroEL, объединяли.

Полученные препараты GroEL и GroES дополнительно очищали с помощью термообработки. Для этого препарат GroES после диализа в течение ночи против 50 мМ Трис-HCl буфера (pH 7,4), с 2 мМ ДТТ и 0,1 мМ ЭДТА, после чего последовательно нагревали в круглодонной колбе в термостате сначала до 60°C, а затем до 80°C. После каждого нагрева раствор,

содержащий GroES и денатурированные примесные белки, центрифугировали в течение 10 мин при 15000g и 4°C. Препарат GroEL сначала нагревали на водяной бане в течение 2 мин при 58°C, затем добавляли Mg^{2+} -АТФ и грели еще 20 мин. Затем центрифугировали в течение 10 мин при 15000g. В конце очищенные препараты GroES и GroEL концентрировали в концентраторах с порами в 50 кДа и 100 кДа, соответственно. Белки хранили в растворе, содержащем 50 мМ Трис-НCl (pH 7,4) при +4°C.

2.4. Экспрессия, выделение и очистка вирусных шаперонинов

Вирусные шаперонины EL и OBP получали по сходной методике.

Гены белков были экспрессированы в клетках BL21(DE3) *E.coli*. Для возобновления культуры бактериальную среду LB, содержащую 100 мкг/мл ампициллина, заражали замороженной культурой и растили в течение ночи при 37°C и перемешивании 200 об/мин. Далее брали 400 мл среды LB, содержащей 100 мкг/мл ампициллина, и добавляли ночную культуру до оптической плотности 0,1 при 600 нм. Растили культуру клеток до оптической плотности 0,6. Затем охлаждали до комнатной температуры и индуцировали экспрессию белка добавлением IPTG до конечной концентрации 1 мМ. После продукции в течение ночи при 20°C и перемешивании 200 об/мин культуру центрифугировали 20 мин при 5000g и 4°C.

Для выделения рекомбинантных белков клеточный осадок ресуспендировали в 10 мл 50 мМ Трис-НCl буфера (pH 7,5), обрабатывали ультразвуком (8 импульсов по 10 с при амплитуде 30%) с использованием ультразвука (Branson Ultrasonics Sonifier™ S-450) и центрифугировали при 8000 об/мин (Eppendorf, Германия) в течение 10 мин при 4°C для удаления клеточных стенок. Нуклеиновые кислоты осаждали добавлением к супернатанту 1/10 объема 30% (масса/объем) раствора сульфата стрептомицина с последующим центрифугированием в тех же условиях.

Рекомбинантный белок осаждали из супернатанта добавлением насыщенного раствора сульфата аммония до конечной концентрации 38% и 42% (масса/объем). Образовавшийся осадок белка осаждали центрифугированием, как описано выше, после чего растворяли его в 10 мл 50 мМ Трис-НСl буфера (pH 7,5), содержавшего 100 мМ NaCl, и наносили на колонку с Q-Sepharose (Bio-Rad, США), уравновешенную тем же буфером. После промывания колонки 10 объемами буфера белок элюировали линейным градиентом от 100 до 500 мМ NaCl в 50 мМ Трис-НСl буфере (pH 7,5), и анализировали электрофорезом в денатурирующих условиях. Фракции, содержавшие чистый белок, концентрировали с помощью Amicon Ultra-15 с пропускной способностью 100 кДа (Millipore, США). Концентрацию EL и ОВР определяли спектрофотометрически при 280 нм с использованием расчетного коэффициента молярной экстинкции $35\,870\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ и $50\,435\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$, соответственно.

3. Определение функциональной активности шаперонинов

3.1. АТРазная активность

АТРазную активность шаперонинов определяли по количественному содержанию неорганического фосфата, высвобождающегося из АТР с помощью колориметрического анализа с использованием малахитового зеленого по ранее предложенному методу [190] с некоторыми изменениями. Для приготовления раствора малахитового зеленого смешивали 42 мл бидистиллированной воды, 8 мл концентрированной H_2SO_4 и 0,6 г малахитового зеленого. В день эксперимента готовили красящий раствор путем смешивания 0,5 мл 7,5% раствора молибдата аммония, 2 мл раствора малахитового зеленого и 40 мкл 11% Tween-20. Калибровочную кривую строили по KH_2PO_4 . Концентрации фосфата для калибровки были взяты в соответствии с таблицей 1. Для определения концентрации фосфата смешивали 1 часть красящего раствора и 4 части пробы, инкубировали 10 мин при комнатной температуре и измеряли абсорбцию при 630 нм.

Таблица 1. Построение калибровочной кривой для определения концентрации фосфата

1 мМ KH_2PO_4 , мкл	0	5	0	15	20
H_2O , мкл	1000	995	990	985	980
Итоговая концентрация фосфата, мкМ	0	5	10	15	20

Для определения АТРазной активности шаперонин с концентрацией 0,5 мг/мл инкубировали с 2 мМ АТР в 50 мМ Трис-НСl буфере (рН 7,5), содержащем 100 мМ КСl и 10 мМ MgCl_2 , в течение 30 мин при 37°C или при 25°C и постоянном перемешивании. Во время инкубации из реакционной смеси отбирали аликвоты и останавливали реакцию, смешивая их с 3 частями бидистиллированной воды и 1 частью красящего раствора. Смесь инкубировали 10 мин и измеряли абсорбцию при 630 нм. За единицу АТРазной активности принимали количество высвобождаемого неорганического фосфата в нмоль на мг шаперонина в минуту.

3.2. Реактивация лактатдегидрогеназы (ЛДГ)

Функциональная активность GroE проверяли по его способности сворачивать субстрат. Для этой цели нами был выбран фермент лактатдегидрогеназа (ЛДГ). Перед началом эксперимента определяли активность ЛДГ. Для опытов по реактивации 30 мкМ ЛДГ денатурировали инкубацией с 4М гуанидингидрохлоридом (GuHCl) в течение 10 мин при 25°C в 10 мМ калий-фосфатном буфере (рН 7,4), содержащем 1 мМ ЭДТА и 2 мМ меркаптоэтанола до полного исчезновения ферментативной активности. Для реактивации фермента пробу разбавляли в 100 раз 10 мМ калий-фосфатным буфером (рН 7,4), содержащим 1 мМ ЭДТА, 5 мМ меркаптоэтанола и 1,5 мМ NAD^+ . Пробу разделили на 2 части, одну использовали в качестве контроля, к другой добавляли шаперонины в соотношении ЛДГ:GroEL:GroES = 1:1:2, а также 2 мМ АТР и 5 мМ MgCl_2 .

Конечные концентрации ЛДГ и GuHCl в обеих пробах составляли 0,3 мкМ и 0,04 М соответственно. Обе пробы инкубировали при 25°C и постоянном перемешивании, во время реактивации отбирали аликвоты и измеряли активность ЛДГ. Определение активности фермента проводили спектрофотометрически на приборе Shimadzu UV-1601 UV/VIS Visible при 25°C, измеряя скорость уменьшения количества NADH при 340 нм в ходе реакции восстановления пирувата. Проба объемом 1 мл содержала 2 мкг ЛДГ, 0,2 мМ NADH и 0,76 мМ пирувата в 10 мМ калий-фосфатном буфере (pH 7,4), с 1 мМ ЭДТА и 2 мМ меркаптоэтанола. За единицу ферментативной активности принимали количество катализированного NADH в микромолях за мину в расчете на 1 мг белка. По полученным данным строили график активности ЛДГ от исходной (в процентах) в зависимости от времени реактивации.

3.3. Анализ агрегации эндолизина

Шапероноподобную активность вирусных шаперонинов определяли по их влиянию на агрегацию эндолизина при 45°C, используя метод динамического рассеяния света (ДРС), на приборе Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Великобритания) [43]. Для этого 3 мкМ раствора эндолизина в 50 мМ Трис-HCl буфере (pH 7,5), содержавшем 10 мМ MgCl_2 и 100 мМ KCl, инкубировали с шаперонинами в разных соотношениях (эндолизин:шаперонин) в присутствии 1,2 мМ АТФ в течение 1 часа при 45°C, непрерывно измеряя гидродинамические радиусы частиц. Молярное соотношение эндолизина к шаперонину рассчитывали для мономера и олигомера, соответственно.

4. Взаимодействие шаперонинов с разными формами альфа-синуклеина

4.1. Получение разных форм альфа-синуклеина

Для получения мономеров альфа-синуклеина лиофилизированный белок растворяли в PBS (10 мМ Na_2HPO_4 , 1,76 мМ KH_2PO_4 , 137 мМ NaCl и 2,7 мМ KCl) буфере (pH 7,5) и центрифугировали 10 мин при 25°C и 15000g.

Для получения амилоидных фибрилл 70 мкМ мономеров альфа-синуклеина дикого типа в PBS буфере (pH 7,5) инкубировали при 37°C и 600 об/мин в течение 4-5 дней.

В качестве промежуточной формы были выбраны амилоидные семена. Для их получения 70 мкМ мономеров альфа-синуклеина дикого типа в PBS (pH 7,5), содержащем 0,015% SDS, перемешивали на вортексе 10 сек. Затем циклически инкубировали при 42°C: 1 мин 400 об/мин, 1 мин без перемешивания. Цикл повторяли 30-35 раз. Для получения кинетических кривых пробы инкубировали в 96-луночном планшете в CLARIOstar microplate reader (BMG Labtech, Ortenberg, Germany) в присутствии 0,7 М тиофлавина Т (ThT). Для характеристики получаемых семян методом электронной микроскопии альфа-синуклеин дикого типа растили в 50 мМ Трис-HCl буфере (pH 7,5), содержащем 100 мМ NaCl, 50 мМ KCl и 0,015% SDS.

4.2. Твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА)

Растворы с 1 мкг шаперонинов или разных форм альфа-синуклеина дикого типа, полученных по методике, описанной в «Материалах и методах», раздел 4.1, иммобилизовали в лунках 96-луночного планшета в буфере PBS (pH 7,5). Инкубацию проводили при 25°C в течение 30 мин с постоянным перемешиванием, после чего для удаления несвязавшихся молекул белка лунки промывали буфером PBS. Далее к сорбированному антигену добавляли белок-партнер соотношении 1:1 и инкубировали смесь в лунках при 25°C в течение 30 мин с постоянным перемешиванием, после чего промывали лунки буфером PBST (PBS с 0,1% Tween-20). Затем пробы

инкубировали с первичными антителами против альфа-синуклеина (LB509, abcam, USA, 0,5 мкг/мл в буфере PBST, pH 7,4) или сывороткой, содержащей антитела против EL или OBP (разведение 1:2000 в буфере PBST, pH 7,4), в течение часа при 25°C и перемешивании, после чего промывали лунки буфером PBST для удаления несвязавшихся молекул первичных антител. Сыворотку против OBP и EL получали, как описано ранее [43]. Затем пробы инкубировали со вторичными антителами (поликлональные антитела, козы, anti-mouse, 0,5 мкг/мл в буфере PBST, pH 7,4, Thermo Fisher Scientific, США), связанными с пероксидазой хрена, в тех же условиях, после чего снова промывали лунки буфером PBST. Далее в лунки добавляли субстратную смесь для окрашивания (5 мл 0,1 М цитратный буфер (pH 4,5), 0,1 мл спиртового раствора *o*-фенилендиамина 34 мг/мл, 5 мкл 30% перекиси водорода). Через 3 мин инкубации при 25°C и постоянном перемешивании в лунки добавляли 1н H₂SO₄ для остановки пероксидазной реакции. Оптическую плотность раствора определяли в лунках при $\lambda = 492$ нм с помощью планшетного спектрофотометра State Fax 2100 (Thermo Fisher Scientific, США).

5. Изучение влияния шаперонинов на агрегацию амилоидных белков при их инкубации *in vitro*

5.1. Фибриллизация альфа-синуклеина

Мономеры альфа-синуклеина дикого типа или его мутантной формы A53T инкубировали при 37°C и 600 об/мин в 50 мМ Трис-HCl буфере (pH 7,4), содержащем 100 мМ NaCl, 50 мМ KCl, 10 мМ MgCl₂. В ряде экспериментов пробы инкубировали в присутствии 1% SDS.

Шаперонин-зависимую фибриллизацию проводили при постоянной концентрации альфа-синуклеина (50 мкМ). Шаперонины добавляли в различных микромолярных соотношениях. Для контроля инкубировали шаперонин в тех же условиях, но без добавления альфа-синуклеина. Пробы инкубировали в присутствии или в отсутствие 10 мМ АТФ.

При инкубации в стеклянных пробирках, пробы объемом 200-300 мкл инкубировали в течение 1-4 суток. За образованием агрегатов следили по увеличению интенсивности флуоресценции ThT при длине волны 482. В процессе фибриллизации через определенные промежутки времени из реакционной системы отбирали аликвоты по 5 мкл и разводили их в 95 мкл 40 мкМ раствора ThT в 50 мМ Трис-HCl (pH 7,4). После инкубации красителя с белком в течение 15 мин при 25°C определяли флуоресценцию ThT (возбуждение 435 нм, эмиссия 482 нм), с помощью планшетного спектрофлуориметра VICTOR X5 (PerkinElmer, США).

При инкубации в планшете, пробы объемом 100 мкл помещали в 96-луночный планшет (Greiner, Kremsmuenster, Austria, Non-Binding, μ Clear®, black), запечатывали PCR temperature resistant sealing film (FCombio, China) и загружали в CLARIOstar microplate reader (BMG Labtech, Ortenberg, Germany). Реакцию проводили в присутствии ThT в молярном соотношении 1:10 (альфа-синуклеин:ThT). Изменение флуоресценции ThT контролировали через дно планшета (возбуждение 435 нм, эмиссия 482 нм) с интервалами 30 мин. Для каждой пробы брали три независимых повтора.

5.2. Фибриллизация прионного белка

Прионный белок инкубировали совместно с бактериальными шаперонами в молярном соотношении 1:0,1 или 1:0,2 (прионный белок:шаперонин) в течение 4-27 часов при 25°C и 570 об/мин. Конечная концентрация прионного белка составляла 10 мкМ. Реакцию проводили в 50 мМ калий-фосфатном буфере (pH 7,4), содержащем 50 мМ KCl, 10 мМ MgCl₂ и 0,03% NaN₃. В качестве контроля инкубировали отдельно шаперонины и прионный белок. Также реакцию проводили в присутствии и в отсутствие 10 мМ АТР. Амилоидные фибриллы были получены также в результате спонтанной фибриллизации мономеров прионного белка в других условиях: 88 мкМ прионного белка инкубировали в 100 мМ Na-ацетатном буфере (pH 4,0), содержащем 1 М GuHCl и 0,03% NaN₃ при 37°C и 570 об/мин.

Для контроля образования амилоидов в процессе реакции из реакционной смеси отбирали аликвоты по 20 мкл и добавляли к ним по 80 мкл 125 мкМ раствора ThT. После инкубации красителя с белком в течение 10 мин при 20°C определяли спектры эмиссии в кварцевой кювете в диапазоне 450-600 нм (возбуждение при 435 нм), используя спектрофотометр FluoroMax®-3 (Horiba Jobin Yvon, France). Также регистрировали флуоресценцию при фиксированной длине волны (возбуждение 435 нм, эмиссия 482 нм). Для этого аликвоты по 5 мкл разводили в 95 мкл 30 мкМ раствора ThT и инкубировали 15 мин в 96-луночной планшете (Greiner, FLUOTRAC, Germany), а затем измеряли флуоресценцию с помощью планшетного спектрофлуориметра VICTOR X5 (PerkinElmer, США).

5.3. Вычисление продолжительности лаг-фаз и скорости роста фибрилл

Для расчета времени лаг-фаз и скорости роста фибрилл была использована кинетическая модель и алгоритм расчета, подробно описанные ранее [78]. Процедуры оценки параметров были выполнены в Excel. Для согласования данных флуоресценции с данными по времени использовали уравнение сигмоидальной кривой:

$$Y = A2 + \frac{A1 - A2}{1 + e^{\frac{t-t_0}{\tau}}}$$

Где A1 и A2 – соответствуют минимальному и максимальному значениям флуоресценции, t₀ – точка перегиба, τ – временная константа.

Отсюда: время лаг-фазы = t₀ – 2τ

5.4. Измерение мутности растворов (турбидиметрический метод)

За образованием агрегатов альфа-синуклеина под действием GroE следили по увеличению мутности растворов по поглощению при длине волны 320 нм. Во время инкубации в кварцевую кювету на 50 мкл с длиной пути 3 мм вносили по 50-100 мкл суспензии белковых агрегатов и

детектировали значение поглощения раствора относительно соответствующего буферного раствора.

5.5. Оценка токсичности образуемых агрегатов для клеток методом

МТТ-теста

Линия клеток нейробластомы человека SH-SY5Y была получена из Американской коллекции типовых культур (Манассас, Вирджиния, США). Клетки выращивали на среде DMEM/F12 («ПанЭко», Россия) с добавлением 10% (об./об.) фетальной бычьей сыворотки («Hyclon», США), 1% (об./об.), L-глутамакса (GlutaMAX («Thermo Fisher Scientific», США), пенициллина 100 ед/мл и стрептомицина 100 мкг/мл («ПанЭко», Россия) при 37°C, 5% CO₂ во влажной атмосфере. Использовали клетки на пассажах 25–28.

Для изучения жизнеспособности клеток SH-SY5Y и HEK293T в присутствии внеклеточных агрегатов, $1,5 \cdot 10^4$ клеток на лунку высевали на 96-луночные планшеты для культивирования клеток (Biofil, Китай). После 24-часовой инкубации среду заменяли исследуемыми образцами мономеров/фибрилл альфа-синуклеина, разбавленными полной средой DMEM/F12 до конечной концентрации 0,8 мкМ или прионного белка в концентрации 20 мкМ. Клетки, экспонированные полной средой DMEM/F12, также использовали в качестве контролей. Через 24 часа инкубации жизнеспособность клеток оценивали по восстановлению тетразолиевого красителя МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромид) до формазана, которое измеряли спектрофотометрически. Клеточную среду заменяли на DMEM/F12 с тетразолиевым красителем (до конечной концентрации 0,375 мг/мл) и через 4 часа инкубации кристаллы формазана растворяли в 100 мкл ДМСО. Через 15 мин инкубации при 37°C регистрировали поглощение при 570 нм с помощью микропланшетного ридера VersaMax (США). Использовалась референтная длина волны 630 нм. Экспериментальные процедуры проводили в четырехкратной повторности.

Жизнеспособность клеток определяли по отношению поглощения тестовых образцов к поглощению контроля.

6. Исследования на эукариотических клетках, трансфицированных плазмидами, содержащими гены шаперонина ОВР и альфа-синуклеина A53T

6.1. Конструирование плазмид для трансфекции HEK293T и SH-SY5Y

Ген 246, кодирующий шаперонин ОВР, был амплифицирован методом ПЦР с плазмиды, ранее сконструированной для экспрессии этого гена в клетках *E.coli* [47], в качестве матрицы ДНК. ПЦР проводили с использованием ДНК-полимеразы Phusion High-Fidelity (Thermo Scientific, США) с прямым праймером 5'-TTATGCTAGCACCATGTCTTCCATGTТААСТGA-3' и обратным праймером 5'-СТGAGCAАТААСТAGCAT-3'. Ампликон 246 был подвергнут рестрикции и клонирован по сайтам NheI и XhoI в вектор pcDNA3.1 Hygro(+) (Invitrogen, США) для получения плазмиды, названной pcDNA-ОВР.

Вектор трансфекции для экспрессии мутантной формы человеческого альфа-синуклеина A53T в эукариотических клеточных линиях, названный pcDNA-Syn_mut, был получен ранее [190]. Для конструирования плазмиды, ген человеческого альфа-синуклеина дикого типа (NCBI Reference Sequence: NM_000345.3) вставляли в вектор pcDNA 3.1 Hygro(+). Далее, для получения мутации A53T, проводили сайт-направленным мутагенезом с использованием набора Phusion site-directed mutagenesis kit (Thermo Scientific, США). Полученный ген вставляли в полилинкерную область pcDNA 3.1 Hygro (+) между сайтами рестрикции BamHI и NotI с добавлением консенсусной последовательности Козака в 5'-области сайта начала трансляции. Полученный вектор, несет вышеуказанный ген под контролем конститутивного промотора CMV и ген устойчивости к гигромицину под контролем конститутивного промотора SV40.

6.2. Клеточная культура

Линии клеток нейробластомы SH-SY5Y и эмбриональной почки человека HEK293T были получены из Американской коллекции типовых культур (Манассас, США). Клеточные линии культивировали в среде DMEM/F-12 (Панэко, Россия) с добавлением 10 % эмбриональной бычьей сыворотки (HyClone, США), 50 ед./мл пенициллина, 50 мкг/мл стрептомицина (Панэко, Россия) и L-глутамина (Панэко, Россия). Культивирование проводили в стандартных условиях: увлажненная атмосфера с 5% CO₂ при 37°C. Субкультивирование осуществляли при 80–90% слияния. Клетки трансфицировали плазмидами pcDNA-OBP и/или pcDNA-syn_mut с использованием трансфектантов Lipofectamine 3000 (Invitrogen, США) или TransIT-X2 (Mirus, США) в соответствии с протоколами производителя.

6.3. Экспрессия белка в клетках HEK293T и иммуноблоттинг

Клетки HEK293T трансфицировали либо одной плазмидой, либо одновременно двумя плазмидами (pcDNA-OBP и/или pcDNA-syn_mut) с использованием трансфектанта TransIT-X2 (Mirus, США) в соответствии с протоколом производителя. Для подтверждения продукции альфа-синуклеина и шаперонина после 2 дней инкубации трансфицированные клетки лизировали в буфере PBS (pH 7,4), содержащем 1% Тритон X-100, и фракционировали центрифугированием при 14000g (Eppendorf, США) в течение 10 мин при 4°C. Клеточный осадок промывали холодным буфером PBS и центрифугировали при тех же условиях, что и выше. После удаления супернатанта клеточный осадок ресуспендировали в 200–300 мкл 1x буфера для образцов и обрабатывали ультразвуком (Branson Digital Sonicator, США). Аликвоты образцов супернатанта и осадка анализировали с помощью электрофореза в денатурирующих условиях в 12% или 15% разделяющем геле [192] с последующим переносом на PVDF мембрану в течение 3 часов при 150 мА. Кроме того, супернатант лизатов трансфицированных клеток

pcDNA-OBP анализировали с помощью нативного электрофореза в 5% разделяющем геле с последующим переносом на PVDF мембрану. Мембрану блокировали в 3% растворе обезжиренного молока в PBS, содержащем 0,05% (об./об.) Tween-20 (PBST). Мембрану окрашивали первичными антителами в течение 1 часа при комнатной температуре или в течение 16 часов при 4°C. В качестве первичных антител использовали мышинные моноклональные антитела против альфа-синуклеина (1:1000, LB509, Abcam, США), мышиную сыворотку против рекомбинантного OBP (1:10000) или мышинные моноклональные антитела против GAPDH (1:2000, HyTest, Финляндия) для обнаружения клеточного GAPDH. Сыворотку против OBP получали, как описано ранее [43]. Во всех случаях использовали 1-часовую инкубацию с вторичными антителами козы (anti-mouse), конъюгированными с пероксидазой хрена (1:10000, Jackson ImmunoResearch, США). Белковые полосы визуализировали с помощью набора для обнаружения для вестерн-блоттинга (Advansta WesternBrightECL, США) с использованием ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad, США). В качестве контроля была проведена процедура фракционирования с буфером, содержащим Тритон X-100, на фибриллах альфа-синуклеина, приготовленных *in vitro*, как описано в «Материалах и методах», раздел 5,1.

6.4. Иммуноцитохимия

Клетки HEK293T высевали на 10-мм покровные стекла (Menzel-Glaser, Германия) в 24-луночные планшеты (Corning, США) по 1,5*10⁵ клеток на лунку. На следующий день клетки трансфицировали Lipofectamine 3000 (Invitrogen, США) и окрашивали через 2 дня после трансфекции. Для этого клетки промывали холодным PBS, фиксировали 3,7% формальдегидом в PBS в течение 20 мин и пермеабелизировали 0,25% Тритон X-100 в течение 10 мин. После блокирования 3% нормальной козьей сывороткой (Thermo Fisher Scientific, США) в PBS в течение 30 мин клетки инкубировали с кроличьими поликлональными антителами против альфа-синуклеина (1:500, Cell

Signaling, США) и/или с мышинной сывороткой против рекомбинантного ОВР (1:500) [43] в течение 1 часа, промывали PBS и инкубировали с Alexa Fluor 488 конъюгированным с антителами альпаки против IgG кролика (1:500, Jackson ImmunoResearch, США) и с Cy3 конъюгированным с антителами козы против IgG мыши (1:500; Jackson ImmunoResearch, США) в течение 1 часа. Ядра клеток окрашивали DAPI (Sigma, США) в концентрации 0,5 мкг/мл в течение 10 мин. Покровные стекла монтировали на предметные стекла с помощью Mowiol (Sigma, США) и анализировали с помощью флуоресцентного микроскопа Axiovert 200 M (Carl Zeiss, Германия), оснащенного охлаждаемой ПЗС-камерой ORCAII-ERG2 (Hamamatsu Photonics, Япония).

6.5. Оценка жизнеспособности клеток с помощью МТТ-теста

Для изучения жизнеспособности клеток SH-SY5Y и HEK293T после трансфекции векторами pcDNA-ОВР и/или pcDNA- syn_mut, 8*10³ клеток на лунку высевали на 96-луночные планшеты для обработки клеточной культуры (Biofil, Китай), трансфицировали Lipofectamine 3000 (Invitrogen, США) через 24 часа после высевания, и через 72 часа проводили МТТ-тест как описано в «Материалах и методах», раздел 5,5.

7. Характеристика агрегатов амилоидогенных белков

7.1. Распределение белков между осадком и супернатантом

В процессе фибриллизации мономеров амилоидогенных белков оценивали их распределение между растворимой и нерастворимой фракциями. Для этого из реакционной смеси отбирали аликвоты, центрифугировали их при 12000g и анализировали осадок и супернатант SDS-электрофорезом в 10% полиакриламидном геле.

7.2. Подготовка фибрилл

Фибриллы, генерируемые с помощью фаговых шаперонинов, и спонтанно образовавшиеся фибриллы центрифугировали при 1000g в течение 3 мин. Супернатанты, содержащие неагрегированные мономеры и шаперонины, удаляли, а осадки (фибриллы) ресуспендировали в 50 mM Трис-HCl буфере (pH 7,5) для дальнейших экспериментов.

7.3. Динамическое рассеяние света (ДРС)

Гидродинамические диаметры белков определяли методом ДРС. Измерения проводили при температуре 25°C с использованием устройства Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments, Великобритания), оснащенного оптикой 173° для регистрации рассеянной интенсивности. Длина волны лазера составляла 532 нм. Для интерпретации результатов использовалось численное распределение частиц. Каждое распределение, показанное на графике, представлено как среднее значение пяти измерений, выполненных за 75 с.

7.4. Трансмиссионная электронная микроскопия (ТЭМ)

Образцы адсорбировали на формваровую подложку с углеродным покрытием медных сеток с ячейками 300 меш и контрастировали 1% водным раствором уранилацетата. ТЭМ-изображения были получены с использованием просвечивающего электронного микроскопа JEOL JEM-2100 (JEOL, Токио, Япония) при ускоряющем напряжении 80 кВ.

7.5. Протеолитическое расщепление фибрилл

Для получения препарата зрелых фибрилл прионного белка половину образца фибрилл в 50 mM Трис-HCl буфере (pH 7,5), 1% Тритон X-100 инкубировали при 80°C в течение 15 мин. Исходные и зрелые фибриллы подвергали гидролизу протеиназой К (соотношение прионный белок:протеиназа К по массе составляло 1500:1) при 37°C при постоянном

перемешивании со скоростью 570 об/мин. Аликвоты отбирали на протяжении всей инкубации. Реакцию останавливали добавлением раствора PMSF в изопропанол до концентрации 1 мМ. Затем пробы прогревали при 95°C в течение 5 мин в буфере для образцов и анализировали SDS-электрофорезом, используя 16% разделяющий полиакриламидный гель.

8. Статистический анализ

Статистический анализ проводили с помощью RStudio. Тест Краскела-Уоллиса использовали для сравнения нескольких групп в анализе данных по флуоресценции ThT во время фибриллизации прионного белка и для сравнения групп в анализе ИФА. Уровень значимости был установлен на уровне $p < 0,05$. Апостериорный тест Данна с поправкой Холма использовали для изучения конкретных различий между групповыми средними значениями.

Тест Манна-Уитни или однофакторный дисперсионный анализ с поправкой Бонферони использовали для сравнения результатов анализа жизнеспособности клеток SH-SY5Y и HEK293T.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Выделение и очистка белков

1.1. Получение альфа-синуклеина с дополнительным стоп-кодоном

Ранее в нашей лаборатории были созданы две плазмидные конструкции, содержащие гены альфа-синуклеина, которые позволяли нарабатывать как рекомбинантный белок дикого типа, так и его мутантную форму в клетках BL21(DE3) *E. coli*. Однако, было установлено, что в связи с наличием стоп-кодона TGA в обеих плазмидах наряду с рекомбинантным альфа-синуклеином клетки в обоих случаях продуцировали незначительное количество белка с большей массой ~20 кДа. Данная форма синуклеина отчетливо видна при электрофоретическом анализе очищенных фракций рекомбинантных альфа-синуклеинов дикого типа и его мутантной формы на геле (рис. 2А). Дальнейший анализ методами вестерн-блоттинга (рис. 2В) и MALDI-TOF показал, что данный белок представляет собой удлиненный альфа-синуклеин дикого типа или его мутантную форму, которые образуются в результате пропуска стоп-кодона TGA в бактериальной системе. В связи с этим были созданы новые конструкции с дополнительным стоп-кодоном.

Для экспрессии альфа-синуклеина A53T был проведен сайт-направленный мутагенез плазмиды на основе вектора pET33b(+), содержащей ген SNCA с мутацией A53T и заменой 136 кодона TAC на TAT. В случае альфа-синуклеина дикого типа был выбран метод рестрикции. Фрагмент ДНК альфа-синуклеина дикого типа с дополнительными двумя стоп-кодонами TAA и заменой 136 кодона TAC на TAT включали в плазмиду на основе вектора pET28a(+) между сайтами рестрикции NcoI и NheI. Подробно протокол получения форм описан в «Материалах и методах», раздел 1.

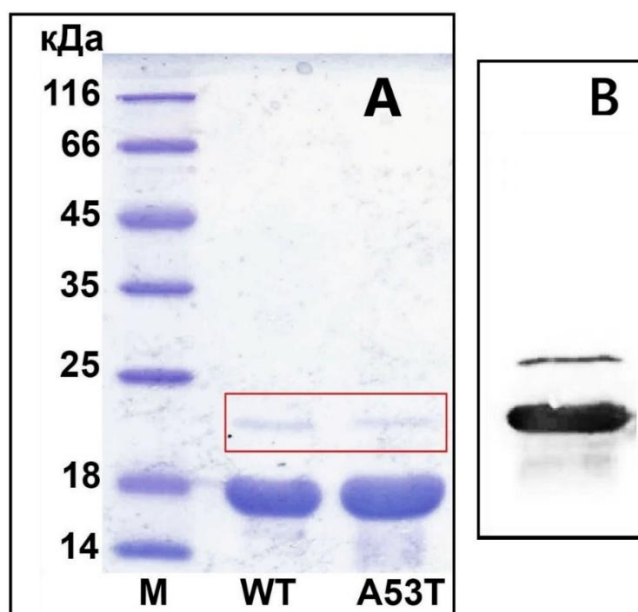


Рисунок 2. Анализ препаратов альфа-синуклеина дикого типа и его мутантной формы A53T: **А)** методом SDS-электрофореза, **В)** методом иммуноблоттинга с моноклональными антителами против альфа-синуклеина.

М – маркеры молекулярной массы, рамкой обведен удлиненный альфа-синуклеин дикого типа и его мутантной формы.

1.2. Выделение и очистка альфа-синуклеина

Чтобы убедиться, что включение дополнительных стоп-кодонов предотвращает появление удлинённого альфа-синуклеина, мы очистили альфа-синуклеин с помощью метода кислотного осаждения примесных белков с последующим фракционированием сульфатом аммония. Подробный протокол описан в «Материалах и методах», раздел 2.1. На рисунке 3 представлена электрофореграмма белков на разных стадиях выделения и очистки.

Анализ полученного препарата методом SDS-электрофореза в 15% ПААГ подтвердил наличие основной полосы с молекулярной массой около 18 кДа, которая соответствует альфа-синуклеину (рис. 3). Таким образом, был получен гомогенный препарат альфа-синуклеина. Выход рекомбинантного белка составил около 20 мг на 1 грамм клеток *E. coli*.

Аналогичный протокол был использован для выделения рекомбинантного альфа-синуклеина A53T.

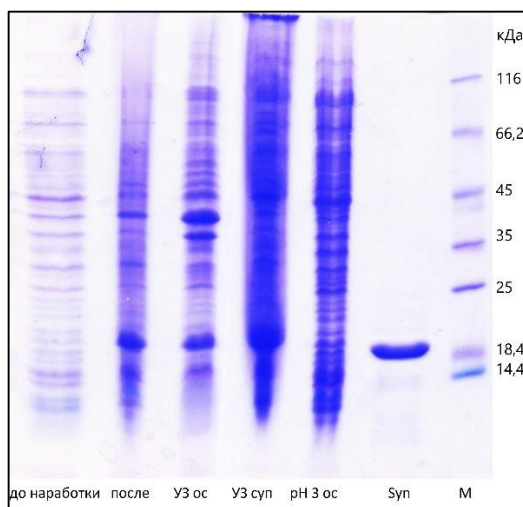


Рисунок 3. Анализ препарата альфа-синуклеина дикого типа на разных стадиях очистки методом SDS-электрофореза в ПААГ.

Образцы: до наработки – лизат клеток BL21(DE3) до индукции; после – лизат клеток после продуцирования рекомбинантного белка; УЗ ос – осадок после ультразвуковой обработки клеток; УЗ суп – супернатант после ультразвуковой обработки клеток; рН 3 ос – осадок примесных белков после кислотного осаждения; Syn – препарат альфа-синуклеина после высаливания сухим сульфатом аммония до 40% насыщения; М – белки-маркеры (14,4-116 кДа).

1.3. Экспрессия, выделение и очистка прионного белка

Прионный белок нарабатывали в тельцах включения, после чего разрушали клетки *E.coli* ультразвуком и солюбилизировали белок в 6М GuHCl в течение ночи (рис. 4А). Дальнейшую очистку препарата проводили методом аффинной хроматографии на Sepharose FF-Ni²⁺. После хроматографической очистки фракции 2-6, содержащие очищенный прионный белок, мы объединили и лиофилизировали (рис. 4В). Подробная методика описана в «Материалах и методах», раздел 2.2. В результате в 1 л среды было наработано 3,7 г клеток, из которых было получено 12 мг белка.

В результате хроматографической очистки был получен препарат прионного белка, содержащий незначительное количество примесей, которые удалялись на последующих этапах лиофилизации и гель-фильтрации.

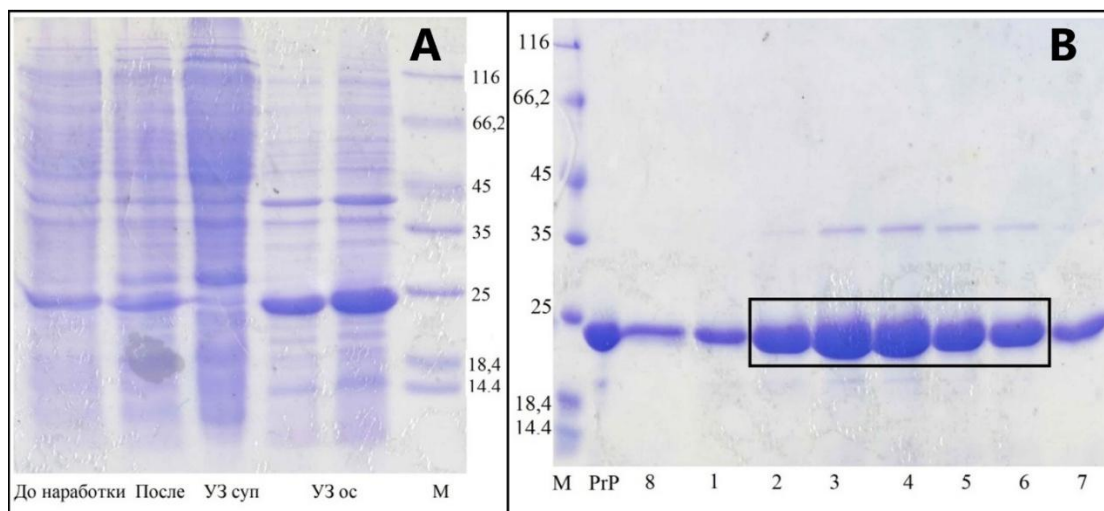


Рисунок 4. Электрофореграмма проб, полученных при очистке прионного белка.

А – Образцы: до наработки – лизат клеток *BL21(DE3)* до индукции; после – лизат клеток после продуцирования рекомбинантного белка; УЗ – супернатант после ультразвуковой обработки клеток; УЗ ос – осадок после ультразвуковой обработки клеток; М – белки-маркеры (14,4-116 кДа).

В – М – белки-маркеры; PrP – контроль прионного белка; 1-8 – фракции, полученные при хроматографической очистке на носителе *Chelating Sepharose FF-Ni²⁺*. Рамкой обведены пробы, которые в дальнейшем объединяли.

1.4. Экспрессия, выделение и очистка бактериального шаперонина GroEL и его кошаперонина GroES

После экспрессии и выделения бактериального шаперонина GroEL и его кошаперонина GroES белки дополнительно очищали от примесей и разделяли между собой методом ионообменной хроматографии на колонке с DEAE-Sepharose в градиенте NaCl. Затем препарат GroEL подвергали дополнительной хроматографической очистке в тех же условиях. После

препараты GroEL и GroES подвергали термообработке на водяной бане, чтобы денатурировать примесные белки. Очищенные препараты концентрировали и хранили в растворе, содержащем 50 мМ Трис-HCl (pH 7,4) при +4°C. Подробная методика описана в «Материалах и методах», раздел 2.3. В результате, нами были получены гомогенные препараты белков с незначительным количеством примесей (рис. 5). Из 1 г клеток нами было выделено и очищено 30 мг GroEL и 20 мг GroES.

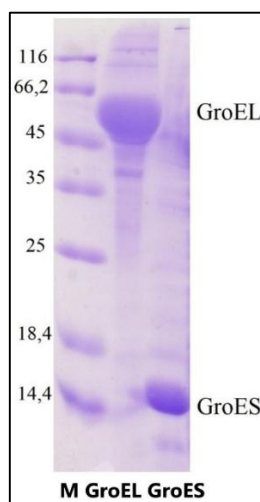


Рисунок 5. Электрофореграмма проб, полученных в результате очистки GroEL и GroES.

М – белки-маркеры (14,4-116 кДа).

1.5. Экспрессия, выделение и очистка вирусных шаперонинов

Подробно протокол по получению вирусных шаперонинов описан в «Материалах и методах», раздел 2.4. Шаперонины ОВР и EL получали по сходной методике. На каждом этапе очистки отбирали пробы и анализировали их электрофорезом.

После экспрессии, ультразвуковой обработки клеток, осаждения нуклеиновых кислот и центрифугирования рекомбинантный белок осаждали из супернатанта добавлением насыщенного раствора сульфата аммония до конечной концентрации 38%.

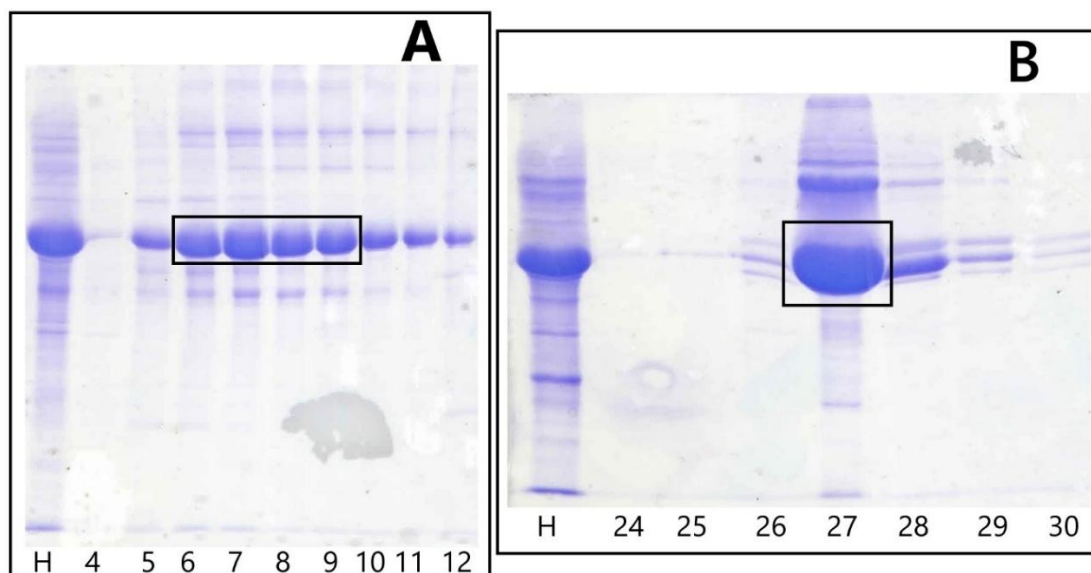


Рисунок 6. Электрофореграмма проб, полученных в результате очистки фаговых шаперонинов методом ионообменной хроматографии на Q-Sepharose: **А** – шаперонин EL, **В** – шаперонин ОВР.

Н – пробы, наносимые на колонку; 4-12 и 24-30 – фракции, полученные при хроматографической очистке. Рамкой обведены пробы, которые в дальнейшем объединяли.

Образовавшийся осадок белка после добавления сухого сульфата аммония до конечной концентрации 38% осаждали центрифугированием (10 мин, 12000g), после чего растворяли его в 40 мл 50 мМ Трис-НСl (рН 7,5), содержащем 100 мМ NaCl, и наносили на колонку с Q-Sepharose. Фракции, собираемые во время хроматографии, анализировали электрофоретически в денатурирующих условиях. Результаты по хроматографической очистке препаратов шаперонинов EL и ОВР представлены на рисунке 6, соответственно. Фракции, выделенные рамкой, содержат чистый белок.

Далее фракции, содержащие очищенный белок, объединяли и концентрировали с помощью Amicon Ultra-15 с пропускной способностью 100 кДа. Конечный результат очистки и концентрирования белков представлен на рисунке 7. В результате были получены гомогенные препараты шаперонинов EL и ОВР.

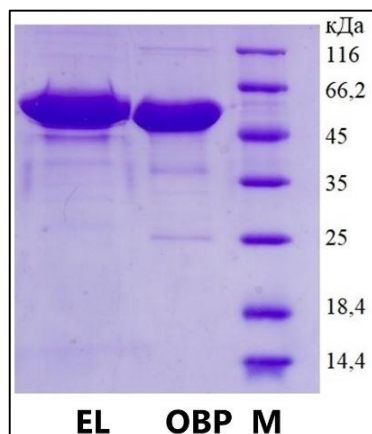


Рисунок 7. Очищенные шаперонины EL и OBP после концентрирования.

M – белки-маркеры (14,4-116 кДа).

2. Функциональная активность шаперонинов

2.1. Функциональная активность GroE

После выделения была подтверждена функциональная активность GroE (комплекс шаперонина GroEL и его кошаперонина GroES). Для этого мы проверяли АТРазную активность шаперонина, а также его способность рефолдировать субстрат, а именно лактатдегидрогеназу (ЛДГ). Об АТРазной активности судили по изменению концентрации неорганического фосфата при гидролизе АТР под действием шаперонина. Как показано на рисунке 8А, со временем в растворе увеличивается количество фосфата. Это свидетельствует о сохранившейся АТРазной активности комплекса GroE, которая составляет 65 нмоль/мг/мин при 25°C.

Далее мы подтвердили способность GroE рефолдировать субстрат по восстановлению активности фермента ЛДГ. Результаты эксперимента представлены на рисунке 8В. Через час после начала реакции доля восстановленной активности увеличилась до 3% в случае шаперонин-зависимой реактивации, в то время как в случае спонтанной реактивации она оставалась ниже 1% на протяжении всего эксперимента. Это указывает на то, что GroE помогает денатурированной ЛДГ правильно свернуться и

восстановить ферментативную активность. Это свидетельствует о том, что рекомбинантные GroEL и GroES в процессе выделения и очистки сохранили свою шаперонную активность.

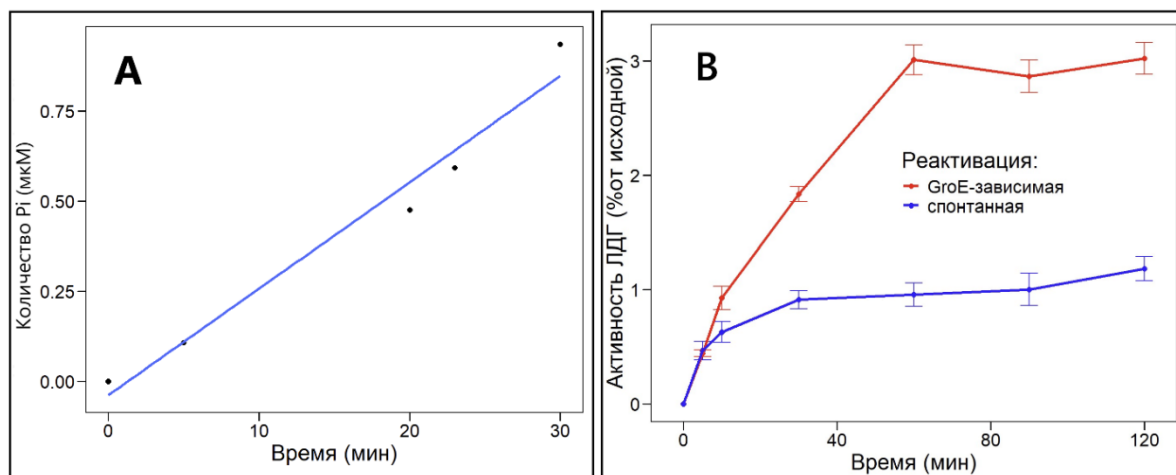


Рисунок 8. Функциональная активность GroE. **А** – Изменение количества неорганического фосфата (Pi) в растворе под действием GroE. **В** – Спонтанная и GroE-зависимая реактивация ЛДГ.

А – Концентрации GroEL и GroES для определения АТРазной активности составляли 0,5 и 1 мг/мл, соответственно. Активность определяли по отношению к GroEL. Пробы инкубировали в присутствии 2 мМ АТФ в течение 30 мин при 25°C. **В** – Для денатурации ЛДГ белок инкубировали в 4М GuHCl в течение 10 мин при 25°C. Концентрации ЛДГ, GroEL и GroES в реакции реактивации составляли 0,3, 0,3 и 0,6 мкМ, соответственно. Пробы инкубировали в присутствии 2 мМ АТФ в течение 120 мин при 25°C. Данные представлены как среднее 3 измерений $\pm$ SE.

2.2. Функциональная активность фаговых шаперонинов

Для проверки активности фаговых шаперонинов – двухкольцевого EL и однокольцевого ОВР – мы проверили их способность гидролизовать АТФ и защищать от термической агрегации субстрат – эндолизин (gp188). Для обоих шаперонинов АТРазная активность составила около 200 нмоль/мг/мин при 37°C.

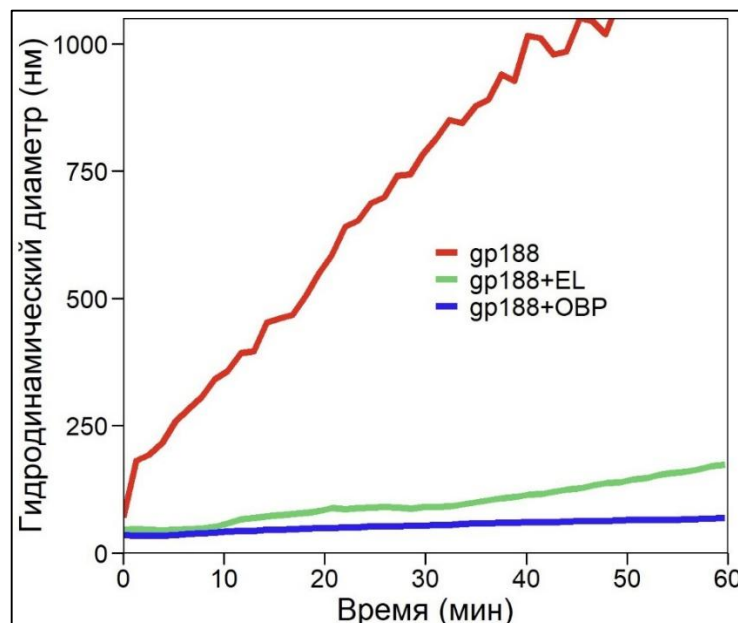


Рисунок 9. Влияние шаперонинов EL и OBP на термическую агрегацию эндолизина (gp188) при 45°C.

Тренды ДРС измеряли в присутствии 1,2 мМ АТР в 50 мМ Трис-НСl буфере (рН 7,5), содержащем 100 мМ КCl, 10 мМ MgCl₂. Концентрация gp188 и каждого шаперонина составляла 3 мкМ.

Шапероноподобную активность фаговых шаперонинов оценивали по их способности защищать gp188 от термической агрегации. Для этого gp188 в концентрации 3 мкМ инкубировали при 45°C совместно или без добавления 3 мкМ шаперонинов. Пробы инкубировали в присутствии 1,2 мМ АТР. Результаты эксперимента представлены на рисунке 9. При термической агрегации gp188, происходит увеличение размера частиц, о чем можно судить по увеличению гидродинамического диаметра частиц со временем по данным динамического рассеяния света (ДРС). При этом при инкубации эндолизина совместно с обоими шаперонинами этого не наблюдается. Полученные данные свидетельствуют о том, что оба шаперонина обладают способностью защищать белок-субстрат от агрегации.

2.3. Сравнение функциональной активности ОВР и ОВРΔAD

Также нашими коллегами из Пущино были предоставлены два рекомбинантных делеционных варианта однокольцевого шаперонина ОВР, а именно его апикальный домен (AD) и шаперонин без апикальных доменов (ОВРΔAD). Анализ рекомбинантного ОВРΔAD с помощью электронной микроскопии показал, что он, как и полноразмерный шаперонин, состоит из 7 субъединиц, формирующих кольцевую структуру (рис. 10).

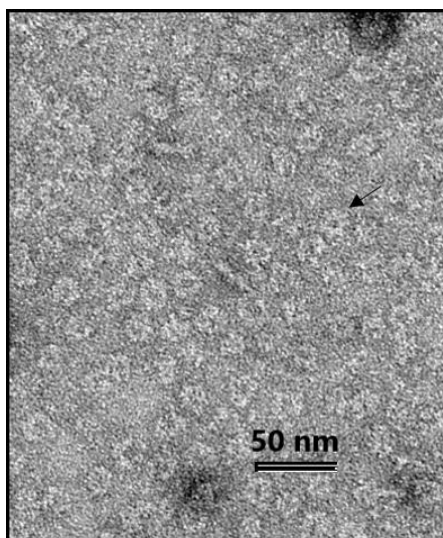


Рисунок 10. Электронные микрографии мутантной формы ОВР, лишенной апикальных доменов (ОВРΔAD).

Поскольку мутантная форма шаперонина ОВРΔAD содержит экваториальные домены с сайтами связывания АТР, мы проверили, сохраняет ли он АТРазную активность. По результатам эксперимента было установлено, что он обладает АТРазной активностью, которая составила 120 нмоль/мг/мин при 37°C.

Затем мы сравнили термическую стабильность мутантной формы ОВРΔAD со стабильностью полноразмерного шаперонина ОВР, используя методы ДРС и спектроскопии кругового дихроизма (КД). Для отслеживания изменения гидродинамического диаметра шаперонинов методом ДРС, шаперонины ОВР или ОВРΔAD инкубировали в течение часа в 50 мМ Трис-

HCl (pH 7,5), содержащем 100 мМ KCl и 10 мМ MgCl₂, и непрерывно измеряли диаметр частиц в растворе (рис. 11А). Реакцию проводили при 45°C в отсутствие или в присутствии 1,2 мМ АТР. Концентрация АТР подбиралась на основании рассчитанной АТРазной активности шаперонинов с учетом продолжительности эксперимента. Результаты показали, что без АТР диаметр частиц в случае ОВРΔAD увеличивается до 1000 нм менее чем за 5 мин, тогда как диаметр частиц в случае ОВР начинает резко расти лишь через 30 мин с начала инкубации и достигает 1000 нм через 45 мин.

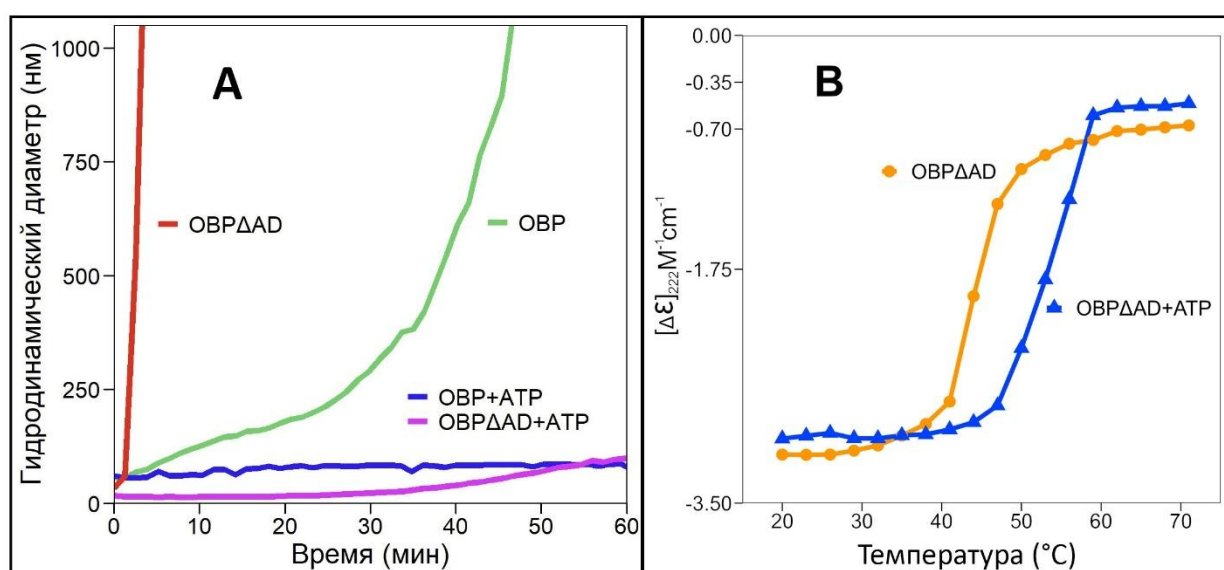


Рисунок 11. Сравнение термостабильности полноразмерного шаперонина ОВР и его мутантной формы ОВРΔAD с помощью ДРС (А) и спектроскопии КД (В) в 50 мМ Трис-HCl буфере (pH 7,5), 100 мМ KCl, 10 мМ MgCl₂ в отсутствие и в присутствии 1,2 мМ АТР. А) Изменение гидродинамического диаметра частиц со временем для ОВРΔAD по сравнению с полноразмерным шаперонином ОВР при 45°C. В) Изменения значений молярного кругового дихроизма при 222 нм свободного ОВРΔAD и его комплекса с АТР в зависимости от температуры. Концентрация каждого шаперонина составляет 3 мкМ.

Следует отметить, что АТР оказывает стабилизирующий эффект на оба шаперонина: диаметр их частиц не увеличивается за все время эксперимента (рис. 11А). Подобные результаты были получены методом КД. Как показано на рисунке 11В, средние точки сигмоидальных кривых образцов ОВРΔAD в апо-форме и в комплексе с АТР различаются примерно на 9°C и шаперонин без апикальных доменов в присутствии АТР более термостабилен, чем без него. Аналогичные результаты по спектрам КД были получены ранее для полноразмерного ОВР [47].

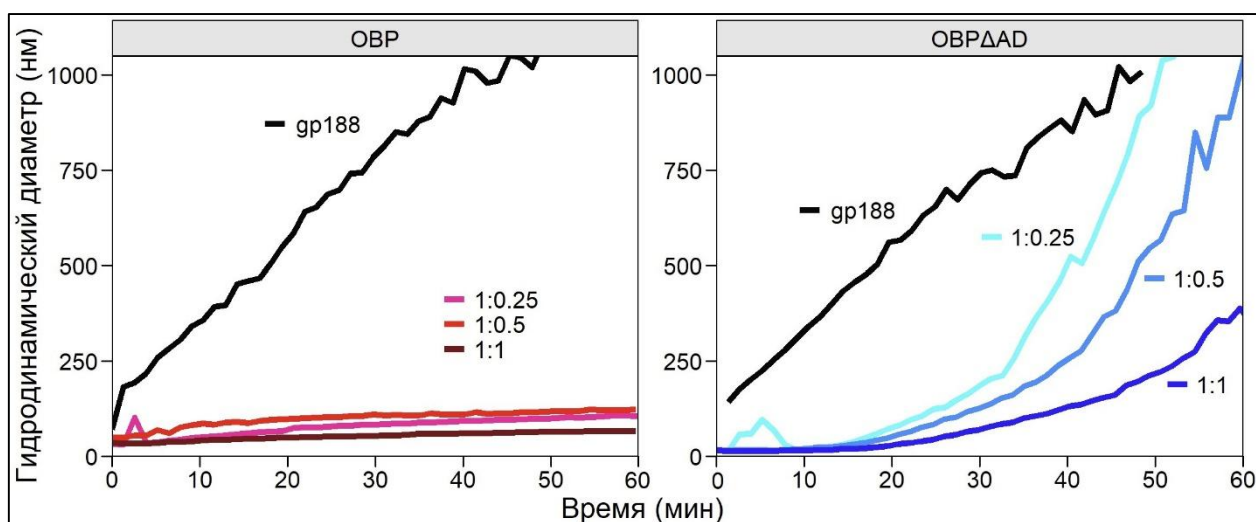


Рисунок12. Влияние шаперонина ОВР и его мутантной формы ОВРΔAD на термическую агрегацию эндолизина (gp188) при 45°C.

Тренды ДРС измеряли при различных соотношениях gp188:шаперонин в присутствии 1,2 мМ АТР в 50 мМ Трис-НСl буфере (рН 7,5), 100 мМ КСl, 10 мМ MgCl₂. Концентрация gp188 составляет 3 мкМ.

Также мы проверили функциональную активность мутантной формы ОВРΔAD в сравнении с полноразмерным шаперонином ОВР по его способности защищать эндолизин (gp188) от термической агрегации (рис. 12). За агрегацией эндолизина следили по определению гидродинамического диаметра частиц в растворе методом ДРС при разных соотношениях gp188:шаперонин (1:0,25, 1:0,5 и 1:1). Установлено, что в присутствии АТР

оба шаперонина дозозависимо предотвращают агрегацию эндолизина, что свидетельствует об их функциональной активности.

При сравнении ОВРΔAD и полноразмерного шаперонина ОВР, оказалось, что мутантная форма действует с несколько меньшей эффективностью. Так, при инкубации эндолизина совместно с ОВР не происходит увеличения диаметра частиц на протяжении 60 мин. Однако, при инкубации с ОВРΔAD, даже при использовании самого высокого соотношения 1:1, диаметр частиц начинает постепенно увеличиваться через 20 мин с начала инкубации. При этом, защитный эффект ОВРΔAD снижается с уменьшением его концентрации.

3. Связывание вирусных шаперонинов с различными формами альфа-синуклеина

Вначале мы решили убедиться, что фаговые шаперонины, действительно способны связывать различные формы альфа-синуклеина.

Эксперименты по связыванию проводили на альфа-синуклеине дикого типа. Было изучено взаимодействие шаперонинов с тремя формами альфа-синуклеина, а именно с мономерами, амилоидными фибриллами и промежуточной формой. Подробный протокол получения форм альфа-синуклеина описан в «Материалах и методах», раздел 4.1.

В качестве промежуточной формы были выбраны агрегаты, получаемые при циклической инкубации при 42°C. Полученные агрегаты были охарактеризованы нами методами ТЭМ и флуоресценции ThT. Как показано на рисунке 13 (А и В), кривая амилоидизации промежуточной формы имеет сигмоидальный вид с четко различимыми лаг-фазой, фазой роста и плато. Амилоидизация альфа-синуклеина по данной методике происходит в сравнительно короткие сроки. Однако, в отличие от фибрилл, получаемых при инкубации альфа-синуклеина при 37°C и постоянном перемешивании, интенсивность флуоресценции ThT для промежуточной формы в 5 раз ниже.

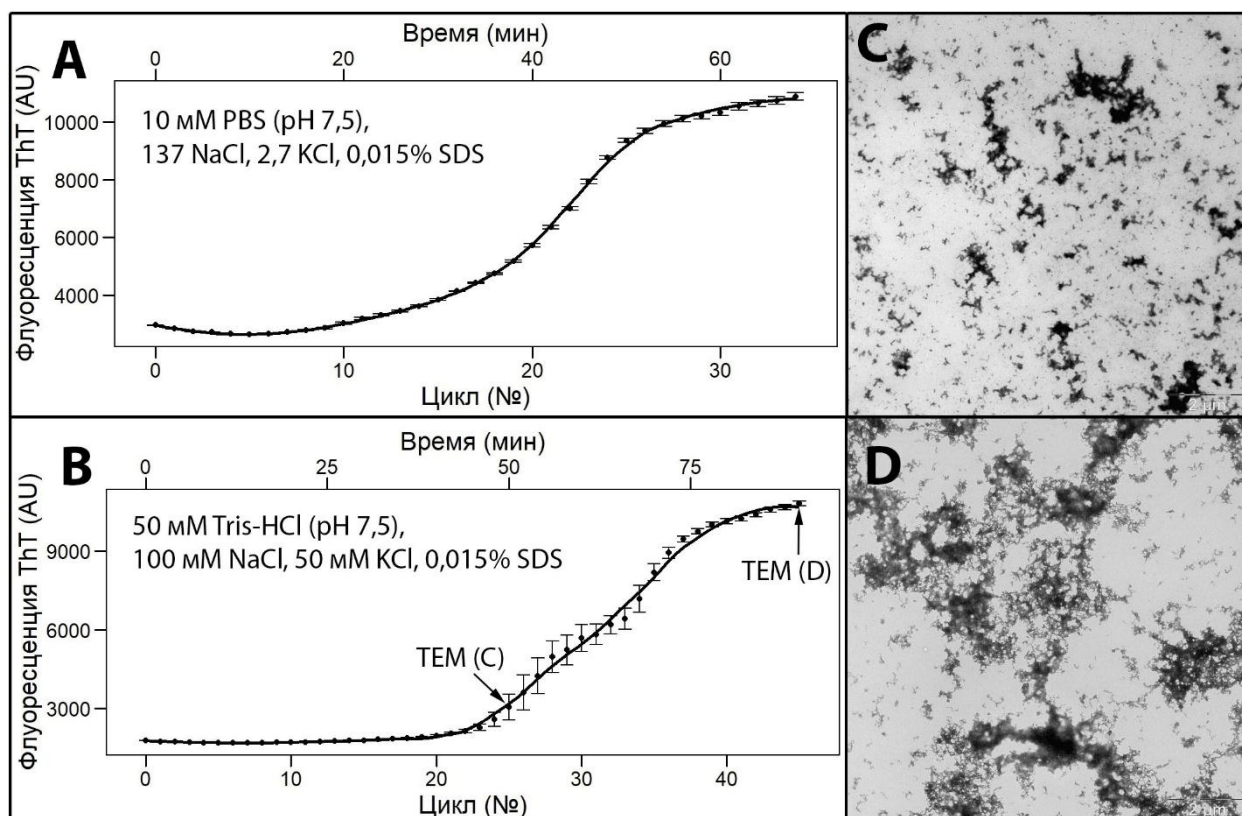


Рисунок 13. Характеристика промежуточной формы на пути амилоидизации альфа-синуклеина дикого типа, полученной *in vitro*.

А и В – кривые амилоидизации мономеров альфа-синуклеина в разных буферах, **С и D** – ТЭМ изображения получаемых агрегатов.

Концентрация альфа-синуклеина дикого типа составляла 70 мкМ. Перед началом инкубации пробы перемешивали на вортексе в течение 10 с. Затем пробы циклически инкубировали при 42°C чередуя 1 мин при 400 об/мин и 1 мин без перемешивания. Данные по флуоресценции ThT представлены как среднее 3 измерений $\pm$ SE. Измерения проводили каждые 2 мин.

При анализе ТЭМ изображений оказалось, что полученная нами промежуточная форма представляет собой короткие цилиндрические агрегаты с диаметром 10-14 нм, которые могут слипаться между собой. Помимо этого, по визуальной оценке структура промежуточной формы в начале фазы роста (рис. 13С) не отличается от структуры на плато (рис. 13D),

однако количество образуемых агрегатов увеличивается со временем инкубации.

После получения мономеров, фибрилл и промежуточной формы альфа-синуклеина дикого типа, мы сравнили их связывание с двумя шаперонинами, а именно с однокольцевым ОВР и с двухкольцевым EL. Для оценки связывания шаперонинов с разными формами альфа-синуклеина дикого типа мы использовали твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА).

Подробный протокол описан в «Материалах и методах», раздел 4.2. На микропланшет наносили фаговые шаперонины EL или ОВР. В качестве положительного контроля мы вносили в лунки разные формы альфа-синуклеина. В качестве отрицательного контроля вносили соответствующие шаперонины. После инкубации в течение 30 мин в лунки добавляли разные формы альфа-синуклеина в качестве белка-партнера. В контрольные лунки вместо белка-партнера вносили соответствующий объем буфера PBS, pH 7,4. После инкубации в течение 30 мин в лунки вносили моноклональные антитела против альфа-синуклеина.

Результаты показывают (рис. 14), что отрицательные контроли не окрашиваются. При этом положительные контроли, как и пробы, содержащие шаперонины с белком-партнером, интенсивно окрашиваются. Тест Краскела-Уолиса выявил статистически значимые различия между экспериментальными группами и отрицательным контролем. Это свидетельствует о связывании шаперонинов с различными формами альфа-синуклеина. Следует отметить, что антитела на альфа-синуклеин связывают мономеры, фибриллы и промежуточную форму с разной эффективностью, поэтому судить о предпочтительном взаимодействии шаперонинов с конкретной формой альфа-синуклеина затруднительно.

Также мы проводили ИФА с реципрокным нанесением. В данном случае мы наносили на микропланшет различные формы альфа-синуклеина. В качестве положительного контроля вносили шаперонины EL или ОВР. В качестве отрицательного контроля вносили различные формы альфа-

синуклеина. После инкубации в течение 30 мин в лунки добавляли EL или ОВР в качестве белка-партнера. В контрольные лунки вместо белка-партнера вносили соответствующий объем буфера PBS, pH 7,4. После инкубации в течение 30 мин в лунки вносили сыворотку против соответствующего шаперонина.

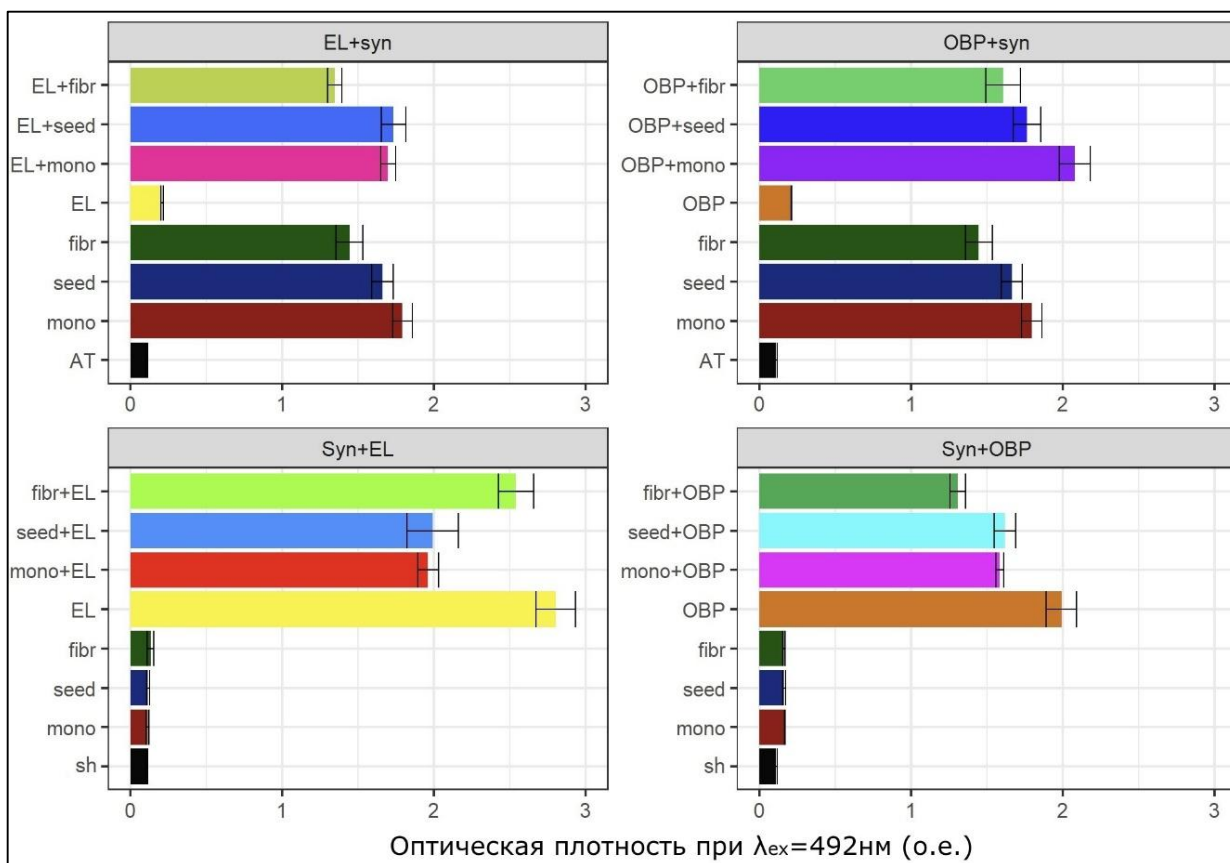


Рисунок 14. Твердофазный иммуноферментный анализ для проверки связывания шаперонинов с различными формами альфа-синуклеина дикого типа.

fibr – фибриллы альфа-синуклеина, *seed* – промежуточная форма альфа-синуклеина, *mono* – мономер альфа-синуклеина, *AT* – контроль первичных антител на альфа-синуклеин, *sh* – контроль сыворотки на шаперонины. Данные представлены как среднее 3 измерений $\pm SE$.

Результаты показывают, что, как и в предыдущем случае, шаперонины связываются с различными формами альфа-синуклеина (рис. 14). Тест

Краскела-Уолиса выявил статистически значимые различия между экспериментальными группами и отрицательными контролями. Это свидетельствует о связывании шаперонинов с различными формами альфа-синуклеина. Следует отметить, что при визуальной оценке графиков можно предположить, что EL более склонен связывать фибриллярные формы альфа-синуклеина, а ОВР – мономеры и промежуточную форму. Однако, тест Краскела-Уолиса не выявил различий между данными пробами, *p*-value в обоих случаях составляет 0,06. Полученные результаты свидетельствуют позволяют предположить, что оба шаперонина с одинаковой вероятностью связывают все формы альфа-синуклеина, либо наша выборка оказалась слишком мала, чтобы выявить различия.

В целом наши результаты подтверждают, что шаперонины EL и ОВР связывают разные формы альфа-синуклеина.

4. Влияние шаперонинов на агрегацию альфа-синуклеина

4.1. Оптимизация методики фибриллизации альфа-синуклеина

Как известно, на кинетику фибриллизации альфа-синуклеина *in vitro* влияет множество факторов. Поэтому, перед началом экспериментов мы провели оптимизацию методики фибриллизации. Из литературных данных известно, что перемешивание значительно повышает воспроизводимость экспериментов [193], а наличие соли влияет на морфологию фибрилл и длительность лаг-фазы [194]. Сократить лаг-фазу и повысить воспроизводимость экспериментов может также добавление SDS и повышение температуры [193]. Согласно литературным данным шаперонины бактерий и эукариот препятствуют агрегации синуклеина [18-20], поэтому мы выбрали близкие к физиологическим условиям значения pH и ионной силы, в которых альфа-синуклеин образует амилоидные фибриллы.

Для начала мы выбрали оптимальную концентрацию альфа-синуклеина для спонтанной фибриллизации *in vitro*. Мы проверили концентрации альфа-синуклеина дикого типа в диапазоне от 7 до 50 мкМ.

Мономеры альфа-синуклеина дикого типа инкубировали в буфере PBS, pH 7,4 при температуре 37°C и орбитальном встряхивании 600 об/мин. По результатам эксперимента оказалось, что за время эксперимента мы наблюдали выраженную S-образную кривую фибриллизации альфа-синуклеина только при концентрации 50 мкМ (рис. 15).

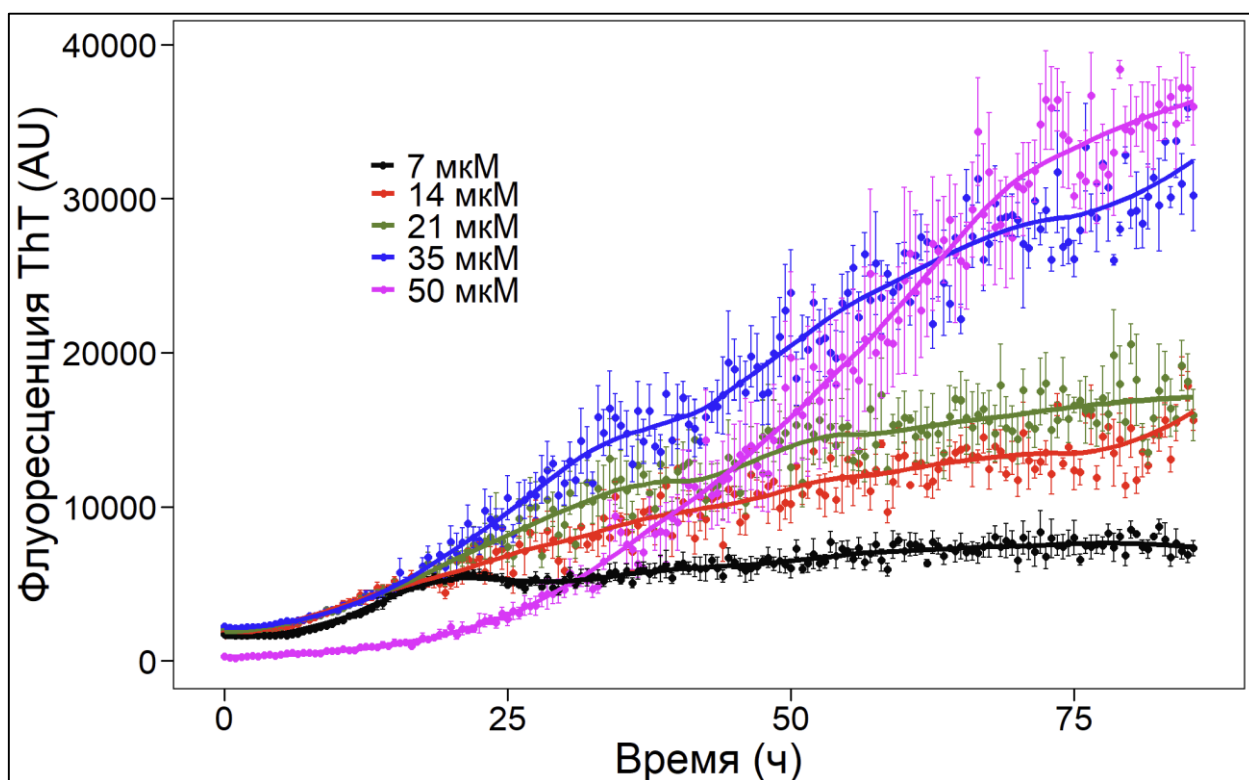


Рисунок 15. Изменение интенсивности флуоресценции ThT при агрегации альфа-синуклеина дикого типа в разной концентрации. *Пробы инкубировали в PBS (pH 7,5) при 37°C и 600 об/мин. Измерения проводили каждые 30 мин. Данные представлены как среднее 3 измерений $\pm$ SE.*

Для корректной работы наших шаперонинов, необходимо наличие соли (50 мМ KCl). Также в дальнейшем мы планировали исследовать образуемые агрегаты методом ТЭМ. Поэтому для дальнейших экспериментов были выбраны следующие условия: температура – 37°C, орбитальное встряхивание – 600 об/мин, 50 мМ Трис-HCl буфер (pH 7,4), 50 мМ KCl и 100 мМ NaCl. Помимо этого, мы пробовали инкубировать альфа-синуклеин дикого типа в

присутствии 1% SDS, так как по литературным данным это сокращает лаг-фазу и тем самым существенно сокращает время эксперимента. Мы выбрали концентрации альфа-синуклеина дикого типа 35 мкМ и 50 мкМ. Пробы инкубировали в стеклянных пробирках, экспериментальную процедуру проводили трижды. Образование амилоидных фибрилл отслеживали по флуоресценции ThT. Для контроля инкубировали альфа-синуклеин дикого типа в тех же концентрациях, но без добавления SDS.

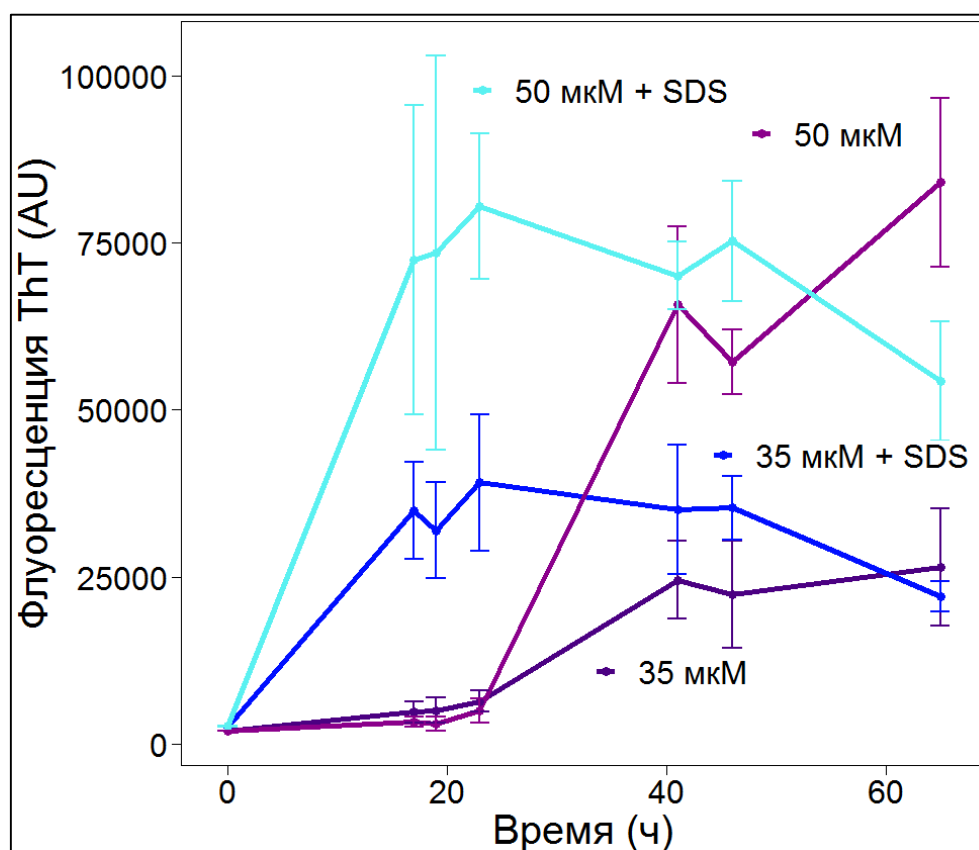


Рисунок 16. Изменение интенсивности флуоресценции ThT при агрегации альфа-синуклеина дикого типа с разной концентрацией в присутствии или без добавления 1% SDS. Пробы инкубировали в 50 мМ Трис-НСl буфере (pH 7,5), 100 мМ NaCl, 50 мМ KCl при 37°C и 600 об/мин. Данные представлены как среднее 9 измерений $\pm$ SE.

Результаты эксперимента отображены на рисунке 16. При инкубации с SDS фибриллизация происходит слишком быстро, поэтому для дальнейших

экспериментов данная система нам не подходит. Также было обнаружено, что при инкубации альфа-синуклеина дикого типа с концентрацией 35 мкМ в стеклянных пробирках в 50 мМ Трис-НСl буфере без добавления SDS наблюдается слабый рост интенсивности флуоресценции.

Для последующих экспериментов были выбраны условия: 50 мМ Трис-НСl буфер (рН 7,4), 100 мМ NaCl, 50 мМ KCl; концентрация альфа-синуклеина – 50 мкМ, температура – 37°C, орбитальное встряхивание при 600 об/мин.

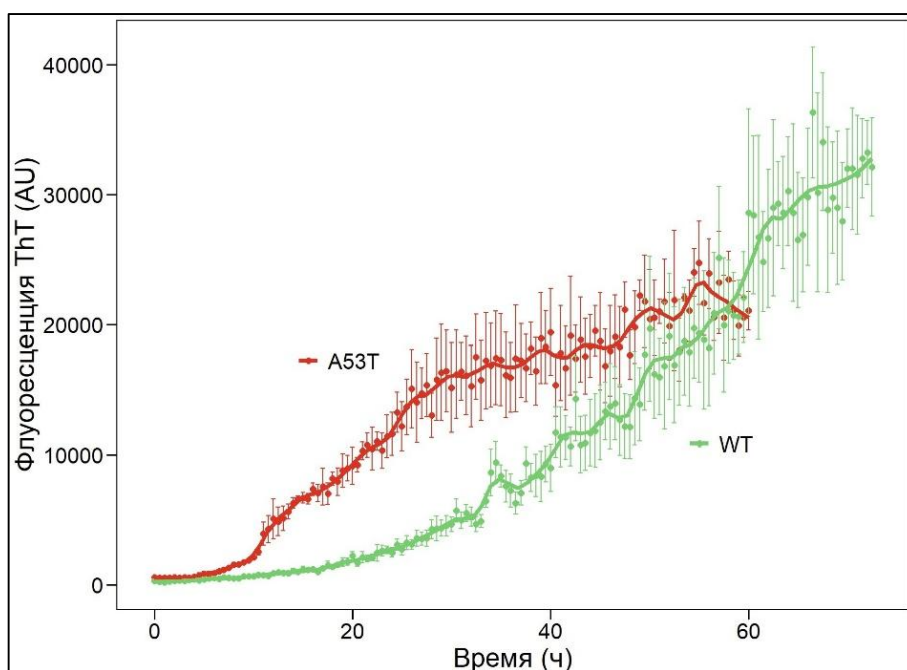


Рисунок 17. Изменение интенсивности флуоресценции ThT при агрегации альфа-синуклеина дикого типа и его мутантной формы A53T.

Концентрации альфа-синуклеинов дикого типа и A53T составили 50 мкМ. Пробы инкубировали в 50 мМ Трис-НСl буфере (рН 7,5), 100 мМ NaCl, 50 мМ KCl при 37°C и 600 об/мин. Измерения проводили каждые 30 мин. Данные представлены как среднее 3 измерений $\pm$ SE.

Чтобы получить контрольные кривые для планирования дальнейших экспериментов, в данных условиях мы инкубировали альфа-синуклеин дикого типа и его мутантную форму A53T, (рис. 17). В обоих случаях кривые

имели сигмоидальный вид с выраженными 3 стадиями: лаг-фаза, рост и плато. В случае альфа-синуклеина A53T продолжительность лаг-фазы составила 12,2 часов, а фаза плато начиналась примерно через 24 часа. В случае дикого типа продолжительность лаг-фазы составила 30,6 часов, а фаза плато начиналась примерно через 60 часов.

В связи с более быстрой кинетикой агрегации дальнейшие исследования мы решили сфокусировать на альфа-синуклеине A53T. В отличие от дикого типа, данная мутантная форма вследствие замены 53 аланина на треонин склонна к образованию олигомеров.

4.2. Влияние бактериального шаперонина GroE на агрегацию альфа-синуклеина A53T

Поскольку исследуемые фаговые шаперонины в банке данных аннотированы как GroEL-подобные, первым этапом работы стало изучение влияния бактериального шаперонина GroEL на фибриллизацию альфа-синуклеина.

Для детекции образования амилоидных структур в растворе обычно используют метод флуоресценции ThT. При связывании с бета-складчатыми амилоидными структурами данный краситель претерпевает сдвиг максимума длины волны возбуждения (с 385 нм на 450 нм) и эмиссии (с 445 нм на 482 нм). При этом интенсивность флуоресценции ThT увеличивается на несколько порядков при связывании с амилоидными структурами. Однако, GroEL в своей структуре содержит большое количество бета-складок, поэтому при использовании данной методики наблюдается значительная фоновая флуоресценция, вызванная связыванием ThT с GroEL.

В качестве альтернативы, для детекции образования агрегатов альфа-синуклеина в исследовании определялась мутность раствора по поглощению при 320 нм. Также в процессе инкубации определяли распределение альфа-синуклеина между осадком и супернатантом после центрифугирования с

помощью SDS-электрофореза, чтобы подтвердить образование нерастворимых агрегатов.

По результатам эксперимента, отображенным на рисунке 18, мутность раствора при инкубации контрольного альфа-синуклеина растет с течением времени. Однако, при инкубации альфа-синуклеина в присутствии шаперонина независимо от наличия АТФ мутность растворов была существенно ниже, чем в контроле альфа-синуклеина.

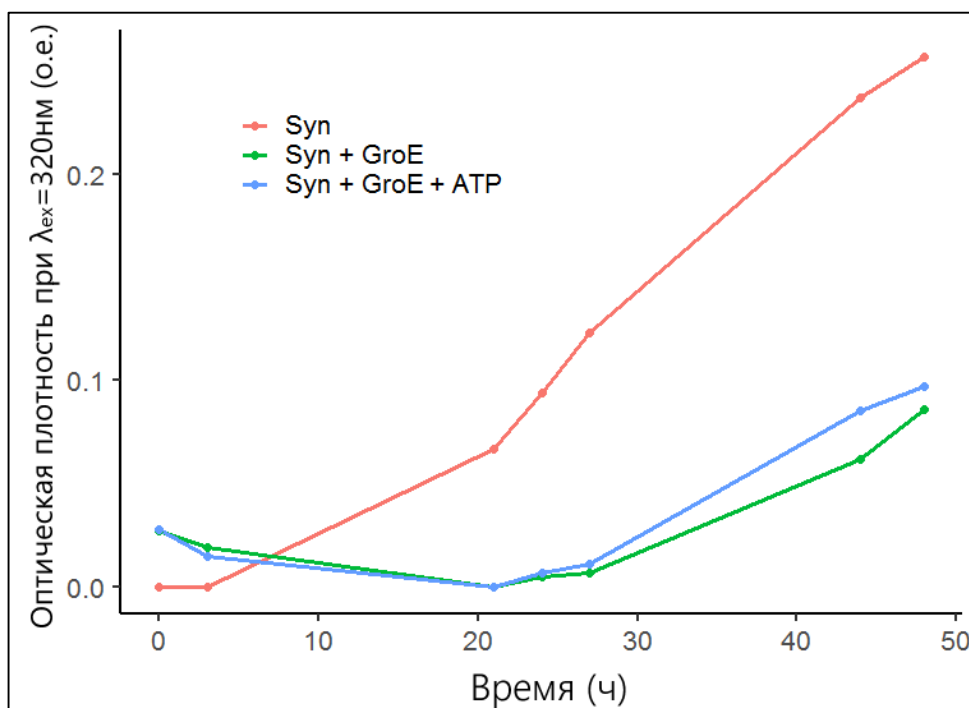


Рисунок 18. Регистрация агрегатов альфа-синуклеина A53T (Syn), образуемых в присутствии шаперонина GroE.

Концентрации альфа-синуклеина A53T, GroEL и GroES составили 50, 2,5 и 5 мкМ, соответственно. Пробы инкубировали в 50 мМ Трис-НСl буфере (рН 7,5), 100 мМ NaCl, 50 мМ KCl, 10 мМ MgCl₂ при 37°C и 600 об/мин без добавления или в присутствии 10 мМ АТФ.

Данные электрофореза (рис. 19), подтвердили результаты измерения мутности растворов. Контрольный альфа-синуклеин за 48 часов, практически полностью переходит в осадок, что говорит об образовании нерастворимых

агрегатов. В то же время, при инкубации с шаперонинами, независимо от наличия АТР, альфа-синуклеин преимущественно остается в супернатанте в течение 48 часов инкубации.

По результатам наших экспериментов, мы сделали вывод, что бактериальная система шаперонинов GroEL-GroES обладает антиагрегационной активностью в отношении альфа-синуклеина A53T.

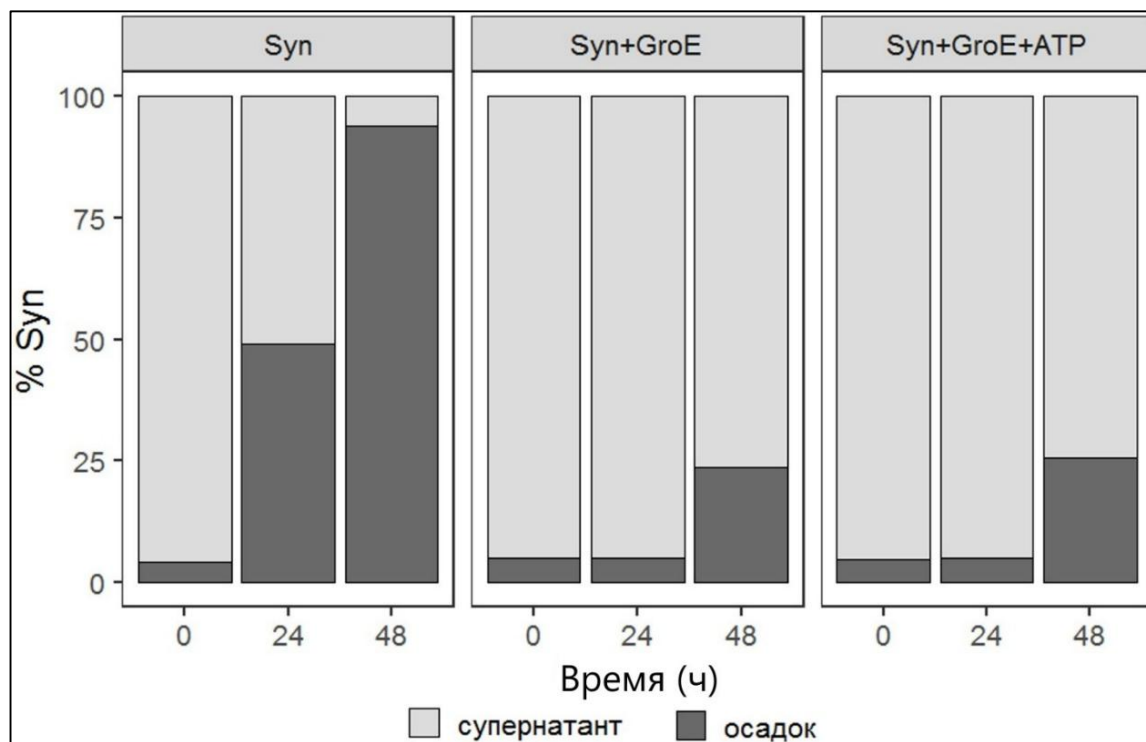


Рисунок 19. Распределение альфа-синуклеина A53T между супернатантом и осадком в процессе инкубации в присутствии шаперонинов GroEL-GroES.

Агрегаты были образованы в 50 мМ Трис-HCl буфере (pH 7,4), 100 мМ NaCl, 50 мМ KCl, 5 мМ MgCl₂ при 37°C и орбитальном встряхивании 600 об/мин. Концентрации альфа-синуклеина A53T, GroEL и GroES составили 50, 2,5 и 5 мкМ, соответственно. После инициации агрегации пробы центрифугировали в течение 10 мин при 12000g и 20°C, осадки растворяли в равном объеме буфера. Количество альфа-синуклеина в белковой полосе определялось с использованием программного обеспечения ImageJ.

В ходе экспериментальных исследований было установлено, что бактериальная система шаперонинов обладает ограниченной применимостью в качестве модели. В частности, из-за высокого содержания бета-листов в структуре GroEL невозможно судить об амилоидной природе образуемых агрегатов из-за значительной фоновой флуоресценции ThT и CongoRed. В связи с этим последующие эксперименты были сосредоточены на изучении других шаперонинов.

4.3. Влияние двухкольцевого шаперонина EL и однокольцевого шаперонина OBP на агрегацию альфа-синуклеина

4.3.1. Влияние шаперонинов на фибриллизацию альфа-синуклеина

В начале нашей работы мы оценили влияние фаговых шаперонинов, а именно двухкольцевого EL и однокольцевого OBP, на фибриллизацию альфа-синуклеина при их совместной инкубации *in vitro*. Мы выбрали постоянные концентрации альфа-синуклеина A53T и шаперонинов равные 50 мкМ и 2,5 мкМ, соответственно. Реакции проводили без добавления или в присутствии 10 мМ АТР. Концентрация АТР выбрана на основании рассчитанной АТР-зависимой активности шаперонинов с учетом продолжительности эксперимента.

Полученные кривые фибриллизации альфа-синуклеина A53T отображены на рисунках 20А и 21А. Константы, отражающие скорость роста фибрилл и время лаг-фазы для кривых, отображены в таблице 2. В случае инкубации шаперонинов с альфа-синуклеином без добавления АТР время лаг-фазы оценивали визуально, поскольку за время эксперимента мы не наблюдали сигмоидальной кинетики. В случае спонтанной фибриллизации альфа-синуклеина и АТР-зависимой фибриллизации в присутствии шаперонинов, константы, отражающие скорость роста фибрилл, рассчитывали по формуле:

$$y = A2 + \frac{A1 - A2}{1 + e^{\frac{t-t0}{\tau}}}$$

Где A_1 и A_2 соответствуют минимальному и максимальному значениям флуоресценции, t_0 – точка перегиба, τ – временная константа (наклон кривой).

Время лаг-фазы рассчитывали, как: $t_0 - 2\tau$

Как показали результаты, в отсутствие АТР увеличивается время лаг-фазы по сравнению со спонтанной фибриллизацией мономеров альфа-синуклеина А53Т. Это можно объяснить тем, что шаперонины препятствуют агрегации альфа-синуклеина. Об этом также свидетельствуют данные ТЭМ. Как видно на рисунке 20, через 24 часа с начала инкубации, альфа-синуклеин А53Т образует длинные фибриллы (рис. 20 В). При инкубации совместно с шаперонинами в отсутствие АТР через 24 часа мы наблюдали лишь небольшое количество коротких фибрилл и аморфные агрегаты, как в случае EL (рис. 20 С), так и в случае ОВР (рис. 20 D). Полученные данные свидетельствуют о том, что, шаперонины препятствуют агрегации альфа-синуклеина. Вероятно, наблюдаемый эффект вызван связыванием шаперонинов с альфа-синуклеином.

В то же время, при инкубации альфа-синуклеина А53Т совместно с шаперонинами в присутствии АТР были получены противоположные результаты. На электронных микрографиях, полученных через 24 часа с начала инкубации, мы наблюдаем большое количество длинных фибрилл альфа-синуклеина (рис. 21 С-D). Об амилоидной природе полученных фибрилл свидетельствуют данные по флуоресценции ThT (рис. 21 А).

Таблица 2. Параметры кинетики образования амилоидных фибрилл.

Проба	Время лаг-фазы, ч	t_0	τ
Альфа-синуклеин А53Т	12,7	21,8	4,6
Альфа-синуклеин А53Т + шаперонин EL + АТР	9,8	18,3	4,2
Альфа-синуклеин А53Т + шаперонин ОВР + АТР	2,3	9,2	3,4
Альфа-синуклеин А53Т + шаперонин EL	>20		
Альфа-синуклеин А53Т + шаперонин ОВР	>20		

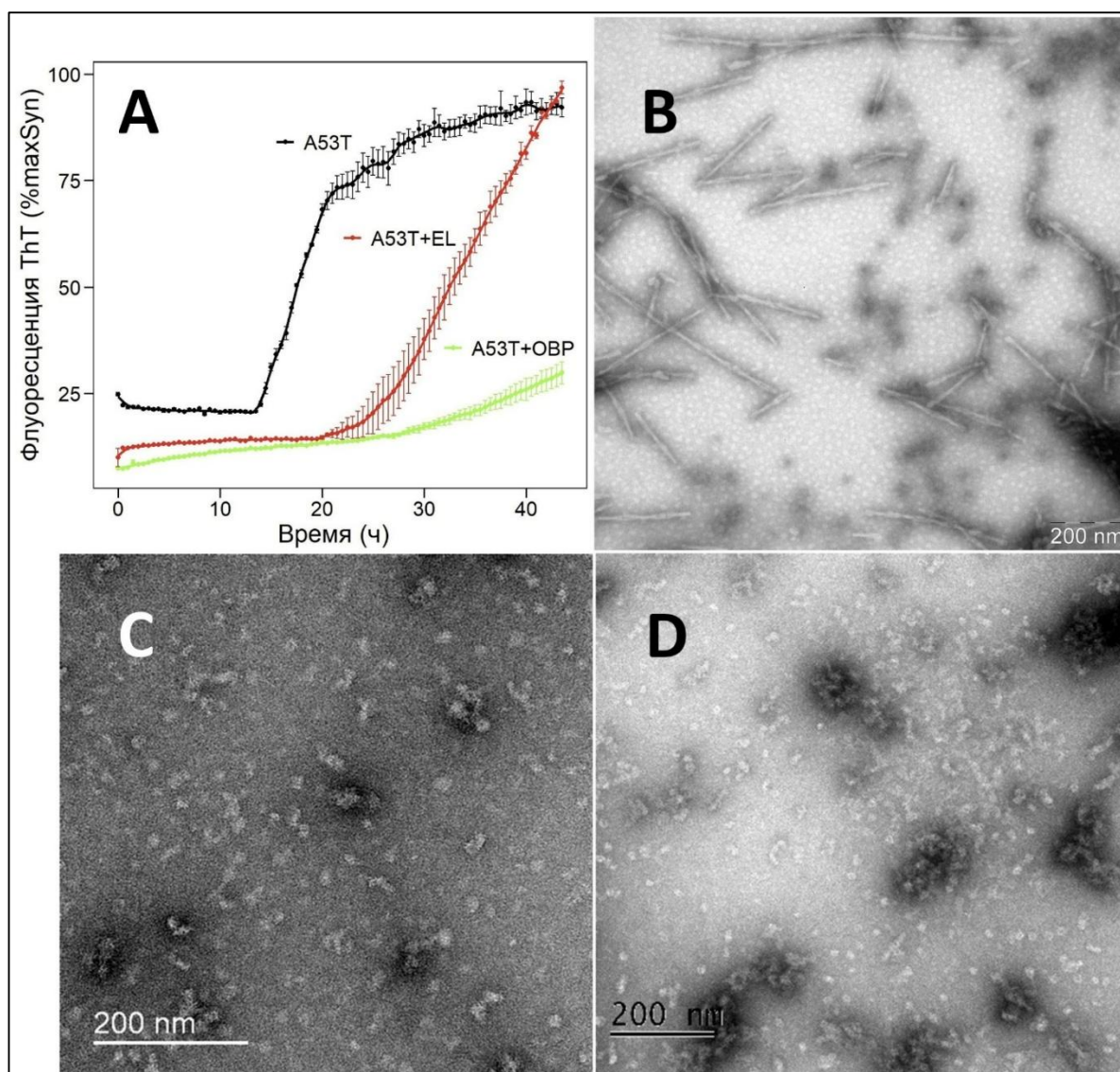


Рисунок 20. Влияние шаперонинов EL и OBP на агрегацию альфа-синуклеина A53T (A53T) при их инкубации в отсутствие АТР. **А** – Изменение интенсивности флуоресценции ThT, **В-D** – электронные микрофотографии проб через 24 часа с начала инкубации: **В)** A53T; **С)** A53T+EL; **Д)** A53T+OBP.

Концентрации альфа-синуклеина A53T и шаперонинов составили 50 и 2,5 мкМ, соответственно. Пробы инкубировали в 50 мМ Трис-НСl буфере (рН 7,5), 100 мМ NaCl, 50 мМ KCl, 10 мМ MgCl₂ при 37°C и 600 об/мин. Измерения флуоресценции ThT проводили каждые 30 мин. Данные представлены как среднее 3 измерений $\pm$ SE.

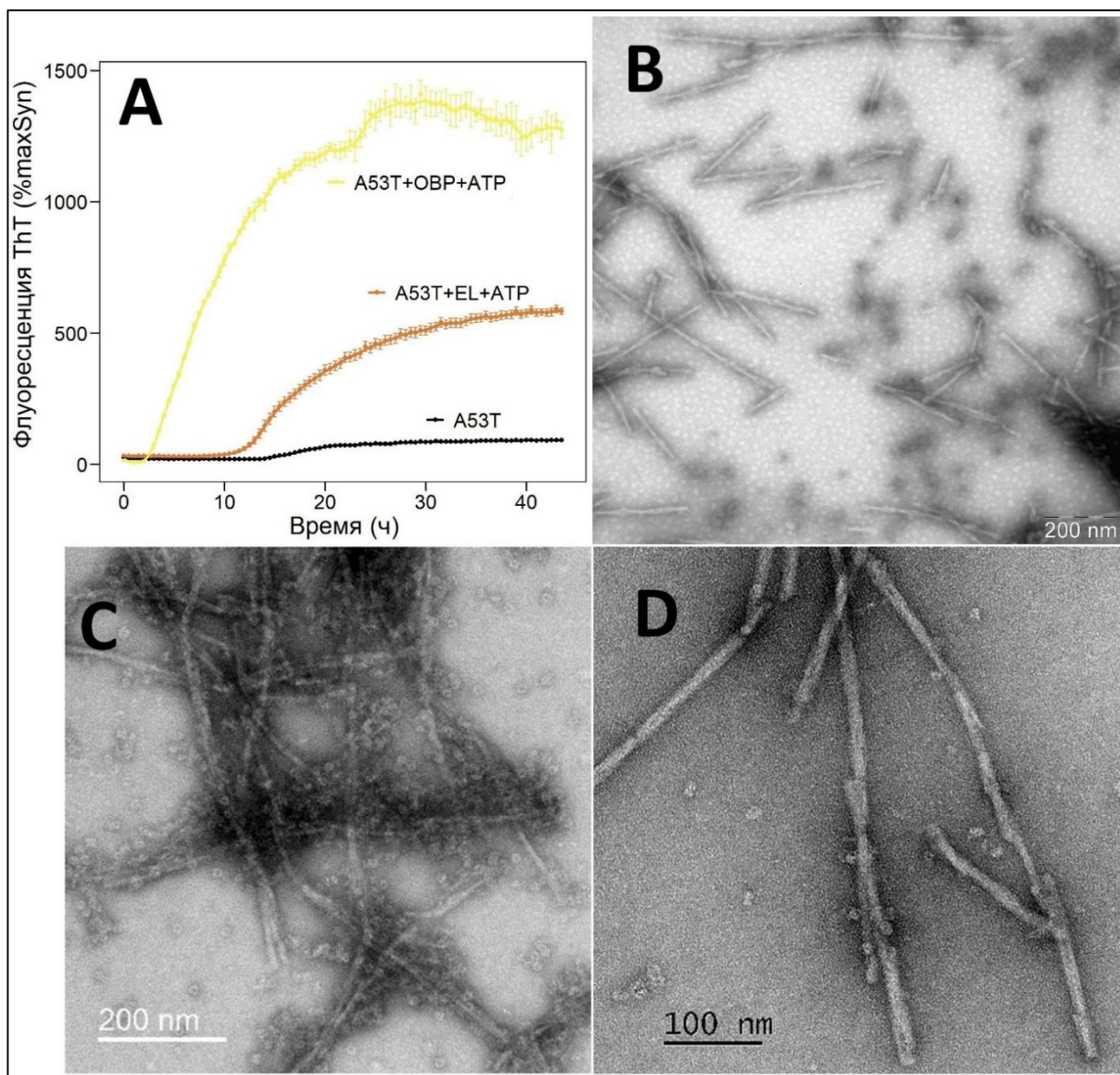


Рисунок 21. Влияние шаперонинов EL и OBP на агрегацию альфа-синуклеина A53T (A53T) при их инкубации в присутствии АТР. **A** – Изменение интенсивности флуоресценции ThT, **B-D** – электронные микрофотографии проб через 24 часа с начала инкубации: **B**) A53T; **C**) A53T+EL+ATP; **D**) A53T+OBP+ATP.

Концентрации альфа-синуклеина A53T и шаперонинов составили 50, 2,5 мкМ, соответственно. Пробы инкубировали в 50 мМ Трис-НСl буфере (рН 7,5), 100 мМ NaCl, 50 мМ KCl, 10 мМ MgCl₂ при 37°C и 600 об/мин в присутствии 10 мМ АТР. Измерения флуоресценции ThT проводили каждые 30 мин. Данные представлены как среднее 3 измерений ±SE.

Кроме того, шаперонины, вероятно, ускоряют фибриллизацию альфа-синуклеина. Результаты показывают, что однокольцевой шаперонин ОВР резко сокращает продолжительность лаг-фазы, по сравнению со спонтанной амилоидизацией A53T и увеличивает скорость роста фибрилл. Двухкольцевой шаперонин EL также увеличивает скорость роста фибрилл и сокращает лаг-фазу по сравнению со спонтанной амилоидизацией, однако он оказался не столь эффективен по сравнению с ОВР.

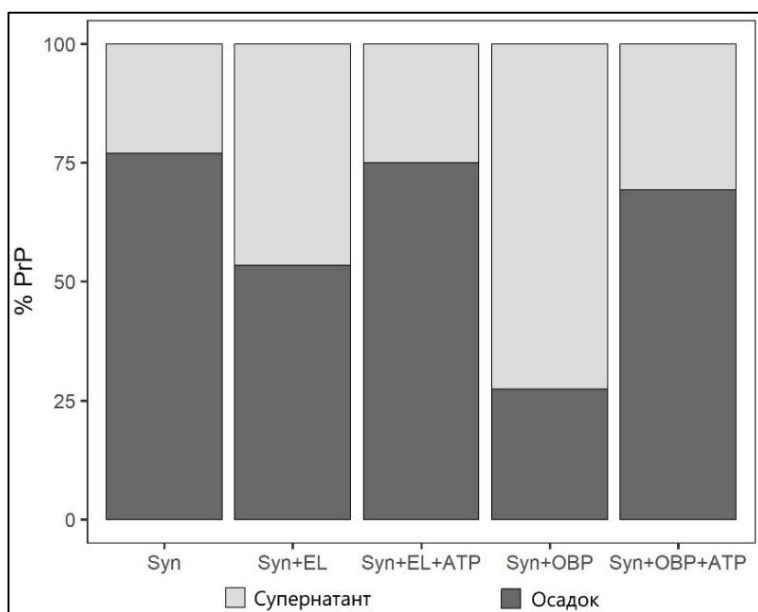


Рисунок 22. Распределение альфа-синуклеина A53T (Syn) между супернатантом и осадком в процессе инкубации в присутствии шаперонинов EL и ОВР.

Агрегаты были образованы в 50 мМ Трис-НСl буфере (pH 7,4), 100 мМ NaCl, 50 мМ KCl, 10 мМ MgCl₂ при 37°C и орбитальном встряхивании 600 об/мин. Концентрации альфа-синуклеина A53T и шаперонинов составляли 50 и 2,5 мкМ, соответственно. Пробы инкубировали в присутствии или без добавления 10 мМ АТФ. Через 24 часа после инициации агрегации пробы центрифугировали в течение 10 мин при 12000g и 20°C, осадки растворяли в равном объеме буфера. Количество альфа-синуклеина в белковой полосе определяли с использованием программного обеспечения ImageJ.

Чтобы убедиться в агрегации альфа-синуклеина в присутствии шаперонинов, мы оценили распределение белков между осадком и супернатантом через 24 часа с начала инкубации методом SDS-электрофореза в ПААГ. Как показано на рисунке 22, при спонтанной фибриллизации практически весь альфа-синуклеин переходит в осадок. В то же время при инкубации альфа-синуклеина совместно с шаперонинами в отсутствие АТР, большая часть альфа-синуклеина остается в супернатанте. При этом при инкубации альфа-синуклеина совместно с шаперонинами в присутствии АТР, основная часть альфа-синуклеина переходит в осадок. Это подтверждает ранее полученные нами данные.

Чтобы убедиться, что EL и OBP влияют на агрегацию альфа-синуклеина A53T и альфа-синуклеина дикого типа сходным образом, мы инкубировали шаперонины в тех же условиях, но совместно с альфа-синуклеином дикого типа.

Оба шаперонина при инкубации совместно с альфа-синуклеином дикого типа в отсутствие АТР препятствуют повышению интенсивности флуоресценции ThT. Вероятно, это обусловлено связыванием шаперонинов с альфа-синуклеином, что может понижать концентрацию свободного альфа-синуклеина и тем самым препятствовать его фибриллизации. В то же время, в присутствии АТР оба шаперонина сокращают продолжительность лаг-фазы (рис. 23).

Таким образом, исходя из полученных данных, можно предположить, что оба шаперонина действуют на альфа-синуклеин дикого типа и его мутантную форму A53T сходным образом, но с более длительными временными периодами, что, вероятно, связано с меньшей скоростью фибриллизации альфа-синуклеина дикого типа.

Таким образом, полученные результаты показывают, что разные по морфологии шаперонины (двухкольцевой EL и однокольцевой OBP) могут стимулировать фибриллизацию мономеров альфа-синуклеина в присутствии АТР и подавлять ее в отсутствие АТР. Однако, следует отметить, что

вышеперечисленные эксперименты не дают понять, каким образом шаперонины вовлечены в процесс фибриллизации альфа-синуклеина. Для более детального изучения был выбран шаперонин ОВР, поскольку он воздействует на процесс фибриллизации альфа-синуклеина наиболее эффективно.

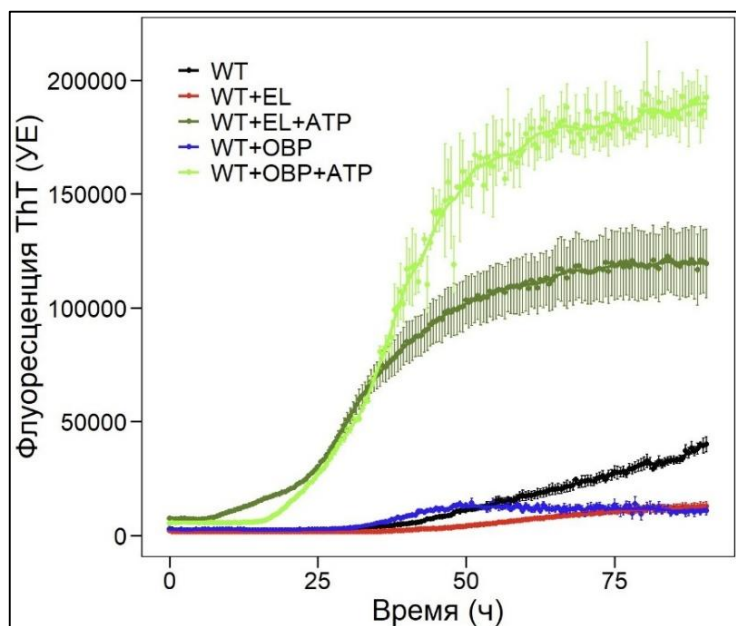


Рисунок 23. Изменение интенсивности флуоресценции ThT при инкубации альфа-синуклеина дикого типа (WT) совместно с фаговыми шаперонинами.

Агрегацию проводили в 50 мМ Трис-НСl буфере (рН 7,4), 100 мМ NaCl, 50 мМ KCl, 10 мМ MgCl₂ при 37°C и орбитальном встряхивании 600 об/мин без добавления или в присутствии 10 мМ АТР. Концентрации альфа-синуклеина дикого типа и шаперонинов составляли 50 и 2,5 мкМ, соответственно. Измерения флуоресценции ThT проводили каждые 30 мин. Данные представлены как среднее 3 измерений $\pm$ SE.

4.3.2. Цитотоксичность агрегатов альфа-синуклеина А53Т, образуемых под действием ОВР

Мы оценили цитотоксичность полученных нами *in vitro* агрегатов альфа-синуклеина А53Т для эмбриональных клеток почек НЕК293Т и клеток

нейробластомы SH-SY5Y. Для анализа мы использовали фибриллы, образованные спонтанно или под действием ОВР в присутствии АТР в течение 24-часовой инкубации, а также образец содержащий альфа-синуклеин A53T после инкубации с ОВР без АТР. В качестве контроля использовали мономеры альфа-синуклеина A53T и шаперонин ОВР по отдельности. Клетки инкубировали с образцами в течение 24 часов, затем оценивали выживаемость клеток с помощью МТТ-теста.

По результатам анализа как для НЕК293Т, так и для SH-SY5Y были получены сопоставимые результаты. Как показано на рисунке 24, мономеры альфа-синуклеина, а также шаперонин ОВР в отдельности не оказывали существенного влияния на жизнеспособность клеток.

В то же время токсичность агрегатов, образуемых альфа-синуклеином A53T в присутствии ОВР без АТР, сопоставима с токсичностью фибрилл, образуемых спонтанно. В данном случае выживаемость обеих линий клеток составила около 60%. Вероятно, токсичность препарата альфа-синуклеина, инкубируемого в присутствии ОВР без АТР обусловлена наличием в пробе коротких фибрилл и олигомеров через 24 часа инкубации.

Наибольшей токсичностью обладают фибриллы, образуемые при участии ОВР в присутствии АТР. Однако следует отметить, что статистически значимые результаты были получены нами лишь для клеток НЕК293Т. Такой эффект можно объяснить тем, что АТР-зависимое действие шаперонина приводит к образованию большего количества амилоидных фибрилл по сравнению со спонтанно протекающим процессом, что обеспечивает высокую токсичность образца.

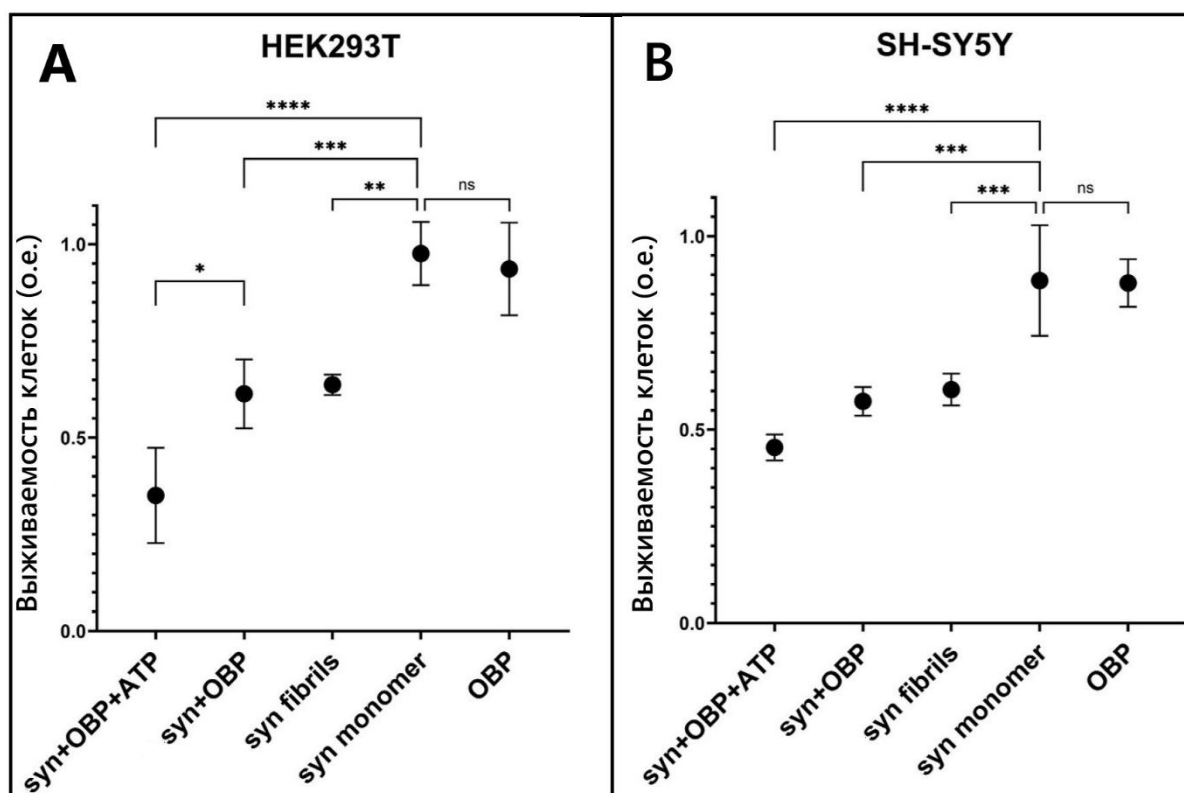


Рисунок 24. Влияние мономеров и амилоидных форм альфа-синуклеина A53T на жизнеспособность линий клеток HEK293T (A) и SH-SY5Y (B) с использованием МТТ-теста.

Клетки подвергались инкубировали в полной среде DMEM/F12, содержащей образцы альфа-синуклеина A53T в концентрации 0,8 мкМ: контрольный альфа-синуклеин до фибриллизации *in vitro* (syn monomer), альфа-синуклеин после 24-часовой инкубации с шаперонином OVP и ATP (syn+OVP+ATP), альфа-синуклеин после 24-часовой инкубации с шаперонином OVP без ATP (syn+OVP), альфа-синуклеин после 24-часовой спонтанной фибриллизации (syn fibrils) и контрольный образец шаперонина OVP (OVP). Результаты представлены как среднее 10 значение $\pm$ SD. Для выявления статистической значимости использовали однофакторный дисперсионный анализ с критерием множественного сравнения Бонферрони. Статистическая значимость: * скорректированное p-value <0,05; ** скорректированное p-value <0,01; *** скорректированное p-value <0,001; **** скорректированное p-value <0,0001, ns – незначимо.

5. Влияние однокольцевого шаперонина ОВР на агрегацию альфа-синуклеина A53T при коэкспрессии их генов в клетках млекопитающих.

5.1. Экспрессия шаперонина ОВР и альфа-синуклеина A53T при отдельной трансфекции клеток HEK293T плазмидами, содержащими их гены

Ранее нами было показано, что вирусные шаперонины, вероятно, могут АТР-зависимо способствовать амилоидизации альфа-синуклеина *in vitro*. Чтобы проверить влияние фаговых шаперонинов на амилоидную трансформацию альфа-синуклеина в условиях более близких к условиям *in vivo*, исследуемые белки были коэкспрессированы в клеточной линии эмбриональных почек человека HEK293T. Для экспериментов мы выбрали наиболее эффективно действующий на конверсию альфа-синуклеина однокольцевой шаперонин ОВР. Исследования проводили на мутантной форме альфа-синуклеина – A53T, для которой характерна более быстрая кинетика фибриллизации.

Для начала, чтобы проверить будут ли продуцироваться исследуемые нами белки в эукариотических клетках, мы трансфицировали клетки HEK293T плазмидой, содержащий ген 246, кодирующий шаперонин ОВР (pcDNA-ОВР). Аналогично, мы трансфицировали HEK293T плазмидой, содержащей ген SNCA с мутацией A53T, кодирующий мутантную форму альфа-синуклеина A53T (pcDNA-Syn_mut). На данном этапе мы с помощью вестерн-блот анализа проверили, в какой форме, растворимой или нерастворимой в Тритон X-100, продуцируются оба белка.

Через 2 дня после трансфекции pcDNA-ОВР, клетки лизировали PBS, содержащим Тритон X-100 и центрифугировали для разделения на растворимую и нерастворимую фракции. Полученные фракции анализировали с помощью электрофореза в денатурирующих условиях с последующим иммуноблоттингом. Как видно на рисунке 25А, в результате трансфекции ОВР эффективно продуцируется клетками в растворимой

форме, поскольку обнаруживается только во фракции супернатанта, что также подтверждается присутствием глицеральдегид-3-фосфатдеhydroгеназы (GAPDH).

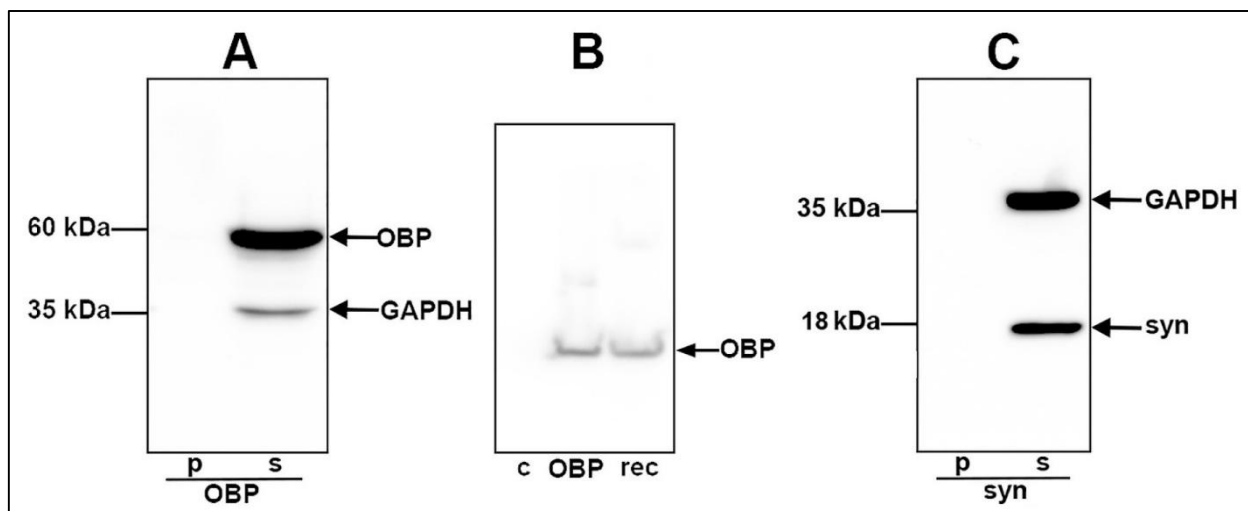


Рисунок 25. Вестерн-блот-анализ лизатов клеток HEK293T после трансфекции плазмидами, кодирующими шаперонин OBP (A, B) или мутантную форму альфа-синуклеина A53T (syn) (C). A и C – Нерастворимые (p) и растворимые в Тритон X-100 (s) фракции клеток через 48 часов после трансфекции плазмидами pcDNA-OBP (A) или pcDNA-syn_mut (C) после SDS-электрофореза в ПААГ и иммуноблоттинга с сывороткой против рекомбинантного OBP (A) или моноклональными антителами против альфа-синуклеина (C). B – Фракции нетрансфицированных клеток HEK293T, растворимые в Тритон X-100 (c), и клеток HEK293T через 48 часов после трансфекции плазмидой pcDNA-OBP (OBP) по сравнению с очищенным рекомбинантным шаперонином OBP, полученным в *E.coli* (rec). Образцы анализировали нативным электрофорезом с последующим иммуноблоттингом с мышинной сывороткой против рекомбинантного OBP. Мембраны также были окрашены первичными антителами против глицеральдегид-3-фосфатдеhydroгеназы (GAPDH) (A, C). В качестве вторичных антител использовали конъюгированные с пероксидазой хрена антимышинные антитела.

Поскольку ранее было показано, что рекомбинантный ОВР, продуцируемый клетками *E. coli*, представляет собой гептамер, обладающий функциональной активностью [47], мы проанализировали фракцию супернатанта с помощью нативного электрофореза с последующим иммуноблоттингом. Мы сравнили подвижность в геле очищенного рекомбинантного шаперонина ОВР, продуцируемого бактериальными клетками *E. coli*, с подвижностью шаперонина, продуцируемого клетками НЕК293Т (рис. 25В). По результатам эксперимента, оказалось, что оба белка в геле мигрируют одинаково, а значит шаперонин, продуцируемый клетками НЕК293Т, также имеет гептамерную структуру. Поэтому мы можем предположить, что шаперонин ОВР, продуцируемый клетками НЕК293Т, будет функционально активен.

Аналогично мы проанализировали распределение между растворимой и нерастворимой фракциями для лизатов клеток после их трансфекции плазмидой pcDNA-syn_mut. Как видно на рисунке 25С, альфа-синуклеин А53Т успешно продуцируется клетками. При этом, весь белок оказывается в растворимой в Тритон Х-100 фракции. Следует отметить, что в данном случае, альфа-синуклеин А53Т в клетках, вероятно, находится в мономерной форме, так как известно, что агрегированный альфа-синуклеин нерастворим в детергентах [195].

5.2. Оценка агрегации альфа-синуклеина А53Т в НЕК293Т при коэкспрессии альфа-синуклеина А53Т и ОВР в клетках

После отдельной трансфекции клеток НЕК293Т плазмидой pcDNA-ОВР или pcDNA-Syn_mut, мы трансфицировали клетки обеими плазмидами одновременно. Для визуализации белков в клетках мы использовали иммуноцитохимический анализ.

Как показано на рисунке 26, оба белка как по отдельности, так и при совместной экспрессии успешно продуцируются в клетках и

преимущественно диффузно распределены в цитоплазме. Анализ колокализации (рис 26g) показал, что во время совместной продукции по сравнению с их отдельной продукцией, не наблюдается существенных изменений в локализации каждого из белков. С помощью данного метода видимые агрегаты альфа-синуклеина A53T не были обнаружены.

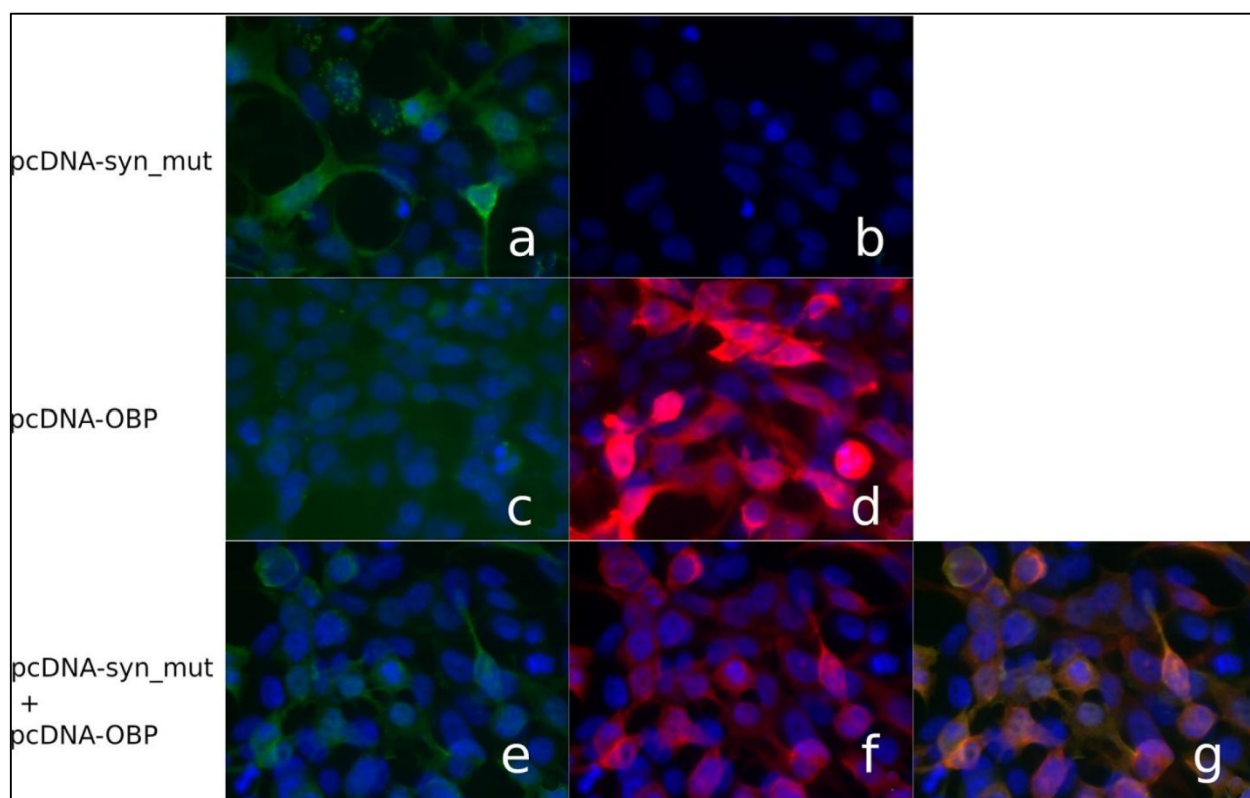


Рисунок 26. Иммуноцитохимический анализ клеток HEK293T, экспрессирующих альфа-синуклеин A53T и/или OBP. а, b - Транзиентная трансфекция клеток плазмидой, содержащей мутантный ген альфа-синуклеина A53T (pcDNA-syn_mut). с, d - Транзиентная трансфекция клеток плазмидой, содержащей ген шаперонина OBP (pcDNA-OBP). е, f, g - Транзиентная трансфекция клеток смесью плазмид, содержащих ген шаперонина OBP и ген альфа-синуклеина A53T (pcDNA-OBP + pcDNA-syn_mut).

Окрашивание антителами против альфа-синуклеина (зеленый канал, а, с, е) и сывороткой против рекомбинантного OBP (красный канал, b, d, f). Также,

показано объединенное изображение (зеленый и красный каналы, g). Ядра клеток были окрашены DAPI (синий, a-g).

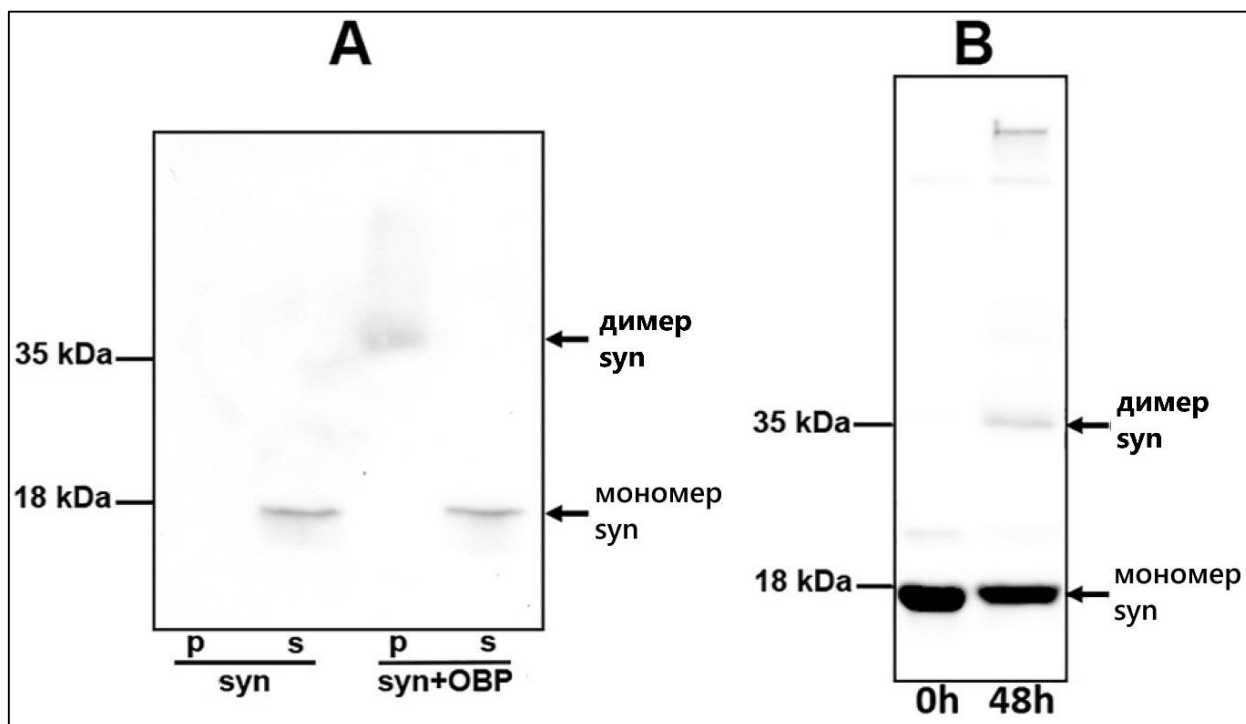


Рисунок 27. Вестерн-блот-анализ фракционированных лизатов клеток НЕК293Т после трансфекции плазмидой, кодирующей мутантную форму альфа-синуклеина А53Т (syn), и после котрансфекции плазмидами, кодирующими альфа-синуклеин А53Т и шаперонин ОВР (syn+ОВР) (A). Вестерн-блот-анализ нерастворимых фракций контрольных фибрилл, полученных *in vitro* с рекомбинантным шаперонином ОВР в присутствии АТР (B). Нерастворимые (p) и растворимые (s) в Тритон X-100 фракции клеток через 48 часов после трансфекции после SDS-электрофореза в ПААГ и иммуноблоттинга с мышиными моноклональными антителами против альфа-синуклеина (A). В качестве вторичных антител использовали антимышиные антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена. Показан тот же анализ нерастворимых в Тритоне X-100 фракций контрольных фибрилл альфа-синуклеина, полученных *in vitro* с рекомбинантным ОВР и АТР в начале (0 ч) и в конце (48 ч) фибриллизации (B).

Для выявления потенциальных олигомеров или агрегатов альфа-синуклеина, образующихся при его совместной экспрессии с фаговым шаперонином, был использован другой более чувствительный метод, а именно вестерн-блот-анализ фракционированных лизатов клеток.

Как видно на рисунке 27А, иммуноблоттинг с моноклональными антителами против альфа-синуклеина фракционированных лизатов после коэкспрессии генов обоих белков показал, что большая часть альфа-синуклеина А53Т действительно остается в виде мономера во фракции супернатанта, однако во фракции осадка наблюдается минорная полоса, которая по массе соответствует димерам альфа-синуклеина. Помимо этого, над полосой с димерами мы наблюдаем нечеткий шмер, который может представлять собой различные олигомерные формы альфа-синуклеина.

Для сравнения мы таким же образом проанализировали фибриллы альфа-синуклеина А53Т, полученные *in vitro* с участием рекомбинантного шаперонина ОВР в присутствии АТР (Материалы и методы, раздел 5.1). Было обнаружено, что в нерастворимой в Тритоне Х-100 фракции таких фибрилл в дополнение к полосам мономера альфа-синуклеина четко обнаруживались полосы димера и высокомолекулярных продуктов (рис. 27В).

Таким образом, шаперонин ОВР, вероятно, способствует агрегации альфа-синуклеина А53Т в клетках НЕК293Т.

5.3. Влияние коэкспрессии генов альфа-синуклеина А53Т и ОВР на выживаемость эукариотических клеток

Так как при коэкспрессии белков образуются агрегированные формы альфа-синуклеина, мы проанализировали, как это влияет на выживаемость клеток (рис. 28). Поскольку клеточные пути агрегации альфа-синуклеина представляют интерес для моделирования патологических процессов при синуклеинопатиях, в дополнение к цитотоксичности в клеточной линии

HEK293T, эффект коэкспрессии был оценен на клеточной линии SH-SY5Y, как общепринятой нейроноподобной модели [196].

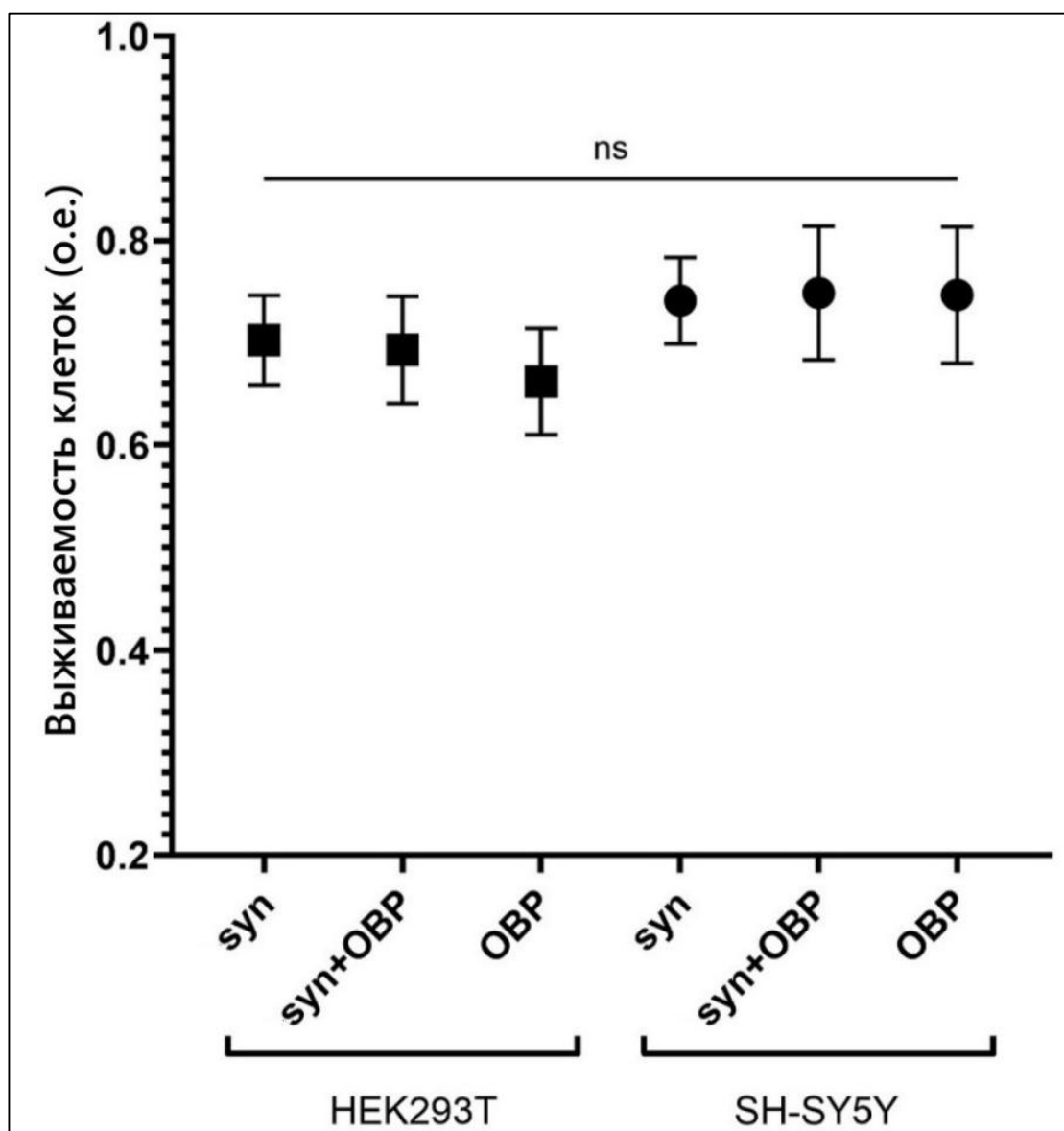


Рисунок 28. Влияние трансфекции линий клеток HEK293T и SH-SY5Y плазмидой, кодирующей альфа-синуклеин A53T (syn), плазмидой, кодирующей шаперонин OBR (OBR), или смесью этих плазмид (syn+OBR) на жизнеспособность клеток с использованием МТТ-теста. Пропорции функциональных клеток через 3 дня после трансфекции показаны в сравнении с нетрансфицированными клетками. Различия внутри каждой линии клеток статистически не значимы (ns).

Результаты представлены как среднее 10 значений $\pm$ SD. Для выявления статистической значимости использовали однофакторный дисперсионный анализ с критерием множественного сравнения Бонферрони.

По результатам МТТ-теста через 3 дня после трансфекции не было выявлено разницы в жизнеспособности клеток двух линий при экспрессии альфа-синуклеина и шаперонина ОВР по отдельности или совместно.

Полученные данные свидетельствуют о том, что количество олигомерных форм, накапливаемых в клетке при коэкспрессии альфа-синуклеина А53Т и ОВР, недостаточно для значимого цитотоксического эффекта, или, что такие формы обладают свойствами, отличными от свойств олигомеров альфа-синуклеина, образующихся в отсутствие шаперонина. Однако не исключена вероятность, что достаточное количество токсичных форм альфа-синуклеина А53Т может образоваться в клетках за более длительное время инкубации.

6. Влияние делеционных мутантов ОВР на агрегацию альфа-синуклеина А53Т

Как известно, мутации белков помогают лучше понять механизм их функционирования. Поэтому для более глубокого понимания воздействия ОВР на фибриллизацию альфа-синуклеина А53Т, мы исследовали влияние его апикального домена (AD) и мутантной формы шаперонина, не содержащей апикальных доменов (ОВР Δ AD).

6.1. Влияние апикального домена ОВР на амилоидизацию альфа-синуклеина А53Т

Известно, что апикальные домены шаперонинов отвечают за узнавание и связывание белков-субстратов. Мы проанализировали, как будет меняться кинетика амилоидизации альфа-синуклеина А53Т при добавлении AD. Для

этого мы инкубировали альфа-синуклеин A53T совместно с AD и следили за образованием амилоидных фибрилл по увеличению флуоресценции ThT.

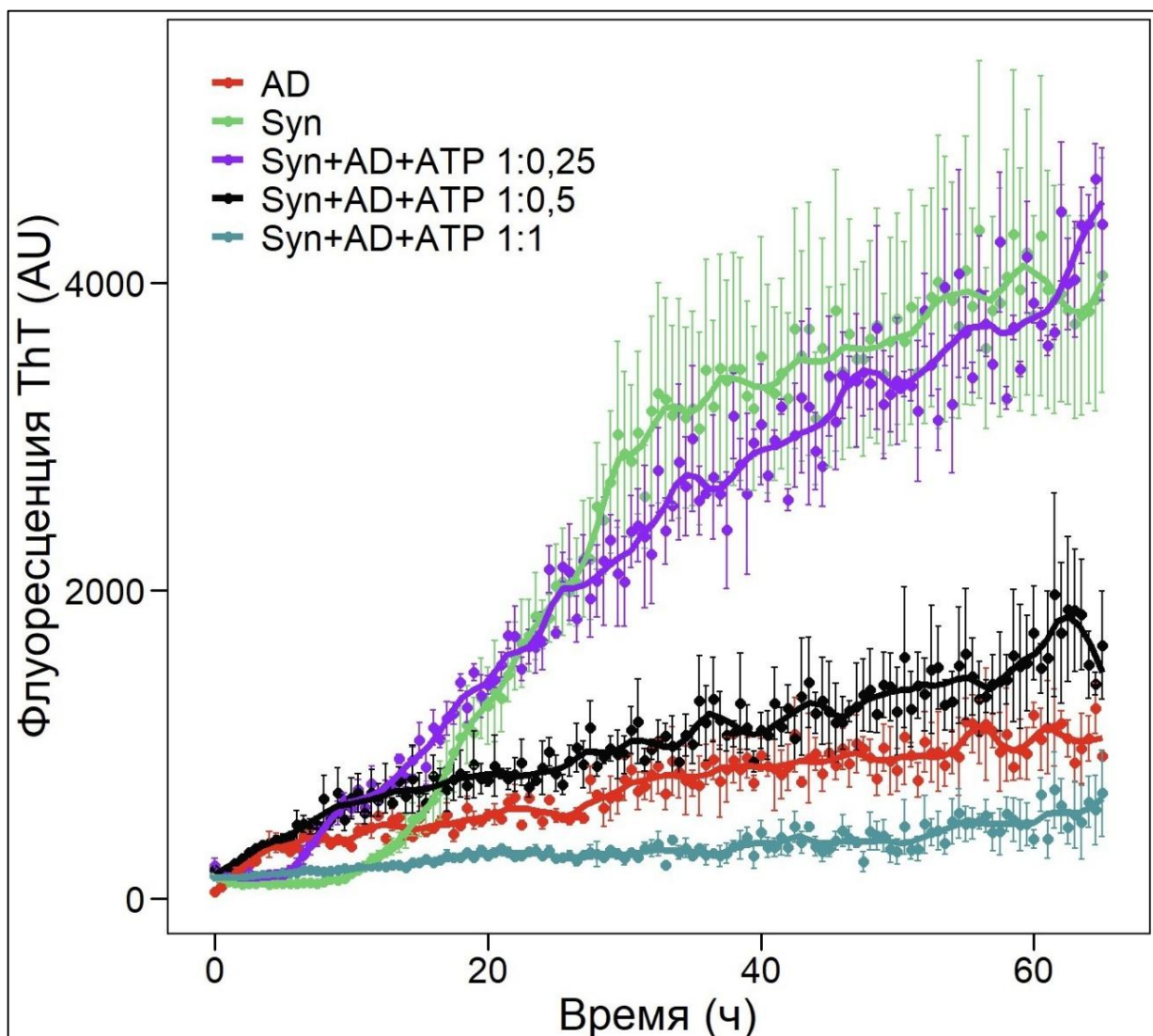


Рисунок 29. Влияние апиального домена (AD) шаперонина OBP на агрегацию альфа-синуклеина A53T (Syn). Изменение флуоресценции ThT во время фибриллизации при различных соотношениях белков в образце.

Инкубацию проводили в 50 мМ буфере Трис-НCl (pH 7,5), 100 мМ NaCl, 50 мМ KCl, 10 мМ MgCl₂, 0,02% NaN₃ и 0,5 мМ ThT при 37 °C с орбитальным встряхиванием со скоростью 700 об/мин. Концентрации мономеров альфа-синуклеина A53T и ATP составляли 50 мкМ и 10 мМ, соответственно.

Результаты эксперимента представлены на рис 29. Была использована постоянная концентрация мономеров альфа-синуклеина равная 50 мкМ и разные соотношения альфа-синуклеин:AD. При соотношениях 1:0,5 и 1:1 флуоресценция ThT значительно снижается, причем пропорционально концентрации используемого AD. При соотношении 1:0,25 кривая практически не отличается от контрольной кривой для альфа-синуклеина в отсутствие AD. Полученные результаты свидетельствуют о том, что рекомбинантный AD препятствует конверсии альфа-синуклеина A53T в амилоидные фибриллы. Более того, на основании полученных данных мы можем предположить, что AD связывает альфа-синуклеин в растворе, а увеличение интенсивности флуоресценции ThT происходит за счет конверсии свободных, не связавшихся с AD мономеров альфа-синуклеина, которые могут инициировать образование фибрилл. В отличие от полноразмерного шаперонина, AD препятствует фибриллизации альфа-синуклеина даже в присутствии АТР, что указывает на возможность его применения в качестве антиамилоидного агента.

6.2. Влияние мутантной формы ОВР, лишенной апикальных доменов, на фибриллизацию альфа-синуклеина A53T

При изучении влияния ОВРΔAD на фибриллизацию альфа-синуклеина A53T оказалось, что он действует сходным образом, что и полноразмерный ОВР (рис. 30). Хотя ОВРΔAD менее термостабилен в отсутствие АТР, эксперименты по флуоресценции ThT показали, что при инкубации белка совместно с альфа-синуклеином A53T интенсивность флуоресценции не увеличивается на протяжении всего эксперимента. Полученные данные свидетельствуют о том, что ОВРΔAD так же, как и полноразмерный шаперонин, способен связываться с альфа-синуклеином A53T и тем самым препятствовать его спонтанной фибриллизации.

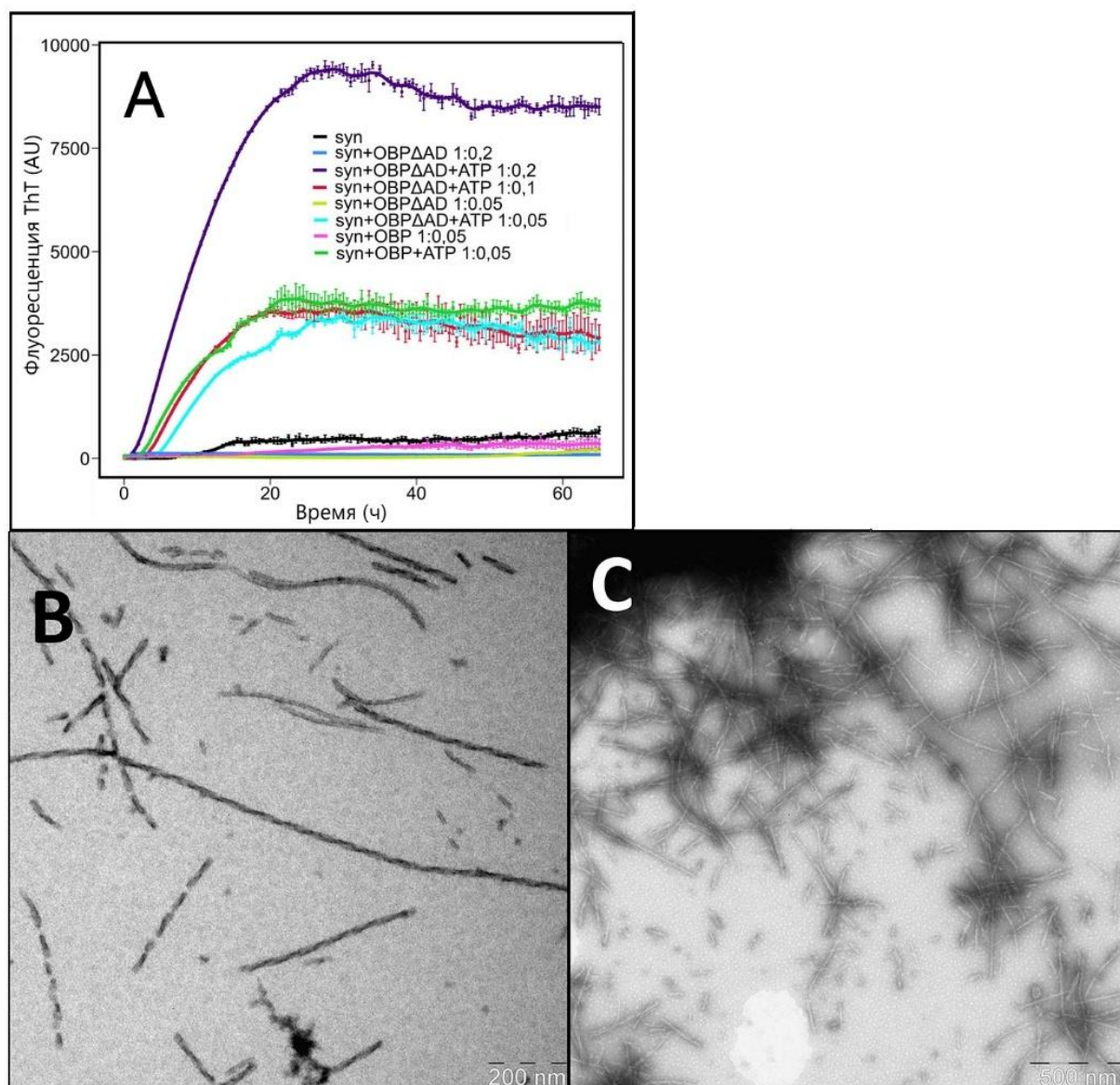


Рисунок 30. Сравнение влияния шаперонинов ОВР и ОВРΔAD на фибриллизацию альфа-синуклеина A53T (syn). **А)** Изменение флуоресценции ThT в процессе инкубации; **В)** ТЭМ изображение фибрилл альфа-синуклеина, полученных после 67-часовой инкубации с мутантной формой шаперонина ОВРΔAD в присутствии АТР; **С)** ТЭМ изображение фибрилл альфа-синуклеина, полученных после 67-часовой инкубации с полноразмерным шаперонином ОВР в присутствии АТР

Фибриллизацию проводили в 50 мМ буфере Трис-НCl (рН 7,5), 100 мМ NaCl, 50 мМ KCl, 10 мМ MgCl₂, 0,02% NaN₃ и 0,5 мМ ThT при 37°C и орбитальном встряхивании 700 об/мин. Концентрации мономеров альфа-синуклеина и АТР составили 50 мкМ и 10 мМ, соответственно.

При инкубации ОВРΔAD совместно с альфа-синуклеином A53T в присутствии АТР мы также наблюдаем уменьшение начальной лаг-фазы по сравнению со спонтанным процессом, причем эффект ОВРΔAD на длительность лаг-фазы дозозависим. Так, времена задержки при соотношениях альфа-синуклеин:ОВРΔAD, равных 1:0,05, 1:0,1 и 1:0,2 составили 4,6, 3,7 и 2,3 часов, соответственно. Стоит также отметить, что мутантная форма действует с меньшей эффективностью по сравнению с полноразмерным шаперонином. Так, время лаг-фазы для полноразмерного шаперонина в соотношении 1:0,05 составило 3,6 часов, в то время как для мутантной формы – 4,6 часа.

Чтобы убедиться, что полученные значения флуоресценции ThT обусловлены образованием амилоидных фибрилл альфа-синуклеина, мы сравнили морфологию полученных агрегатов с помощью ТЭМ (рис. 30 В и С). Как ОВРΔAD, так и полноразмерный ОВР через 67 часов инкубации в присутствии АТР образуют фибриллы альфа-синуклеина, имеющие скрученную, плетёную форму, длиной до 1 мкм. Однако, следует отметить, что, несмотря на схожую морфологию фибрилл на микрографиях, только структурные исследования с высоким разрешением позволят сделать вывод об их идентичности или разнице.

7. Влияние фаговых шаперонинов на агрегацию прионного белка

7.1. Влияние однокольцевого ОВР и двухкольцевого EL на агрегацию прионного белка

Как известно из литературных данных, шаперонины, такие как GroEL, оказывают пагубное действие на развитие патологии прионного белка. В связи с этим представляло интерес исследовать эффект фаговых шаперонинов, а именно однокольцевого ОВР и двухкольцевого EL, на процесс агрегации прионного белка.

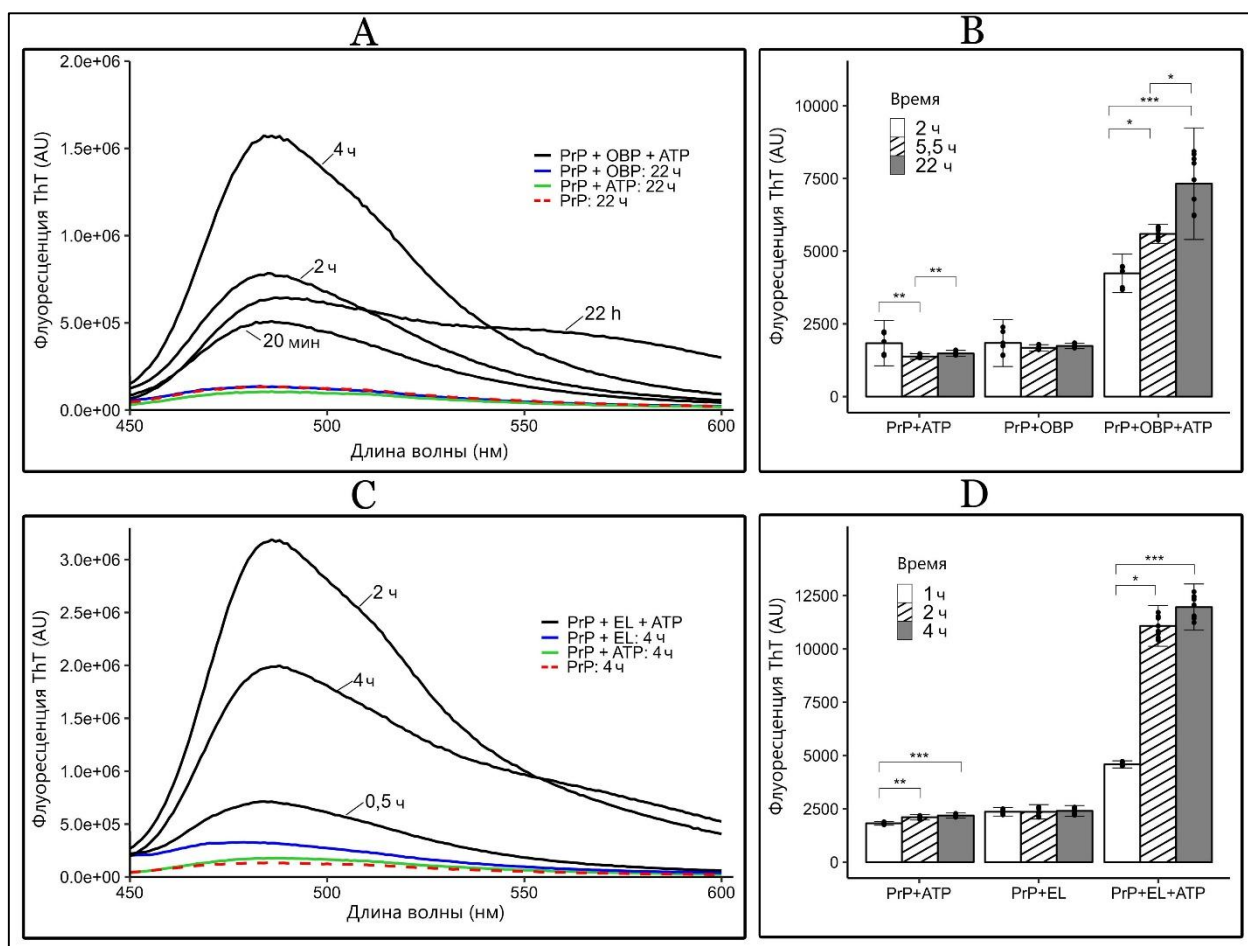


Рисунок 31. Влияние однокольцевого шаперонина ОВР и двухкольцевого EL на амилоидную трансформацию мономеров прионного белка (PrP). **А** и **С** – Изменение спектров флуоресценции ThT; **В** и **Д** – изменение флуоресценции ThT при фиксированной длине волны 482 нм.

Фибриллизацию проводили в 50 мМ Трис-НСl буфере (рН 7,5), 50 мМ КCl, 10 мМ MgCl₂ при 25°C и орбитальном встряхивании 570 об/мин. Концентрации мономеров прионного белка, каждого шаперонина и АТФ составляли 10 мкМ, 1 мкМ и 10 мМ, соответственно. На рисунках А и С показаны только спектры, соответствующие максимальному времени фибриллизации для образцов PrP, PrP+АТФ, PrP+ОВР и PrP+EL. Для образцов PrP+ОВР+АТФ и PrP+EL+АТФ показаны спектры для различных времен фибриллизации (время указано около каждой кривой). Статистически значимые различия по флуоресценции ThT при 482 нм определены по критерию Краскела-Уолиса с последующим апостериорным тестом Данна с поправкой Холма. Статистическая значимость: * p-value <0,05, *** p-value <0,001.

Для проведения экспериментов мы выбрали условия, в которых не происходит спонтанной амилоидизации прионного белка, а именно: рН, близкий к нейтральному, $T = 25^{\circ}\text{C}$ и отсутствие в растворе детергентов. Таким образом, теоретически единственное, что могло повлиять на конверсию прионного белка в наших условиях – добавление вирусных шаперонинов. Мы проводили реакцию как в присутствии, так и в отсутствие АТР, чтобы убедиться, что оказываемый эффект связан именно с функционированием шаперонинов. Концентрация АТР подбиралась на основании рассчитанной АТР-разной активности шаперонинов с учетом продолжительности эксперимента.

В процессе инкубации мы отбирали аликвоты из реакционных смесей и измеряли флуоресценцию ThT. Чтобы подтвердить, что увеличение интенсивности флуоресценции связано с агрегацией прионного белка, помимо измерения флуоресценции при фиксированной длине волны, равной 482 нм, мы снимали спектры флуоресценции в диапазоне от 450 до 600 нм, а также дополняли исследование ТЭМ, ДРС, а также другими методами.

Из результатов эксперимента следует, что в данных условиях действительно не происходит спонтанной конверсии и агрегации прионного белка за время эксперимента (рис. 31). Интенсивность флуоресценции ThT остается на низком уровне, и не происходит изменения формы спектра флуоресценции ThT. Кроме того, при инкубации мономеров прионного белка совместно шаперонинами в отсутствие АТР также не происходит заметных изменений указанных параметров (рис. 31). Таким образом, можно предположить, что фаговые шаперонины EL и OBP в отсутствие АТР в выбранных условиях не влияют на агрегацию прионного белка.

Однако, инкубация мономеров прионного белка совместно с шаперонинами в присутствии АТР давала противоположный результат. В данном случае значительно увеличивается интенсивность флуоресценции ThT, что может говорить об образовании амилоидных структур (рис. 31). Со

временем мы наблюдаем искажение спектра флуоресценции, а именно уменьшение пика на 482 нм и появление пика на 555 нм. Для ОВР дополнительный пик мы наблюдаем через 22 часа инкубации, в то время как у EL он начинает появляться уже через 4 часа.

Чтобы убедиться, что увеличение флуоресценции действительно связано с агрегацией прионного белка, параллельно мы отбирали аликвоты из реакционной смеси и оценивали распределение прионного белка между осадком и супернатантом.

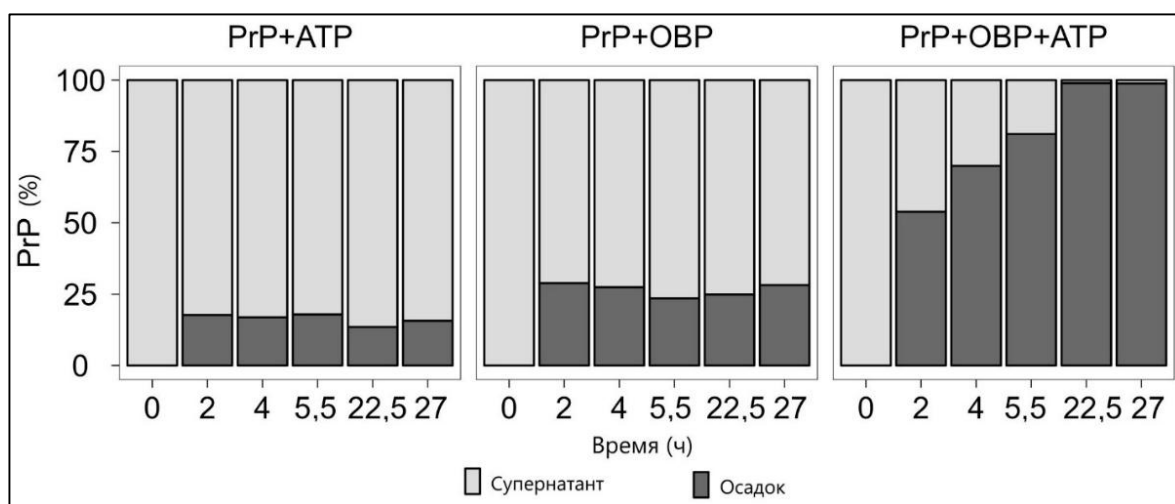


Рисунок 32. Распределение прионного белка (PrP) между фракциями супернатанта и осадка при фибриллизации прионного белка в присутствии однокольцевого шаперонина ОВР без добавления АТР (PrP+ОВР) и с добавлением АТР (PrP+ОВР+АТР) по сравнению со спонтанной фибриллизацией мономеров прионного белка (PrP).

Фибриллизацию проводили в 50 мМ Трис-НСl буфере (рН 7,5), 50 мМ KCl, 10 мМ MgCl₂ при 25°C и орбитальном встряхивании 570 об/мин. Концентрации прионного белка, шаперонина ОВР и АТР составляли 10 мкМ, 1 мкМ и 10 мМ, соответственно. Образцы центрифугировали при 12000g в течение 10 мин. Фракции супернатанта и осадка анализировали с помощью SDS-электрофореза в 10% полиакриламидном геле. Количество прионного белка в белковой полосе определяли с использованием программного обеспечения ImageJ.

Результаты, отраженные на рисунке 32, показывают, что в случае инкубации без добавления шаперонина, прионный белок остается преимущественно в растворимой форме на протяжении всего эксперимента, что свидетельствует о том, что в этих условиях не происходит спонтанного образования агрегатов прионного белка. При инкубации прионного белка с шаперонинами в отсутствие АТР количество прионного белка в осадке также оставалось примерно на одном уровне и не превышало 25%.

В то же время, при инкубации прионного белка совместно с шаперонином ОВР в присутствии АТР более половины мономеров прионного белка агрегировали через 2 часа, и почти все мономеры находились в агрегированном состоянии через 22 часа инкубации.

Таким образом, полученные нами результаты по распределению белков между осадком и супернатантом подтверждают, что увеличение интенсивности флуоресценции ThT, вероятно, связано с агрегацией прионного белка.

Так как агрегация фибрилл является характерным свойством, наблюдаемым во время трансформации прионного белка при $pH > 7$ [197], мы решили убедиться, что наблюдаемое искажение спектра действительно связано с образованием крупных частиц. Для этого мы оценили размер образуемых агрегатов методом ДРС (рис. 33). Согласно полученным данным, в процессе инкубации действительно происходит значительное увеличение диаметра частиц по сравнению с исходными белками. Так, через 4,5 часа инкубации диаметр частиц становится выше 500 нм, в то время как исходные диаметры прионного белка и шаперонинов составляют 7 и 19 нм, соответственно.

Стоит также отметить, что диаметр частиц через 4,5 часа после инкубации прионного белка отдельно и прионного белка совместно с шаперонинами без добавления АТР не изменяется по сравнению с

исходными белками, что говорит об отсутствии агрегации в данных случаях. Это также подтверждает полученные нами ранее результаты.

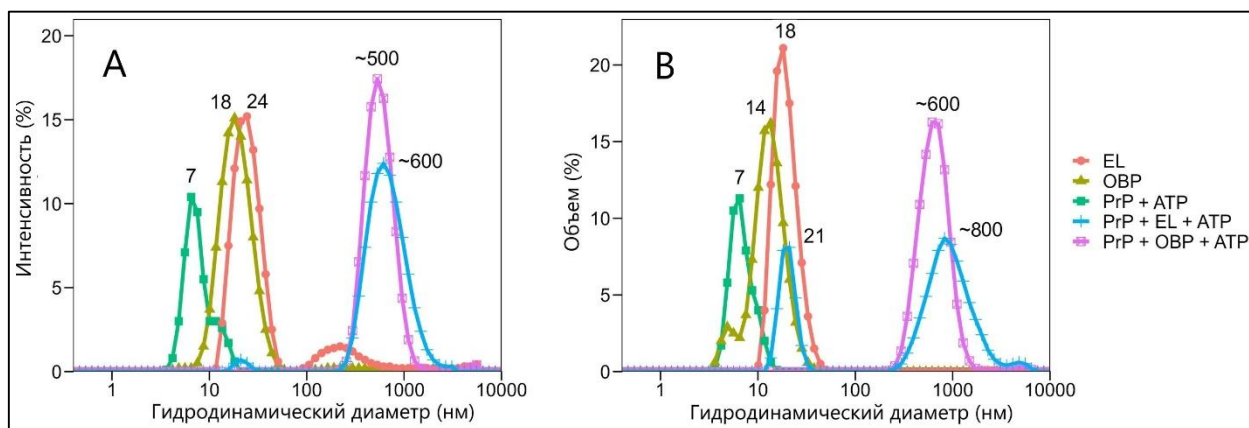


Рисунок 33. Гидродинамический диаметр частиц после 4,5 часа инкубации мономеров прионного белка (PrP) с однокольцевым шаперонином ОВР и двухкольцевым шаперонином EL в присутствии АТР. Показана зависимость интенсивности (А) и объема (В) образующихся агрегатов от их гидродинамического диаметра в сравнении с исходными мономерами прионного белка и шаперонинами.

Концентрации прионного белка, шаперонина ОВР и АТР составляли 10 мкМ, 1 мкМ и 10 мМ, соответственно.

Кроме того, образование крупных агрегатов прионного белка при его инкубации с шаперонинами в присутствии АТР также подтверждаются данными ТЭМ. За 4 часа инкубации при участии однокольцевого шаперонина ОВР в присутствии АТР образуются короткие фибриллы прионного белка длиной менее 100 нм (рис. 34А). С увеличением времени инкубации происходит агрегация этих фибрилл с образованием крупных кластеров, которые можно наблюдать на микрографиях через 24 часа инкубации (рис. 34В). По сравнению с однокольцевым ОВР двухкольцевой шаперонин EL функционирует эффективней, и крупные агрегаты формируются уже через 4,5 часа с начала инкубации (рис. 34 С и D).

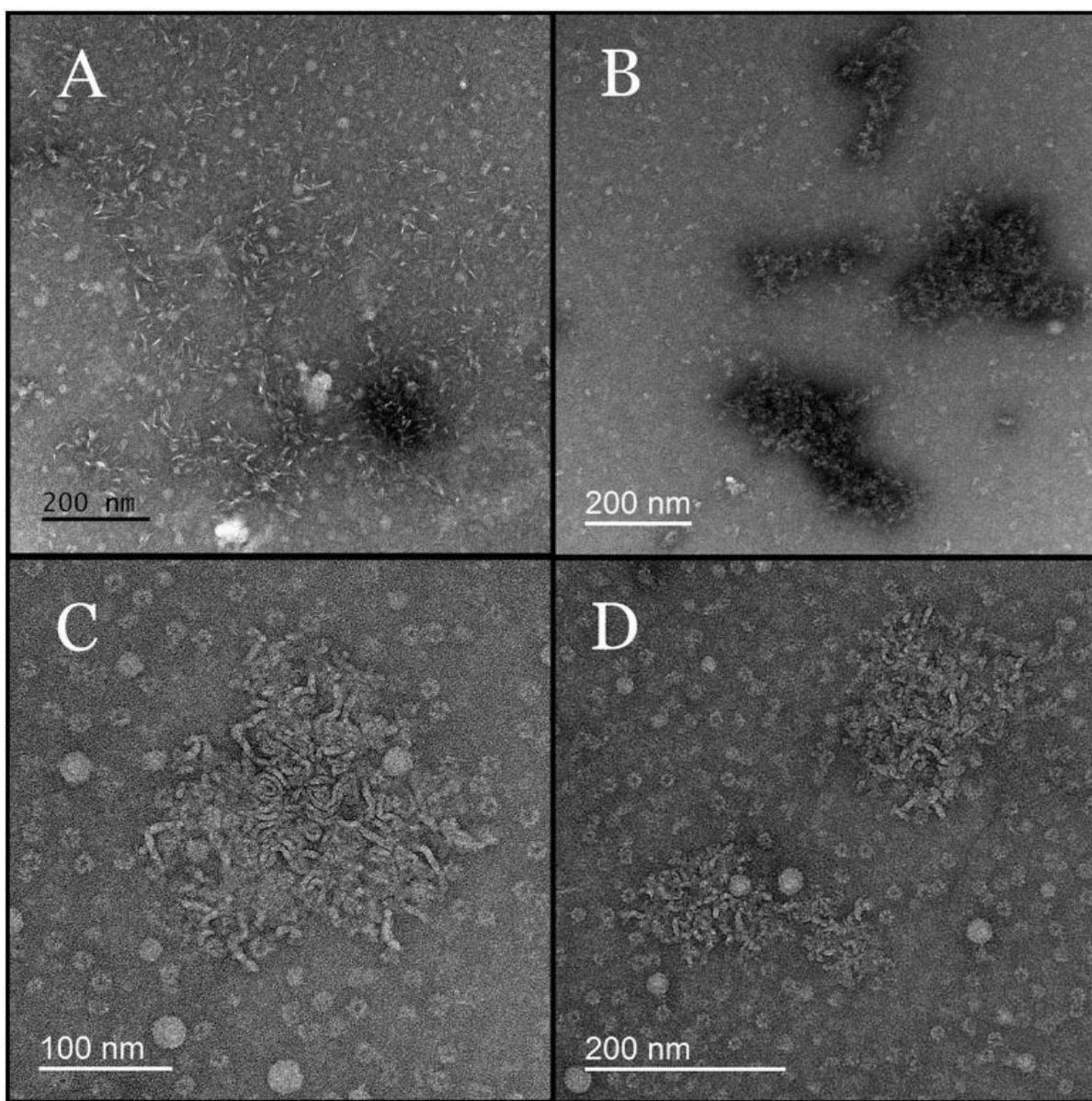


Рисунок 34. Изображения, полученные с помощью ТЭМ, агрегатов прионного белка, образованных при его совместной инкубации с однокольцевым шаперонином ОВР через 4 часа (А) и 24 часа (В), а также с двухкольцевым шаперонином EL через 4,5 часа (С, D) в присутствии АТР.

Помимо флуоресценции ThT, для подтверждения амилоидной природы полученных нами агрегатов, мы использовали метод анализа расщепления протеиназой К (РК). Как известно из литературных данных, отличительной особенностью амилоидных фибрилл прионного белка является наличие характерного РК-резистентного ядра, состоящего из бета-листов. После кратковременного нагревания до 80°C в присутствии детергента, так

называемого созревания фибрилл, размер этого ядра увеличивается с 12 кДа до 16 кДа [198].

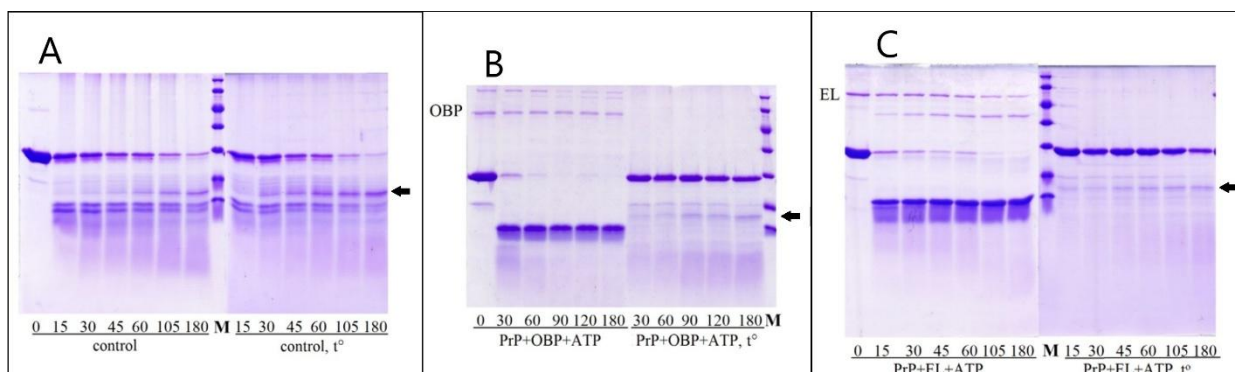


Рисунок 35. Электрофореграммы продуктов гидролиза фибрилл прионного белка, спонтанно сформированных при pH 4,0 (А) и генерированных однокольцевым шаперонином ОВР (В) и двухкольцевым шаперонином EL (С) в присутствии АТР после расщепления протеиназой К (РК).

В левой части гелей (А, В, С) нанесены исходные фибриллы после расщепления РК. В правой части гелей (А, В, С) нанесены зрелые фибриллы после термической обработки при 80°C в течение 15 мин (t°) и расщепления РК. Время гидролиза (мин) указано под дорожками геля. М — маркеры молекулярной массы (сверху вниз: 116; 66,2; 45; 35; 25; 18,4 и 14,4 кДа). Стрелка указывает на полосу белка 16 кДа, соответствующую РК-устойчивому фрагменту зрелых фибрилл прионного белка.

Для подтверждения амилоидной природы агрегатов, образуемых под действием ОВР и EL в присутствии АТР, мы подвергли их протеолитическому расщеплению протеиназой К до и после термообработки. Продукты гидролиза анализировали SDS-электрофорезом. В качестве контроля использовали амилоидные фибриллы прионного белка, полученные в результате спонтанной фибриллизации мономеров прионного белка в присутствии денатурирующего агента GuHCl при pH 4,0. Результаты эксперимента представлены на рисунке 35. В контрольных фибриллах

картина белковых полос после термообработки меняется незначительно, хотя полоса массой 16 кДа оказывается более выраженной в зрелых фибриллах. Фибриллы прионного белка, образующиеся под действием фаговых шаперонинов до и после созревания, демонстрируют различный характер продуктов протеолиза. В исходных фибриллах большая часть полноразмерного прионного белка быстро расщепляется с образованием набора продуктов массой около 12 кДа и ниже, что аналогично соответствующей картине для контрольных фибрилл. В термообработанных образцах шаперонин-индуцированных фибрилл, как и в контроле, можно наблюдать появление полосы 16 кДа, интенсивность которой увеличивается со временем гидролиза, что указывает на наличие зрелых амилоидных фибрилл.

Таким образом, мы подтвердили, что оба шаперонина действительно АТР-зависимым образом индуцировали образование амилоидных форм прионного белка, причем полученные фибриллы обладают морфологией, отличной от длинных прямых фибрилл, которые образуются спонтанно в условиях кислого рН, как было продемонстрировано в предыдущих исследованиях [199]. При этом следует отметить, что в данном случае двухкольцевой шаперонин EL действует эффективнее, чем однокольцевой ОВР.

7.2. Влияние агрегатов, образуемых под действием шаперонина ОВР, на выживаемость эукариотических клеток

Как известно, разные формы прионного белка обладают различной токсичностью. Согласно литературным данным наиболее токсичной формой являются олигомеры из-за высокой доступности гидрофобных поверхностей в своей структуре. В то же время фибриллы имеют всего 2 такие поверхности на своих концах, поэтому они относительно не токсичны [200]. Поэтому была проанализирована цитотоксичность фибрилл прионного белка, образуемых при АТР-зависимом участии шаперонина ОВР за 4 и 24 часа, для

клеток нейробластомы SH-SY5Y. Помимо этого, мы сравнили цитотоксичность таких фибрилл с цитотоксичностью фибрилл, спонтанно образовавшихся при pH 4,0 за 48 часов.

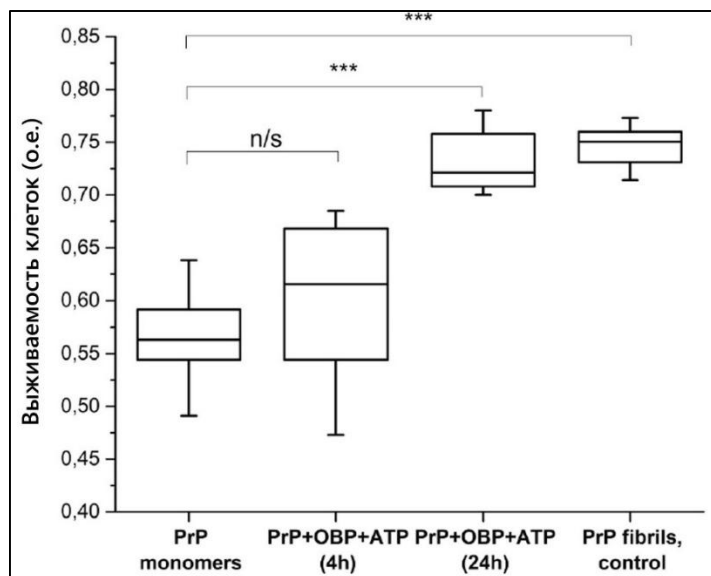


Рисунок 36. Влияние мономеров и агрегатов прионного белка (PrP) на жизнеспособность клеточной линии SH-SY5Y, определенное с использованием МТТ-теста.

Клетки инкубировали в полной среде DMEM/F12, содержащей следующие образцы в концентрации 20 мкМ: мономеры прионного белка (PrP monomers); агрегаты прионного белка, образованные после 4- и 24-часовой инкубации с однокольцевым шаперонином OBP и ATP (PrP+OBP+ATP); контрольные фибриллы, образованные путем 48-часовой спонтанной трансформации мономеров прионного белка при pH 4,0 с GuHCl (PrP fibrils control). Данные представлены как среднее 6 значений $\pm$ SD. Для сравнения результатов использовали тест Манна-Уитни. Статистическая значимость была установлена на уровне $p < 0,01$. Статистически значимые различия в жизнеспособности клеток SH-SY5Y обозначены звездочками, «n/s» указывает на незначимую разницу.

Согласно полученным результатам МТТ-теста, отображенным на рисунке 36, самая низкая токсичность для клеток SH-SY5Y после инкубации их с образцами в течение 24 часов наблюдается для кластеров фибрилл, полученных при помощи ОВР, или для контрольных фибрилл, образуемых спонтанно. В обоих случаях выживаемость клеток составила около 75%. Короткие фибриллы, полученные через 4 часа инкубации с ОВР и АТР, оказали значимо более токсическое действие, в данном случае выживаемость клеток составила около 60%. Это согласуется с ранее опубликованными данными о том, что фибриллы прионного белка овцы не оказывают токсического действия на первичные кортикальные нейроны, тогда как мономеры в концентрациях, сравнимых с использованными в наших экспериментах, показали значительно более высокий уровень цитотоксичности, чем контроль [200].

В нашей системе наиболее токсичной формой в отношении клеток нейробластомы SH-SY5Y оказались мономеры прионного белка. Однако, согласно литературным данным, известно, что мономеры прионного белка превращаются в олигомеры при pH 7,2 и нагревании до 72°C в течение 15 мин [201]. В наших экспериментах образцы прионного белка инкубировали с клетками в культуральной среде (pH 7,2) при 37°C в течение 24 часов. Вероятно, длительная инкубация при повышенной температуре также может способствовать превращению мономерного прионного белка в более цитотоксичные олигомеры. Для подтверждения данного предположения, был проведен сравнительный анализ размера частиц мономеров прионного белка, инкубированных в культуральной среде при 37°C в течение 24 часов, с предварительно инкубированными мономерами прионного белка с использованием метода ДРС (рис. 37). Полученные результаты показывают снижение пика мономеров прионного белка и появление дополнительных пиков более крупного размера частиц в образце, инкубированном при 37°C, по сравнению с гомогенным предварительно инкубированным образцом, что

указывает на то, что большая часть мономеров прионного белка превращается в олигомеры во время инкубации.

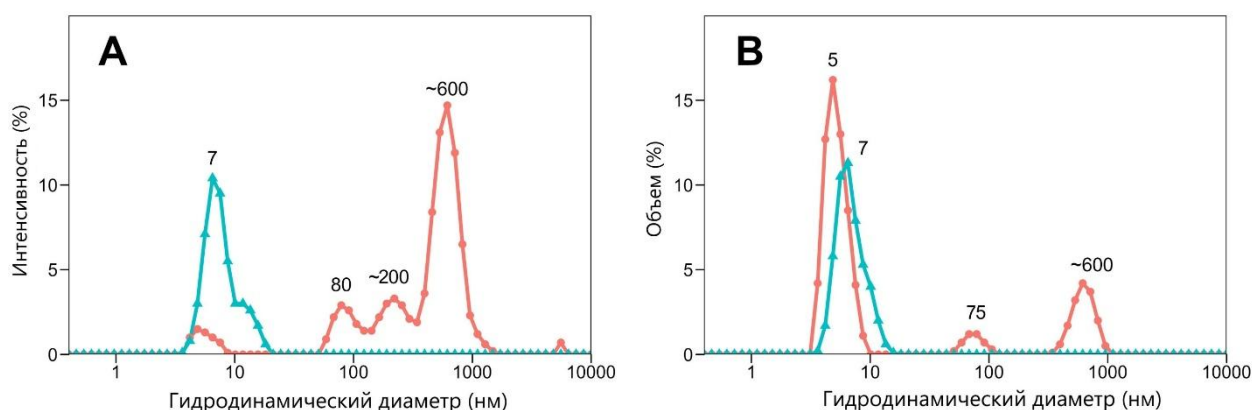


Рисунок 37. Гидродинамический диаметр частиц после 24-часовой инкубации мономеров прионного белка при 37°C в среде DMEM/F12 (красные линии) и предварительно инкубированных мономеров прионного белка (синие линии). Показана зависимость интенсивности (А) и объема (В) образующихся агрегатов от их гидродинамического диаметра.

Таким образом, при инкубации с мономерами прионного белка функционально активный шаперонин ОВР, по-видимому, ускоряет превращение токсичных изоформ прионного белка в крупные нетоксичные амилоидные агрегаты. Цитотоксические свойства таких агрегатов аналогичны свойствам спонтанно образующихся агрегатов прионного белка.

7.3. Влияние мутантной формы шаперонина ОВР без апикальных доменов на агрегацию прионного белка

Мы проанализировали, как влияет ОВРΔAD на конверсию прионного белка. Как и в случае с полноразмерным ОВР, реакцию проводили при постоянной концентрации прионного белка, равной 10 мкМ, pH 7,5 и T = 25°C. Прионный белок инкубировали с ОВРΔAD в молярных соотношениях прионный белок:ОВРΔAD, равных 1:0,1 и 1:0,2 как в присутствии, так и в

отсутствие АТР. За образованием агрегатов следили по изменению спектров флуоресценции ThT.

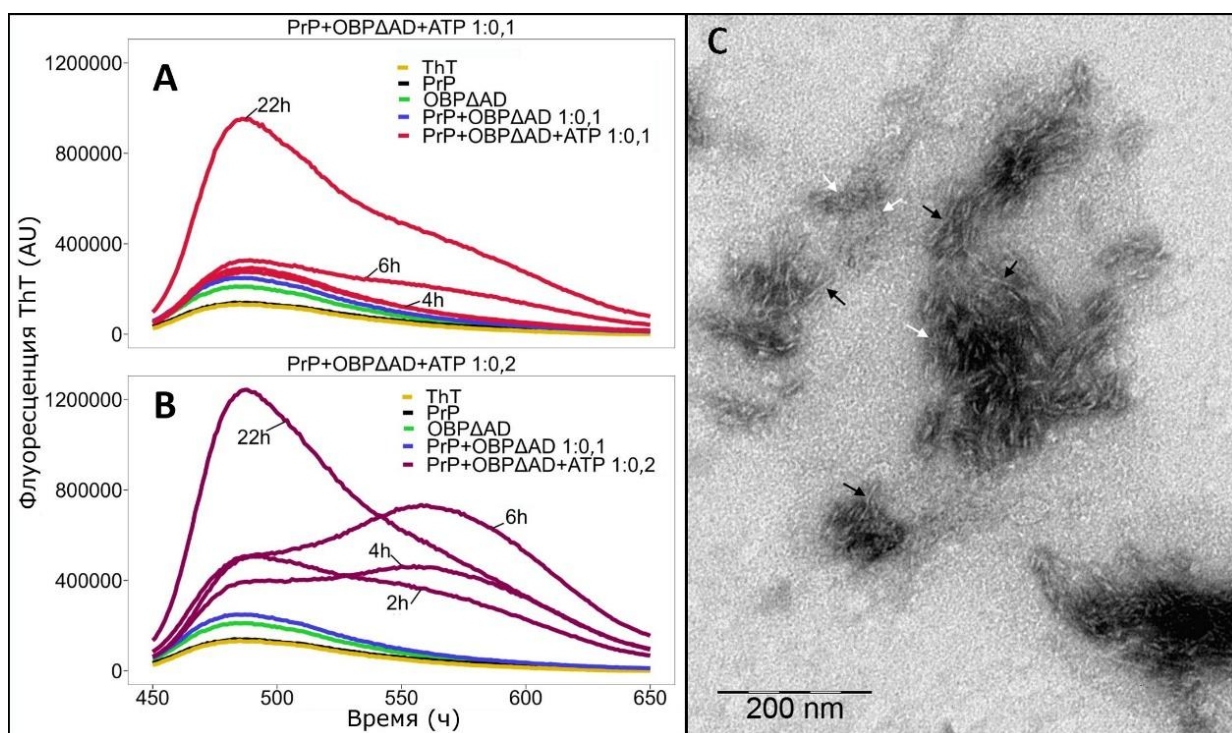


Рисунок 38. Изменение спектров флуоресценции ThT при инкубации прионного белка (PrP) совместно с мутантной формой шаперонина OBPΔAD при различных соотношениях белков (А и В). Изображение фибрилл прионного белка, сформированных после 5,5-часовой инкубации с OBPΔAD в присутствии АТР, полученное с помощью ТЭМ (С).

Инкубацию проводили в 50 мМ Трис-НСl (рН 7,5), 50 мМ КСl, 10 мМ MgCl₂ при 25°C и орбитальном встряхивании 570 об/мин. Концентрации мономеров прионного белка и АТР составляли 10 мкМ и 10 мМ, соответственно. Для образцов PrP, OBPΔAD и PrP+OBPΔAD показаны только спектры, соответствующие максимальному времени фибриллизации. Для образца PrP+OBPΔAD+АТР показаны спектры для разного времени фибриллизации (время указано около каждой кривой). Черные стрелки указывают на фибриллы PrP, белые стрелки указывают на OBPΔAD.

Результаты эксперимента показали, что, как и в случае с альфа-синуклеином A53T, мутантная форма шаперонина функционирует подобно полноразмерному шаперонину, но с меньшей эффективностью. Инкубация прионного белка совместно с ОВРΔAD в отсутствие АТР не влияет на амилоидизацию прионного белка. В то же время, инкубация шаперонина в присутствии АТР вначале приводит к увеличению флуоресценции на 482 нм. В процессе дальнейшей инкубации появляется дополнительный пик на 555 нм, что свидетельствует об образовании крупных агрегатов. Также следует отметить, что эффект дозозависим, и с увеличением концентрации ОВРΔAD процесс конверсии прионного белка происходит быстрее (рис. 38 А и В). Анализ микрографий, полученных с помощью ТЕМ, показал, что в присутствии АТР мутантная форма шаперонина ОВРΔAD стимулирует образование амилоидных фибрилл, которые ассоциируют между собой, образуя более крупные агрегаты (рис. 38С).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изменение нормальной структуры таких белков, как альфа-синуклеин и прионный белок, может привести к их агрегации и дальнейшему развитию нейродегенеративных заболеваний [1-4]. Факторы, участвующие в изменении структуры данных белков, в настоящее время до конца не ясны [13,14,16,17]. Кроме того, основные способы терапии заболеваний, вызванных агрегацией альфа-синуклеина и прионного белка, позволяют лишь замедлить их развитие, но не излечить [15]. С образовавшимися агрегатами и мономерами белков, так или иначе, взаимодействует клеточная система шаперонов, к которым, в частности, относятся шаперонины [5]. В то же время, до конца не ясно, как детали архитектуры шаперонинов и их происхождение будут влиять на оказываемый ими эффект. Поэтому в данной работе мы изучили взаимодействие двух вирусных шаперонинов, а именно однокольцевого ОВР и двухкольцевого EL, с альфа-синуклеином и прионным белком. Помимо относительной простоты структуры, данные шаперонины имеют архитектурные особенности, которые, вероятно, позволяют им находиться в открытой конформации на протяжении всего цикла функционирования [42].

Целью данной работы является выяснение влияния фаговых шаперонинов на патологическую трансформацию альфа-синуклеина и прионного белка.

На первом этапе нашей работы, мы оценили влияние фаговых шаперонинов на фибриллизацию альфа-синуклеина при их совместной инкубации *in vitro*. По результатам оказалось, что действие шаперонинов зависит от наличия АТР. В отсутствие АТР оба шаперонина связывают альфа-синуклеин и тем самым препятствуют его дальнейшей фибриллизации. Однако, в присутствии АТР мы наблюдали образование амилоидных фибрилл альфа-синуклеина, токсичных для клеток HEK293T и SH-SY5Y. Следует отметить, что амилоидизация мономеров альфа-синуклеина в присутствии шаперонинов и АТР происходит быстрее, чем при их спонтанной фибриллизации без шаперонина.

На следующем этапе исследования мы оценили влияние однокольцевого шаперонина ОВР на агрегацию альфа-синуклеина А53Т при коэкспрессии их генов в эукариотических клетках НЕК293Т. Установлено, что ОВР и альфа-синуклеин А53Т успешно продуцировались в клетках как при отдельной трансфекции, так и при трансфекции сразу двумя плазмидами, содержащими гены этих белков. Оба белка были диффузно распределены в цитоплазме клеток. При отдельной трансфекции агрегаты альфа-синуклеина в клетках не обнаружены, весь белок в виде мономера присутствовал только в растворимой в Triton-X100 фракции. При коэкспрессии генов шаперонина и альфа-синуклеина в нерастворимой в Triton-X100 фракции лизата клеток были обнаружены олигомерные формы альфа-синуклеина, что свидетельствует о его агрегации под действием ОВР. Однако, оценка выживаемости клеток не выявила значимых отличий между клетками до и после трансфекции. Вероятно, количество олигомерных форм, накапливаемых в клетке, недостаточно для значимого цитотоксического эффекта. Возможно, что эти формы обладают свойствами, отличными от свойств олигомеров альфа-синуклеина, образующихся в отсутствие шаперонина.

Изучено влияние делеционных мутантов ОВР, а именно его апикального домена и мутантной формы шаперонина без апикальных доменов, на агрегацию альфа-синуклеина А53Т. Анализ кривых по флуоресценции ThT показал, что апикальный домен в зависимости от концентрации препятствует агрегации альфа-синуклеина. Мутантный шаперонин без апикальных доменов, функционирует так же, как полноразмерный ОВР.

Наконец, мы оценили, как функционирование фаговых шаперонинов EL и ОВР будет влиять на агрегацию прионного белка при их совместной инкубации *in vitro*. Как оказалось, оба шаперонина способствуют агрегации прионного белка АТР-зависимым образом, причем двухкольцевой EL действует эффективнее, чем ОВР. Анализ спектров по флуоресценции ThT, а

также данных по ДРС и ТЭМ, показал, что при инкубации ОВР с прионным белком в присутствии АТР за 4 часа образуются короткие амилоидные фибриллы прионного белка, которые затем слипаются в крупные кластеры, которые мы наблюдаем через 22 часа с начала инкубации. Двухкольцевой EL в данном случае ведет себя эффективней и крупные кластеры мы наблюдаем уже через 4,5 часа с начала инкубации. При инкубации прионного белка отдельно, а также в присутствии шаперонинов, но без добавления АТР конверсии и агрегации прионного за время эксперимента не наблюдалось. Образованные за 4 часа, под действием ОВР, короткие фибриллы прионного белка оказали значимый токсический эффект на клетки SH-SY5Y по данным МТТ-теста. Также мы оценили влияние мутантной формы ОВР без апикальных доменов, на агрегацию прионного белка. Оказалось, что, как и в случае с альфа-синуклеином, мутантная форма действует также, как и полноразмерный шаперонин, но с меньшей эффективностью.

Тема взаимодействия шаперонинов с амилоидогенными белками в настоящее время остается малоизученной. Показано, что в системах *in vitro* шаперонины бактерий и эукариот, а также их мутантные варианты могут связывать разные формы альфа-синуклеина и тем самым препятствовать их агрегации, что делает перспективной разработку лекарственных препаратов на основе шаперонинов [18-21]. Однако, как показало наше исследование, здесь есть еще множество факторов, которые необходимо учесть. Кроме того, прояснить влияние шаперонинов на агрегацию амилоидогенных белков может полученная нами модель коэкспрессии генов мутантной формы альфа-синуклеина A53T и шаперонина ОВР в эукариотических клетках.

Из литературных данных известно, что некоторые шаперонины бактерий и эукариот способствуют патологии прионного белка [10-12]. Наше исследование подтверждает, что вирусные шаперонины, обладающие более простой структурой, также могут оказывать пагубное влияние на трансформацию прионного белка.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

1. Установлено, что при инкубации *in vitro* альфа-синуклеина с фаговыми шаперонинами, а именно с двухкольцевым EL или однокольцевым OBP, в присутствии АТР образуются амилоидные фибриллы альфа-синуклеина, токсичные для клеток HEK293T и SH-SY5Y. В отсутствие АТР оба шаперонина препятствуют образованию амилоидных фибрилл альфа-синуклеина.

2. Показано, что коэкспрессия генов мутантной формы альфа-синуклеина A53T и шаперонина OBP в клетках HEK293T приводит к образованию небольшого количества агрегатов альфа-синуклеина, что не влияет на жизнеспособность клеток.

3. Показано, что апикальный домен шаперонина OBP препятствует амилоидной трансформации альфа-синуклеина A53T, а лишенный этих доменов шаперонин влияет на агрегацию альфа-синуклеина так же, как и полноразмерный OBP.

4. Показано, что при инкубации *in vitro* шаперонинов EL и OBP с мономерами прионного белка в присутствии АТР образуются крупные агрегаты прионного белка, которые по морфологии и свойствам отличаются от фибрилл прионного белка, формирующихся спонтанно.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

ДРС – динамическое рассеяние света

ДТТ – дитиотреитол

ИФА – твердофазный иммуноферментный анализ

КД – спектроскопия кругового дихроизма

ЛДГ – лактатдегидрогеназа

ПААГ – полиакриламидный гель

ПЦР – полимеразная цепная реакция

Трис – трис(гидроксиметил)аминометан

ТЭМ – трансмиссионная электронная микроскопия

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

AD – апикальный домен шаперонина OBP

ADP – аденозиндифосфат

ATP – аденозинтрифосфат

CryoEM – криоэлектронная микроскопия

DAPI – 4',6-диамидино-2-фенилиндол

EL – шаперонин фага EL, кодируемый геном *gp146*

GAPDH – глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа

gp188 – фаговый эндолизин, кодируемый геном *188*

GroE – комплекс шаперонина GroEL и его кошаперонина GroES

GroE – система из шаперонина GroEL и его кошаперонина GroES

GroEL – бактериальный шаперонин, выделенный из клеток *E.coli*

GroES – кошаперонин бактериального шаперонина GroEL

GuHCl – гуанидингидрохлорид

HSP – шаперон (белок теплового шока)

IPTG – изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид

MTT – 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромид

OBP – шаперонин фага OBP, кодируемый геном *246*

OBP Δ AD – мутантная форма шаперонина OBP, лишенная апикальных доменов

PBS – фосфатно-солевой буфер

PBST – фосфатно-солевой буфер с добавлением к нему детергента Tween-20

pcDNA-OBP – плазмида, содержащая ген *gp246*, кодирующий однокольцевой шаперонин OBP

pcDNA-syn_mut – плазмида, содержащая ген *SNCA* с мутацией A53T, кодирующей мутантную форму альфа-синуклеина A53T

PK – протеиназа K

PrP^C – клеточная форма прионного белка

PrP^{Sc} – инфекционная форма прионного белка

SD – стандартное отклонение

SDS – додецилсульфат натрия

SE – стандартная ошибка среднего

ThT – тιοфлавин T

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

- [1] Marras, C., Beck, J. C., Bower, J. H., Roberts, E., Ritz, B., Ross, G. W. (2018) Prevalence of Parkinson's disease across North America. *NPJ Parkinsons Dis.*, **4**, 21. doi:10.1038/s41531-018-0058-0
- [2] Dorsey, E. R., Sherer, T., Okun, M. S., Bloem, B. R. (2018) The Emerging Evidence of the Parkinson Pandemic. *J. Parkinsons Dis.*, **8**, S3-S8. doi:10.3233/JPD-181474
- [3] Harris, D. A. (1999) Cellular biology of prion diseases. *Clin. Microbiol. Rev.*, **12**, 429-444. doi:10.1128/CMR.12.3.429
- [4] Walker, L. C., Jucker, M. (2015) Neurodegenerative diseases: expanding the prion concept. *Annu Rev. Neurosci.*, **38**, 87-103. doi:10.1146/annurev-neuro-071714-033828
- [5] Muchowski, P. J., Wacker, J. L. (2005) Modulation of neurodegeneration by molecular chaperones. *Nat. Rev. Neurosci.*, **6**, 11-22. doi:10.1038/nrn1587
- [6] Tittelmeier, J., Sandhof, C. A., Ries, H. M., Druffel-Augustin, S., Mogk, A., Bukau, B., Nussbaum-Krammer, C. (2020) The HSP110/HSP70 disaggregation system generates spreading-competent toxic alpha-synuclein species. *EMBO J.*, **39**, e103954. doi:10.15252/embj.2019103954
- [7] Uryu, K., Richter-Landsberg, C., Welch, W., Sun, E., Goldbaum, O., Norris, E. H., Trojanowski, J. Q. et al. (2006) Convergence of heat shock protein 90 with ubiquitin in filamentous alpha-synuclein inclusions of alpha-synucleinopathies. *Am. J. Pathol.*, **168**, 947-961. doi:10.2353/ajpath.2006.050770
- [8] Daturpalli, S., Waudby, C. A., Meehan, S., Jackson, S. E. (2013) Hsp90 inhibits alpha-synuclein aggregation by interacting with soluble oligomers. *J. Mol. Biol.*, **425**, 4614-4628. doi:10.1016/j.jmb.2013.08.006
- [9] Falsone, S. F., Kungl, A. J., Rek, A., Cappai, R., Zangger, K. (2009) The molecular chaperone Hsp90 modulates intermediate steps of amyloid assembly of the Parkinson-related protein alpha-synuclein. *J. Biol. Chem.*, **284**, 31190-31199. doi:10.1074/jbc.M109.057240

- [10] DebBurman, S. K., Raymond, G. J., Caughey, B., Lindquist, S. (1997) Chaperone-supervised conversion of prion protein to its protease-resistant form. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 13938-13943. doi:10.1073/pnas.94.25.13938
- [11] Stockel, J., & Hartl, F. U. (2001) Chaperonin-mediated de novo generation of prion protein aggregates. *J. Mol. Biol.*, **313**, 861-872. doi:10.1006/jmbi.2001.5085
- [12] Mamchur, A. A., Moiseenko, A. V., Panina, I. S., Yaroshevich, I. A., Kudryavtseva, S. S., Pichkur, E. B., Stanishneva-Konovalova, T. B. et. al. (2021) Structural and Computational Study of the GroEL-Prion Protein Complex. *Biomedicines*, **9**, 1649. doi:10.3390/biomedicines9111649
- [13] Koga, S., Sekiya, H., Kondru, N., Ross, O. A., Dickson, D. W. (2021) Neuropathology and molecular diagnosis of Synucleinopathies. *Mol. Neurodegener.*, **16**, 83. doi:10.1186/s13024-021-00501-z
- [14] Silva, R. H., Lopes-Silva, L. B., Cunha, D. G., Becegato, M., Ribeiro, A. M., Santos, J. R. (2024) Animal Approaches to Studying Risk Factors for Parkinson's Disease: A Narrative Review. *Brain Sci.*, **14**, 156. doi:10.3390/brainsci14020156
- [15] Elsworth, J. D. (2020) Parkinson's disease treatment: past, present, and future. *J Neural Transm (Vienna)*, **127**, 785-791. doi:10.1007/s00702-020-02167-1
- [16] Orge, L., Lima, C., Machado, C., Tavares, P., Mendonca, P., Carvalho, P., Pires, M. D. A. et al. (2021) Neuropathology of Animal Prion Diseases. *Biomolecules*, **11**, 466. doi:10.3390/biom11030466
- [17] Huang, W. J., Chen, W. W., Zhang, X. (2015) Prions mediated neurodegenerative disorders. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.*, **19**, 4028-4034.
- [18] Yamamoto, H., Fukui, N., Adachi, M., Saiki, E., Yamasaki, A., Matsumura, R., Kawata, Y. et al. (2019) Human Molecular Chaperone Hsp60 and Its Apical Domain Suppress Amyloid Fibril Formation of alpha-Synuclein. *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 47. doi:10.3390/ijms21010047

- [19] Fukui, N., Araki, K., Hongo, K., Mizobata, T., Kawata, Y. (2016) Modulating the Effects of the Bacterial Chaperonin GroEL on Fibrillogenic Polypeptides through Modification of Domain Hinge Architecture. *J. Biol. Chem.*, **291**, 25217-25226. doi:10.1074/jbc.M116.751925
- [20] Ojha, B., Fukui, N., Hongo, K., Mizobata, T., Kawata, Y. (2016) Suppression of amyloid fibrils using the GroEL apical domain. *Sci. Rep.*, **6**, 31041. doi:10.1038/srep31041
- [21] Sot, B., Rubio-Munoz, A., Leal-Quintero, A., Martinez-Sabando, J., Marcilla, M., Roodveldt, C., Valpuesta, J. M. (2017) The chaperonin CCT inhibits assembly of alpha-synuclein amyloid fibrils by a specific, conformation-dependent interaction. *Sci. Rep.*, **7**, 40859. doi:10.1038/srep40859
- [22] Edenhofer, F., Rieger, R., Famulok, M., Wendler, W., Weiss, S., Winnacker, E. L. (1996) Prion protein PrPc interacts with molecular chaperones of the Hsp60 family. *J. Virol.*, **70**, 4724-4728. doi:10.1128/JVI.70.7.4724-4728.1996
- [23] Kudryavtseva, S. S., Stroylova, Y. Y., Zanyatkin, I. A., Haertle, T., Muronetz, V. I. (2016) Inhibition of Chaperonin GroEL by a Monomer of Ovine Prion Protein and Its Oligomeric Forms. *Biochemistry (Mosc)*, **81**, 1213-1220. doi:10.1134/S0006297916100199
- [24] Naletov, I. N., Shmal'gauzen, E. V., Shalova, I. N., Pleten, A. P., Tsiriul'nikov, K., Ertl, T., Muronets, V. I. (2006) The non-functioning chaperonin GroEL stimulates protein aggregation. *Biomed. Khim.*, **52**, 518-524.
- [25] Kudryavtseva, S. S., Stroylova, Y. Y., Kurochkina, L. P., Muronetz, V. I. (2020) The chaperonin TRiC is blocked by native and glycated prion protein. *Arch. Biochem. Biophys.*, **683**, 108319. doi:10.1016/j.abb.2020.108319
- [26] Kiselev, G. G., Naletova, I. N., Sheval, E. V., Stroylova, Y. Y., Schmalhausen, E. V., Haertle, T., Muronetz, V. I. (2011) Chaperonins induce an amyloid-like transformation of ovine prion protein: the fundamental difference in action between eukaryotic TRiC and bacterial GroEL. *Biochim. Biophys. Acta*, **1814**, 1730-1738. doi:10.1016/j.bbapap.2011.08.006

- [27] Hartl, F. U., Bracher, A., Hayer-Hartl, M. (2011) Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature*, **475**, 324-332. doi:10.1038/nature10317
- [28] Kim, Y. E., Hipp, M. S., Bracher, A., Hayer-Hartl, M., Hartl, F. U. (2013) Molecular chaperone functions in protein folding and proteostasis. *Annu Rev. Biochem.*, **82**, 323-355. doi:10.1146/annurev-biochem-060208-092442
- [29] Horwich, A. L., Fenton, W. A., Chapman, E., Farr, G. W. (2007) Two families of chaperonin: physiology and mechanism. *Annu Rev. Cell Dev. Biol.*, **23**, 115-145. doi:10.1146/annurev.cellbio.23.090506.123555
- [30] Bukau, B., Horwich, A. L. (1998) The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell*, **92**, 351-366. doi:10.1016/s0092-8674(00)80928-9
- [31] Weissman, J. S., Rye, H. S., Fenton, W. A., Beechem, J. M., Horwich, A. L. (1996) Characterization of the active intermediate of a GroEL-GroES-mediated protein folding reaction. *Cell*, **84**, 481-490. doi:10.1016/s0092-8674(00)81293-3
- [32] Lin, Z., Rye, H. S. (2006) GroEL-mediated protein folding: making the impossible, possible. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **41**, 211-239. doi:10.1080/10409230600760382
- [33] Lopez, T., Dalton, K., Frydman, J. (2015) The Mechanism and Function of Group II Chaperonins. *J. Mol. Biol.*, **427**, 2919-2930. doi:10.1016/j.jmb.2015.04.013
- [34] Roseman, A. M., Chen, S., White, H., Braig, K., Saibil, H. R. (1996) The chaperonin ATPase cycle: mechanism of allosteric switching and movements of substrate-binding domains in GroEL. *Cell*, **87**, 241-251. doi:10.1016/s0092-8674(00)81342-2
- [35] Lin, Z., Puchalla, J., Shoup, D., Rye, H. S. (2013) Repetitive protein unfolding by the trans ring of the GroEL-GroES chaperonin complex stimulates folding. *J. Biol. Chem.*, **288**, 30944-30955. doi:10.1074/jbc.M113.480178

- [36] Chen, D. H., Madan, D., Weaver, J., Lin, Z., Schroder, G. F., Chiu, W., Rye, H. S. (2013) Visualizing GroEL/ES in the act of encapsulating a folding protein. *Cell*, **153**, 1354-1365. doi:10.1016/j.cell.2013.04.052
- [37] Lin, Z., Madan, D., Rye, H. S. (2008) GroEL stimulates protein folding through forced unfolding. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **15**, 303-311. doi:10.1038/nsmb.1394
- [38] Lewis, S. A., Cowan, N. J. (2002) Bad chaperone. *Nat. Med.*, **8**, 1202-1203. doi:10.1038/nm1102-1202
- [39] Ditzel, L., Lowe, J., Stock, D., Stetter, K. O., Huber, H., Huber, R., Steinbacher, S. (1998) Crystal structure of the thermosome, the archaeal chaperonin and homolog of CCT. *Cell*, **93**, 125-138. doi:10.1016/s0092-8674(00)81152-6
- [40] van der Vies, S. M., Gatenby, A. A., Georgopoulos, C. (1994) Bacteriophage T4 encodes a co-chaperonin that can substitute for Escherichia coli GroES in protein folding. *Nature*, **368**, 654-656. doi:10.1038/368654a0
- [41] Marine, R. L., Nasko, D. J., Wray, J., Polson, S. W., Wommack, K. E. (2017) Novel chaperonins are prevalent in the viroplankton and demonstrate links to viral biology and ecology. *ISME J.*, **11**, 2479-2491. doi:10.1038/ismej.2017.102
- [42] Курочкина, Л. П., Семенюк, П. И., Соколова, О. С. (2022) Структурные и функциональные особенности вирусных шаперонинов. *Биохимия*, **87**, 16-25. doi:10.31857/S032097252201002X
- [43] Kurochkina, L. P., Semenyuk, P. I., Orlov, V. N., Robben, J., Sykilinda, N. N., Mesyanzhinov, V. V. (2012) Expression and functional characterization of the first bacteriophage-encoded chaperonin. *J. Virol.*, **86**, 10103-10111. doi:10.1128/JVI.00940-12
- [44] Bracher, A., Paul, S. S., Wang, H., Wischnewski, N., Hartl, F. U., Hayer-Hartl, M. (2020) Structure and conformational cycle of a bacteriophage-encoded chaperonin. *PLoS One*, **15**, e0230090. doi:10.1371/journal.pone.0230090
- [45] Semenyuk, P. I., Orlov, V. N., Kurochkina, L. P. (2015) Effect of chaperonin encoded by gene 146 on thermal aggregation of lytic proteins of bacteriophage

- EL *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemistry (Mosc)*, **80**, 172-179. doi:10.1134/S0006297915020042
- [46] Semenyuk, P. I., Moiseenko, A. V., Sokolova, O. S., Muronetz, V. I., Kurochkina, L. P. (2020) Structural and functional diversity of novel and known bacteriophage-encoded chaperonins. *Int. J. Biol. Macromol.*, **157**, 544-552. doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.04.189
- [47] Semenyuk, P. I., Orlov, V. N., Sokolova, O. S., Kurochkina, L. P. (2016) New GroEL-like chaperonin of bacteriophage OBP *Pseudomonas fluorescens* suppresses thermal protein aggregation in an ATP-dependent manner. *Biochem. J.*, **473**, 2383-2393. doi:10.1042/BCJ20160367
- [48] Sokolova, O. S., Pichkur, E. B., Kurochkina, L. P. (2020) Cryo-EM Structure of the Novel Viral Chaperonin, Encoded by Gene 228 of Bacteriophage AR9 *Bacillus Subtilis*. *Microscopy and Microanalysis*, **26**, 1-3. doi:10.1017/S1431927620017584
- [49] Stanishneva-Konovalova, T. B., Semenyuk, P. I., Kurochkina, L. P., Pichkur, E. B., Vasilyev, A. L., Kovalchuk, M. V., Sokolova, O. S. et al. (2020) Cryo-EM reveals an asymmetry in a novel single-ring viral chaperonin. *J. Struct. Biol.*, **209**, 107439. doi:10.1016/j.jsb.2019.107439
- [50] Molugu, S. K., Hildenbrand, Z. L., Morgan, D. G., Sherman, M. B., He, L., Georgopoulos, C., Bernal, R. A. et al. (2016) Ring Separation Highlights the Protein-Folding Mechanism Used by the Phage EL-Encoded Chaperonin. *Structure*, **24**, 537-546. doi:10.1016/j.str.2016.02.006
- [51] Nelson, R., Sawaya, M. R., Balbirnie, M., Madsen, A. O., Riekel, C., Grothe, R., Eisenberg, D. (2005) Structure of the cross-beta spine of amyloid-like fibrils. *Nature*, **435**, 773-778. doi:10.1038/nature03680
- [52] Petkova, A. T., Ishii, Y., Balbach, J. J., Antzutkin, O. N., Leapman, R. D., Delaglio, F., Tycko, R. (2002) A structural model for Alzheimer's beta - amyloid fibrils based on experimental constraints from solid state NMR. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 16742-16747. doi:10.1073/pnas.262663499

- [53] Eichner, T., Kalverda, A. P., Thompson, G. S., Homans, S. W., Radford, S. E. (2011) Conformational conversion during amyloid formation at atomic resolution. *Mol. Cell*, **41**, 161-172. doi:10.1016/j.molcel.2010.11.028
- [54] Almeida, Z. L., Brito, R. M. M. (2020) Structure and Aggregation Mechanisms in Amyloids. *Molecules*, **25**, 1195. doi:10.3390/molecules25051195
- [55] Tuttle, M. D., Comellas, G., Nieuwkoop, A. J., Covell, D. J., Berthold, D. A., Kloepper, K. D., Rienstra, C. M. et. al. (2016) Solid-state NMR structure of a pathogenic fibril of full-length human alpha-synuclein. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **23**, 409-415. doi:10.1038/nsmb.3194
- [56] Nakajo, S., Tsukada, K., Omata, K., Nakamura, Y., Nakaya, K. (1993) A new brain-specific 14-kDa protein is a phosphoprotein. Its complete amino acid sequence and evidence for phosphorylation. *Eur. J. Biochem.*, **217**, 1057-1063. doi:10.1111/j.1432-1033.1993.tb18337.x
- [57] Eliezer, D., Kutluay, E., Bussell, R., Jr., Browne, G. (2001) Conformational properties of alpha-synuclein in its free and lipid-associated states. *J. Mol. Biol.*, **307**, 1061-1073. doi:10.1006/jmbi.2001.4538
- [58] Ueda, K., Fukushima, H., Masliah, E., Xia, Y., Iwai, A., Yoshimoto, M., Saitoh, T. et al. (1993) Molecular cloning of cDNA encoding an unrecognized component of amyloid in Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 11282-11286. doi:10.1073/pnas.90.23.11282
- [59] Bertini, I., Gupta, Y. K., Luchinat, C., Parigi, G., Peana, M., Sgheri, L., Yuan, J. (2007) Paramagnetism-based NMR restraints provide maximum allowed probabilities for the different conformations of partially independent protein domains. *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 12786-12794. doi:10.1021/ja0726613
- [60] Fernandez, C. O., Hoyer, W., Zweckstetter, M., Jares-Erijman, E. A., Subramaniam, V., Griesinger, C., Jovin, T. M. (2004) NMR of alpha-synuclein-polyamine complexes elucidates the mechanism and kinetics of induced aggregation. *EMBO J.*, **23**, 2039-2046. doi:10.1038/sj.emboj.7600211
- [61] Brown, D. R. (2007) Interactions between metals and alpha-synuclein--function or artefact? *FEBS J.*, **274**, 3766-3774. doi:10.1111/j.1742-4658.2007.05917.x

- [62] Cherny, D., Hoyer, W., Subramaniam, V., Jovin, T. M. (2004) Double-stranded DNA stimulates the fibrillation of alpha-synuclein in vitro and is associated with the mature fibrils: an electron microscopy study. *J. Mol. Biol.*, **344**, 929-938. doi:10.1016/j.jmb.2004.09.096
- [63] Fujiwara, H., Hasegawa, M., Dohmae, N., Kawashima, A., Masliah, E., Goldberg, M. S., Iwatsubo, T. et al. (2002) alpha-Synuclein is phosphorylated in synucleinopathy lesions. *Nat. Cell. Biol.*, **4**, 160-164. doi:10.1038/ncb748
- [64] Awa, S., Suzuki, G., Masuda-Suzukake, M., Nonaka, T., Saito, M., Hasegawa, M. (2022) Phosphorylation of endogenous alpha-synuclein induced by extracellular seeds initiates at the pre-synaptic region and spreads to the cell body. *Sci. Rep.*, **12**, 1163. doi:10.1038/s41598-022-04780-4
- [65] Kawahata, I., Finkelstein, D. I., Fukunaga, K. (2022) Pathogenic Impact of alpha-Synuclein Phosphorylation and Its Kinases in alpha-Synucleinopathies. *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 6216. doi:10.3390/ijms23116216
- [66] Gao, V., Briano, J. A., Komer, L. E., Burre, J. (2023) Functional and Pathological Effects of alpha-Synuclein on Synaptic SNARE Complexes. *J. Mol. Biol.*, **435**, 167714. doi:10.1016/j.jmb.2022.167714
- [67] Li, A., Rastegar, C., Mao, X. (2022) alpha-Synuclein Conformational Plasticity: Physiologic States, Pathologic Strains, and Biotechnological Applications. *Biomolecules*, **12**, 994. doi:10.3390/biom12070994
- [68] Liu, C., Zhao, Y., Xi, H., Jiang, J., Yu, Y., Dong, W. (2021) The Membrane Interaction of Alpha-Synuclein. *Front. Cell. Neurosci.*, **15**, 633727. doi:10.3389/fncel.2021.633727
- [69] Cremades, N., Cohen, S. I., Deas, E., Abramov, A. Y., Chen, A. Y., Orte, A., Klenerman, D. et al. (2012) Direct observation of the interconversion of normal and toxic forms of alpha-synuclein. *Cell*, **149**, 1048-1059. doi:10.1016/j.cell.2012.03.037
- [70] Chen, S. W., Drakulic, S., Deas, E., Ouberaï, M., Aprile, F. A., Arranz, R., Cremades, N. et al. (2015) Structural characterization of toxic oligomers that

- are kinetically trapped during alpha-synuclein fibril formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **112**, E1994-2003. doi:10.1073/pnas.1421204112
- [71] Fusco, G., Chen, S. W., Williamson, P. T. F., Cascella, R., Perni, M., Jarvis, J. A., De Simone, A. et al. (2017) Structural basis of membrane disruption and cellular toxicity by alpha-synuclein oligomers. *Science*, **358**, 1440-1443. doi:10.1126/science.aan6160
- [72] Holec, S. A. M., Liu, S. L., Woerman, A. L. (2022) Consequences of variability in alpha-synuclein fibril structure on strain biology. *Acta. Neuropathol.*, **143**, 311-330. doi:10.1007/s00401-022-02403-w
- [73] Dhavale, D. D., Barclay, A. M., Borcik, C. G., Basore, K., Berthold, D. A., Gordon, I. R., Kotzbauer, P. T. et al. (2024) Structure of alpha-synuclein fibrils derived from human Lewy body dementia tissue. *Nat. Commun.*, **15**, 2750. doi:10.1038/s41467-024-46832-5
- [74] Yang, Y., Shi, Y., Schweighauser, M., Zhang, X., Kotecha, A., Murzin, A. G., Goedert, M. et al. (2022) Structures of alpha-synuclein filaments from human brains with Lewy pathology. *Nature*, **610**, 791-795. doi:10.1038/s41586-022-05319-3
- [75] Arosio, P., Knowles, T. P., Linse, S. (2015) On the lag phase in amyloid fibril formation. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **17**, 7606-7618. doi:10.1039/c4cp05563b
- [76] Mehra, S., Sahay, S., Maji, S. K. (2019) alpha-Synuclein misfolding and aggregation: Implications in Parkinson's disease pathogenesis. *Biochim. Biophys. Acta Proteins. Proteom.*, **1867**, 890-908. doi:10.1016/j.bbapap.2019.03.001
- [77] Hadi Alijanvand, S., Peduzzo, A., Buell, A. K. (2021) Secondary Nucleation and the Conservation of Structural Characteristics of Amyloid Fibril Strains. *Front. Mol. Biosci.*, **8**, 669994. doi:10.3389/fmolb.2021.669994
- [78] Lee, C. C., Nayak, A., Sethuraman, A., Belfort, G., McRae, G. J. (2007) A three-stage kinetic model of amyloid fibrillation. *Biophys. J.*, **92**, 3448-3458. doi:10.1529/biophysj.106.098608

- [79] Padrick, S. B., Miranker, A. D. (2002) Islet amyloid: phase partitioning and secondary nucleation are central to the mechanism of fibrillogenesis. *Biochemistry*, **41**, 4694-4703. doi:10.1021/bi0160462
- [80] Brown, J. W. P., Meisl, G., Knowles, T. P. J., Buell, A. K., Dobson, C. M., Galvagnion, C. (2018) Kinetic barriers to alpha-synuclein protofilament formation and conversion into mature fibrils. *Chem. Commun. (Camb)*, **54**, 7854-7857. doi:10.1039/c8cc03002b
- [81] Wordehoff, M. M., Bannach, O., Shaykhalishahi, H., Kulawik, A., Schiefer, S., Willbold, D., Birkmann, E. et al. (2015) Single fibril growth kinetics of alpha-synuclein. *J. Mol. Biol.*, **427**, 1428-1435. doi:10.1016/j.jmb.2015.01.020
- [82] Iljina, M., Garcia, G. A., Horrocks, M. H., Tosatto, L., Choi, M. L., Ganzinger, K. A., Klenerman, D. et al. (2016) Kinetic model of the aggregation of alpha-synuclein provides insights into prion-like spreading. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **113**, E1206-1215. doi:10.1073/pnas.1524128113
- [83] Afitska, K., Priss, A., Yushchenko, D. A., Shvadchak, V. V. (2020) Structural Optimization of Inhibitors of alpha-Synuclein Fibril Growth: Affinity to the Fibril End as a Crucial Factor. *J. Mol. Biol.*, **432**, 967-977. doi:10.1016/j.jmb.2019.11.019
- [84] Sanchez, S. E., Whiten, D. R., Meisl, G., Ruggeri, F. S., Hidari, E., Klenerman, D. (2021) Alpha Synuclein only Forms Fibrils In Vitro when Larger than its Critical Size of 70 Monomers. *Chembiochem*, **22**, 2867-2871. doi:10.1002/cbic.202100285
- [85] Coskuner, O., Wise-Scira, O. (2013) Structures and free energy landscapes of the A53T mutant-type alpha-synuclein protein and impact of A53T mutation on the structures of the wild-type alpha-synuclein protein with dynamics. *ACS Chem. Neurosci.*, **4**, 1101-1113. doi:10.1021/cn400041j
- [86] Ohgita, T., Kono, H., Morita, I., Oyama, H., Shimanouchi, T., Kobayashi, N., Saito, H. (2023) Intramolecular interaction kinetically regulates fibril formation by human and mouse alpha-synuclein. *Sci. Rep.*, **13**, 10885. doi:10.1038/s41598-023-38070-4

- [87] Ohgita, T., Namba, N., Kono, H., Shimanouchi, T., Saito, H. (2022) Mechanisms of enhanced aggregation and fibril formation of Parkinson's disease-related variants of alpha-synuclein. *Sci. Rep.*, **12**, 6770. doi:10.1038/s41598-022-10789-6
- [88] Alexander, G. E. (2004) Biology of Parkinson's disease: pathogenesis and pathophysiology of a multisystem neurodegenerative disorder. *Dialogues. Clin. Neurosci.*, **6**, 259-280. doi:10.31887/DCNS.2004.6.3/galexander
- [89] Spillantini, M. G., Schmidt, M. L., Lee, V. M., Trojanowski, J. Q., Jakes, R., Goedert, M. (1997) Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature*, **388**, 839-840. doi:10.1038/42166
- [90] Jankovic, J. (2008) Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, **79**, 368-376. doi:10.1136/jnnp.2007.131045
- [91] Chaudhuri, K. R., Healy, D. G., Schapira, A. H., National Institute for Clinical, E. (2006) Non-motor symptoms of Parkinson's disease: diagnosis and management. *Lancet Neurol.*, **5**, 235-245. doi:10.1016/S1474-4422(06)70373-8
- [92] Hou, Y., Dan, X., Babbar, M., Wei, Y., Hasselbalch, S. G., Croteau, D. L., Bohr, V. A. (2019) Ageing as a risk factor for neurodegenerative disease. *Nat. Rev. Neurol.*, **15**, 565-581. doi:10.1038/s41582-019-0244-7
- [93] Selvaraj, S., Piramanayagam, S. (2019) Impact of gene mutation in the development of Parkinson's disease. *Genes Dis.*, **6**, 120-128. doi:10.1016/j.gendis.2019.01.004
- [94] Nalls, M. A., Blauwendraat, C., Vallerga, C. L., Heilbron, K., Bandres-Ciga, S., Chang, D., et al. (2019) Identification of novel risk loci, causal insights, and heritable risk for Parkinson's disease: a meta-analysis of genome-wide association studies. *Lancet Neurol.*, **18**, 1091-1102. doi:10.1016/S1474-4422(19)30320-5
- [95] Jia, F., Fellner, A., Kumar, K. R. (2022) Monogenic Parkinson's Disease: Genotype, Phenotype, Pathophysiology, and Genetic Testing. *Genes (Basel)*, **13**, 471. doi:10.3390/genes13030471

- [96] Lesage, S., Lunati, A., Houot, M., Romdhan, S. B., Clot, F., Tesson, C., et al. (2020) Characterization of Recessive Parkinson Disease in a Large Multicenter Study. *Ann. Neurol.*, **88**, 843-850. doi:10.1002/ana.25787
- [97] Day, J. O., Mullin, S. (2021) The Genetics of Parkinson's Disease and Implications for Clinical Practice. *Genes (Basel)*, **12**, 1006. doi:10.3390/genes12071006
- [98] Priyadarshi, A., Khuder, S. A., Schaub, E. A., Priyadarshi, S. S. (2001) Environmental risk factors and Parkinson's disease: a metaanalysis. *Environ. Res.*, **86**, 122-127. doi:10.1006/enrs.2001.4264
- [99] Pouchieu, C., Piel, C., Carles, C., Gruber, A., Helmer, C., Tual, S., Baldi, I. et al. (2018) Pesticide use in agriculture and Parkinson's disease in the AGRICAN cohort study. *Int. J. Epidemiol.*, **47**, 299-310. doi:10.1093/ije/dyx225
- [100] Liu, C., Liu, Z., Fang, Y., Du, Z., Yan, Z., Yuan, X., Zhang, Z. et al. (2022) Exposure to the environmentally toxic pesticide maneb induces Parkinson's disease-like neurotoxicity in mice: A combined proteomic and metabolomic analysis. *Chemosphere*, **308**, 136344. doi:10.1016/j.chemosphere.2022.136344
- [101] Anderson, C. C., Marentette, J. O., Rauniyar, A. K., Prutton, K. M., Khatri, M., Matheson, C., Roede, J. R. et al. (2021) Maneb alters central carbon metabolism and thiol redox status in a toxicant model of Parkinson's disease. *Free Radic. Biol. Med.*, **162**, 65-76. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2020.11.028
- [102] Harrison Brody, A., Chou, E., Gray, J. M., Pokyrwka, N. J., Raley-Susman, K. M. (2013) Mancozeb-induced behavioral deficits precede structural neural degeneration. *Neurotoxicology*, **34**, 74-81. doi:10.1016/j.neuro.2012.10.007
- [103] Xu, Y., Huang, X., Geng, X., Wang, F. (2023) Meta-analysis of iron metabolism markers levels of Parkinson's disease patients determined by fluid and MRI measurements. *J. Trace. Elem. Med. Biol.*, **78**, 127190. doi:10.1016/j.jtemb.2023.127190
- [104] Scholefield, M., Church, S. J., Xu, J., Patassini, S., Roncaroli, F., Hooper, N. M., Cooper, G. J. S. et al. (2021) Widespread Decreases in Cerebral Copper

- Are Common to Parkinson's Disease Dementia and Alzheimer's Disease Dementia. *Front. Aging Neurosci.*, **13**, 641222. doi:10.3389/fnagi.2021.641222
- [105] Racette, B. A., Searles Nielsen, S., Criswell, S. R., Sheppard, L., Seixas, N., Warden, M. N., Checkoway, H. (2017) Dose-dependent progression of parkinsonism in manganese-exposed welders. *Neurology*, **88**, 344-351. doi:10.1212/WNL.0000000000003533
- [106] Harischandra, D. S., Rokad, D., Neal, M. L., Ghaisas, S., Manne, S., Sarkar, S., Kanthasamy, A. G. et al. (2019) Manganese promotes the aggregation and prion-like cell-to-cell exosomal transmission of alpha-synuclein. *Sci. Signal.*, **12**, 4543. doi:10.1126/scisignal.aau4543
- [107] Sun, H., Liu, X., Ge, H., Wang, T., Wang, Y., Li, W. (2017) Association Between Serum Zinc Levels and the Risk of Parkinson's Disease: a Meta-Analysis. *Biol. Trace Elem. Res.*, **179**, 45-51. doi:10.1007/s12011-017-0941-2
- [108] Abdeen, A. H., Trist, B. G., Double, K. L. (2022) Empirical evidence for biometal dysregulation in Parkinson's disease from a systematic review and Bradford Hill analysis. *NPJ Parkinsons Dis.*, **8**, 83. doi:10.1038/s41531-022-00345-4
- [109] Braak, H., Ghebremedhin, E., Rub, U., Bratzke, H., Del Tredici, K. (2004) Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology. *Cell Tissue Res.*, **318**, 121-134. doi:10.1007/s00441-004-0956-9
- [110] Holmqvist, S., Chutna, O., Bousset, L., Aldrin-Kirk, P., Li, W., Bjorklund, T., Li, J. Y. et al. (2014) Direct evidence of Parkinson pathology spread from the gastrointestinal tract to the brain in rats. *Acta Neuropathol.*, **128**, 805-820. doi:10.1007/s00401-014-1343-6
- [111] Uemura, N., Yagi, H., Uemura, M. T., Hatanaka, Y., Yamakado, H., Takahashi, R. (2018) Inoculation of alpha-synuclein preformed fibrils into the mouse gastrointestinal tract induces Lewy body-like aggregates in the brainstem via the vagus nerve. *Mol. Neurodegener.*, **13**, 21. doi:10.1186/s13024-018-0257-5
- [112] Kim, S., Kwon, S. H., Kam, T. I., Panicker, N., Karuppagounder, S. S., Lee, S., Ko, H. S. et al. (2019) Transneuronal Propagation of Pathologic alpha-

- Synuclein from the Gut to the Brain Models Parkinson's Disease. *Neuron*, **103**, 627-641 e627. doi:10.1016/j.neuron.2019.05.035
- [113] Manfredsson, F. P., Luk, K. C., Benskey, M. J., Gezer, A., Garcia, J., Kuhn, N. C., Kordower, J. H. et al. (2018) Induction of alpha-synuclein pathology in the enteric nervous system of the rat and non-human primate results in gastrointestinal dysmotility and transient CNS pathology. *Neurobiol. Dis.*, **112**, 106-118. doi:10.1016/j.nbd.2018.01.008
- [114] Wang, X. J., Ma, M. M., Zhou, L. B., Jiang, X. Y., Hao, M. M., Teng, R. K. F., Ding, X. B. et al. (2020) Autonomic ganglionic injection of alpha-synuclein fibrils as a model of pure autonomic failure alpha-synucleinopathy. *Nat. Commun.*, **11**, 934. doi:10.1038/s41467-019-14189-9
- [115] Yu, Q. J., Yu, S. Y., Zuo, L. J., Lian, T. H., Hu, Y., Wang, R. D., Zhang, W. (2018) Parkinson disease with constipation: clinical features and relevant factors. *Sci. Rep.*, **8**, 567. doi:10.1038/s41598-017-16790-8
- [116] Postuma, R. B., Gagnon, J. F., Pelletier, A., Montplaisir, J. (2013) Prodromal autonomic symptoms and signs in Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Mov. Disord.*, **28**, 597-604. doi:10.1002/mds.25445
- [117] Abbott, R. D., Petrovitch, H., White, L. R., Masaki, K. H., Tanner, C. M., Curb, J. D., Ross, G. W. et al. (2001) Frequency of bowel movements and the future risk of Parkinson's disease. *Neurology*, **57**, 456-462. doi:10.1212/wnl.57.3.456
- [118] Villumsen, M., Aznar, S., Pakkenberg, B., Jess, T., Brudek, T. (2019) Inflammatory bowel disease increases the risk of Parkinson's disease: a Danish nationwide cohort study 1977-2014. *Gut*, **68**, 18-24. doi:10.1136/gutjnl-2017-315666
- [119] Zhu, F., Li, C., Gong, J., Zhu, W., Gu, L., Li, N. (2019) The risk of Parkinson's disease in inflammatory bowel disease: A systematic review and meta-analysis. *Dig. Liver. Dis.*, **51**, 38-42. doi:10.1016/j.dld.2018.09.017
- [120] Peter, I., Dubinsky, M., Bressman, S., Park, A., Lu, C., Chen, N., Wang, A. (2018) Anti-Tumor Necrosis Factor Therapy and Incidence of Parkinson

- Disease Among Patients With Inflammatory Bowel Disease. *JAMA Neurol.*, **75**, 939-946. doi:10.1001/jamaneurol.2018.0605
- [121] Hilton, D., Stephens, M., Kirk, L., Edwards, P., Potter, R., Zajicek, J., Carroll, C. et al. (2014) Accumulation of alpha-synuclein in the bowel of patients in the pre-clinical phase of Parkinson's disease. *Acta Neuropathol.*, **127**, 235-241. doi:10.1007/s00401-013-1214-6
- [122] Shannon, K. M., Keshavarzian, A., Dodiya, H. B., Jakate, S., Kordower, J. H. (2012) Is alpha-synuclein in the colon a biomarker for premotor Parkinson's disease? Evidence from 3 cases. *Mov. Disord.*, **27**, 716-719. doi:10.1002/mds.25020
- [123] Stokholm, M. G., Danielsen, E. H., Hamilton-Dutoit, S. J., Borghammer, P. (2016) Pathological alpha-synuclein in gastrointestinal tissues from prodromal Parkinson disease patients. *Ann. Neurol.*, **79**, 940-949. doi:10.1002/ana.24648
- [124] Bottner, M., Zorenkov, D., Hellwig, I., Barrenschee, M., Harde, J., Fricke, T., Wedel, T. et al. (2012) Expression pattern and localization of alpha-synuclein in the human enteric nervous system. *Neurobiol. Dis.*, **48**, 474-480. doi:10.1016/j.nbd.2012.07.018
- [125] Barrenschee, M., Zorenkov, D., Bottner, M., Lange, C., Cossais, F., Scharf, A. B., Wedel, T. et al. (2017) Distinct pattern of enteric phospho-alpha-synuclein aggregates and gene expression profiles in patients with Parkinson's disease. *Acta Neuropathol. Commun.*, **5**, 1. doi:10.1186/s40478-016-0408-2
- [126] Manning-Bog, A. B., McCormack, A. L., Li, J., Uversky, V. N., Fink, A. L., Di Monte, D. A. (2002) The herbicide paraquat causes up-regulation and aggregation of alpha-synuclein in mice: paraquat and alpha-synuclein. *J. Biol. Chem.*, **277**, 1641-1644. doi:10.1074/jbc.C100560200
- [127] Sivagurunathan, N., Gnanasekaran, P., Calivarathan, L. (2023) Mitochondrial Toxicant-Induced Neuronal Apoptosis in Parkinson's Disease: What We Know so Far. *Degener. Neurol. Neuromuscul. Dis.*, **13**, 1-13. doi:10.2147/DNND.S361526

- [128] Travagli, R. A., Browning, K. N., Camilleri, M. (2020) Parkinson disease and the gut: new insights into pathogenesis and clinical relevance. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, **17**, 673-685. doi:10.1038/s41575-020-0339-z
- [129] Anselmi, L., Bove, C., Coleman, F. H., Le, K., Subramanian, M. P., Venkiteswaran, K., Travagli, R. A. et al. (2018) Ingestion of subthreshold doses of environmental toxins induces ascending Parkinsonism in the rat. *NPJ Parkinsons Dis.*, **4**, 30. doi:10.1038/s41531-018-0066-0
- [130] Tasselli, M., Chaumette, T., Paillusson, S., Monnet, Y., Lafoux, A., Huchet-Cadiou, C., Neunlist, M. et al. (2013) Effects of oral administration of rotenone on gastrointestinal functions in mice. *Neurogastroenterol. Motil.*, **25**, e183-193. doi:10.1111/nmo.12070
- [131] Tan, A. H., Lim, S. Y., Lang, A. E. (2022) The microbiome-gut-brain axis in Parkinson disease - from basic research to the clinic. *Nat. Rev. Neurol.*, **18**, 476-495. doi:10.1038/s41582-022-00681-2
- [132] Boertien, J. M., Pereira, P. A. B., Aho, V. T. E., Scheperjans, F. (2019) Increasing Comparability and Utility of Gut Microbiome Studies in Parkinson's Disease: A Systematic Review. *J. Parkinsons Dis.*, **9**, S297-S312. doi:10.3233/JPD-191711
- [133] Zhu, M., Liu, X., Ye, Y., Yan, X., Cheng, Y., Zhao, L., Ling, Z. et al. (2022) Gut Microbiota: A Novel Therapeutic Target for Parkinson's Disease. *Front. Immunol.*, **13**, 937555. doi:10.3389/fimmu.2022.937555
- [134] Segal, A., Zlotnik, Y., Moyal-Atias, K., Abuhasira, R., Ifergane, G. (2021) Fecal microbiota transplant as a potential treatment for Parkinson's disease - A case series. *Clin. Neurol. Neurosurg.*, **207**, 106791. doi:10.1016/j.clineuro.2021.106791
- [135] Cheng, Y., Tan, G., Zhu, Q., Wang, C., Ruan, G., Ying, S., Wei, Y. et al. (2023) Efficacy of fecal microbiota transplantation in patients with Parkinson's disease: clinical trial results from a randomized, placebo-controlled design. *Gut Microbes*, **15**, 2284247. doi:10.1080/19490976.2023.2284247

- [136] Hegelmaier, T., Lebbing, M., Duscha, A., Tomaske, L., Tonges, L., Holm, J. B., Haghikia, A. et al. (2020) Interventional Influence of the Intestinal Microbiome Through Dietary Intervention and Bowel Cleansing Might Improve Motor Symptoms in Parkinson's Disease. *Cells*, **9**, 376. doi:10.3390/cells9020376
- [137] Scheckel, C., Aguzzi, A. (2018) Prions, prionoids and protein misfolding disorders. *Nat. Rev. Genet.*, **19**, 405-418. doi:10.1038/s41576-018-0011-4
- [138] Herms, J., Tings, T., Gall, S., Madlung, A., Giese, A., Siebert, H., Kretzschmar, H. et al. (1999) Evidence of presynaptic location and function of the prion protein. *J. Neurosci.*, **19**, 8866-8875. doi:10.1523/JNEUROSCI.19-20-08866.1999
- [139] Acevedo-Morantes, C. Y., Wille, H. (2014) The structure of human prions: from biology to structural models-considerations and pitfalls. *Viruses*, **6**, 3875-3892. doi:10.3390/v6103875
- [140] Zahn, R., Liu, A., Luhrs, T., Riek, R., von Schroetter, C., Lopez Garcia, F., Wuthrich, K. et al. (2000) NMR solution structure of the human prion protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 145-150. doi:10.1073/pnas.97.1.145
- [141] Rane, N. S., Yonkovich, J. L., Hegde, R. S. (2004) Protection from cytosolic prion protein toxicity by modulation of protein translocation. *EMBO J.*, **23**, 4550-4559. doi:10.1038/sj.emboj.7600462
- [142] Vey, M., Pilkuhn, S., Wille, H., Nixon, R., DeArmond, S. J., Smart, E. J. Prusiner, S. B. et al. (1996) Subcellular colocalization of the cellular and scrapie prion proteins in caveolae-like membranous domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 14945-14949. doi:10.1073/pnas.93.25.14945
- [143] Chakrabarti, O., Ashok, A., Hegde, R. S. (2009) Prion protein biosynthesis and its emerging role in neurodegeneration. *Trends Biochem. Sci.*, **34**, 287-295. doi:10.1016/j.tibs.2009.03.001
- [144] Castle, A. R., Gill, A. C. (2017) Physiological Functions of the Cellular Prion Protein. *Front. Mol. Biosci.*, **4**, 19. doi:10.3389/fmolb.2017.00019

- [145] Campbell, L., Gill, A. C., McGovern, G., Jalland, C. M., Hopkins, J., Tranulis, M. A., Goldmann, W. et al. (2013) The PrP(C) C1 fragment derived from the ovine A136R154R171PRNP allele is highly abundant in sheep brain and inhibits fibrillisation of full-length PrP(C) protein in vitro. *Biochim. Biophys. Acta*, **1832**, 826-836. doi:10.1016/j.bbadis.2013.02.020
- [146] Mohammadi, B., Song, F., Matamoros-Angles, A., Shafiq, M., Damme, M., Puig, B., Altmeyen, H. C. et al. (2023) Anchorless risk or released benefit? An updated view on the ADAM10-mediated shedding of the prion protein. *Cell Tissue Res.*, **392**, 215-234. doi:10.1007/s00441-022-03582-4
- [147] Bremer, J., Baumann, F., Tiberi, C., Wessig, C., Fischer, H., Schwarz, P., Aguzzi, A. et al. (2010) Axonal prion protein is required for peripheral myelin maintenance. *Nat. Neurosci.*, **13**, 310-318. doi:10.1038/nn.2483
- [148] Kuffer, A., Lakkaraju, A. K., Mogha, A., Petersen, S. C., Airich, K., Doucerain, C., Aguzzi, A. et al. (2016) The prion protein is an agonistic ligand of the G protein-coupled receptor Adgrg6. *Nature*, **536**, 464-468. doi:10.1038/nature19312
- [149] Roucou, X., Gains, M., LeBlanc, A. C. (2004) Neuroprotective functions of prion protein. *J. Neurosci. Res.*, **75**, 153-161. doi:10.1002/jnr.10864
- [150] Guillot-Sestier, M. V., Sunyach, C., Druon, C., Scarzello, S., Checler, F. (2009) The alpha-secretase-derived N-terminal product of cellular prion, N1, displays neuroprotective function in vitro and in vivo. *J. Biol. Chem.*, **284**, 35973-35986. doi:10.1074/jbc.M109.051086
- [151] Mouillet-Richard, S., Ermonval, M., Chebassier, C., Laplanche, J. L., Lehmann, S., Launay, J. M., Kellermann, O. (2000) Signal transduction through prion protein. *Science*, **289**, 1925-1928. doi:10.1126/science.289.5486.1925
- [152] Manni, G., Lewis, V., Senesi, M., Spagnoli, G., Fallarino, F., Collins, S. J., Biasini, E. et al. (2020) The cellular prion protein beyond prion diseases. *Swiss. Med. Wkly.*, **150**, w20222. doi:10.4414/smw.2020.20222

- [153] Borchelt, D. R., Koliatsos, V. E., Guarnieri, M., Pardo, C. A., Sisodia, S. S., Price, D. L. (1994) Rapid anterograde axonal transport of the cellular prion glycoprotein in the peripheral and central nervous systems. *J. Biol. Chem.*, **269**, 14711-14714.
- [154] Moya, K. L., Hassig, R., Creminon, C., Laffont, I., Di Giamberardino, L. (2004) Enhanced detection and retrograde axonal transport of PrP^C in peripheral nerve. *J. Neurochem.*, **88**, 155-160. doi:10.1046/j.1471-4159.2003.02150.x
- [155] Steele, A. D., Emsley, J. G., Ozdinler, P. H., Lindquist, S., Macklis, J. D. (2006) Prion protein (PrP^C) positively regulates neural precursor proliferation during developmental and adult mammalian neurogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 3416-3421. doi:10.1073/pnas.0511290103
- [156] Mehrabian, M., Brethour, D., Wang, H., Xi, Z., Rogaeva, E., Schmitt-Ulms, G. (2015) The Prion Protein Controls Polysialylation of Neural Cell Adhesion Molecule 1 during Cellular Morphogenesis. *PLoS One*, **10**, e0133741. doi:10.1371/journal.pone.0133741
- [157] Lopes, M. H., Hajj, G. N., Muras, A. G., Mancini, G. L., Castro, R. M., Ribeiro, K. C., Martins, V. R. et al. (2005) Interaction of cellular prion and stress-inducible protein 1 promotes neuritogenesis and neuroprotection by distinct signaling pathways. *J. Neurosci.*, **25**, 11330-11339. doi:10.1523/JNEUROSCI.2313-05.2005
- [158] Pan, K. M., Baldwin, M., Nguyen, J., Gasset, M., Serban, A., Groth, D. et al. (1993) Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 10962-10966. doi:10.1073/pnas.90.23.10962
- [159] Godsave, S. F., Peters, P. J., Wille, H. (2015) Subcellular distribution of the prion protein in sickness and in health. *Virus. Res.*, **207**, 136-145. doi:10.1016/j.virusres.2015.02.004

- [160] Baiardi, S., Rossi, M., Capellari, S., Parchi, P. (2019) Recent advances in the histo-molecular pathology of human prion disease. *Brain Pathol.*, **29**, 278-300. doi:10.1111/bpa.12695
- [161] Larson, M., Sherman, M. A., Amar, F., Nuvolone, M., Schneider, J. A., Bennett, D. A., Lesne, S. E. et al. (2012) The complex PrP(c)-Fyn couples human oligomeric Abeta with pathological tau changes in Alzheimer's disease. *J. Neurosci.*, **32**, 16857-16871a. doi:10.1523/JNEUROSCI.1858-12.2012
- [162] Fang, C., Wu, B., Le, N. T. T., Imberdis, T., Mercer, R. C. C., Harris, D. A. (2018) Prions activate a p38 MAPK synaptotoxic signaling pathway. *PLoS Pathog.*, **14**, e1007283. doi:10.1371/journal.ppat.1007283
- [163] Le, N. T. T., Wu, B., Harris, D. A. (2019) Prion neurotoxicity. *Brain Pathol.*, **29**, 263-277. doi:10.1111/bpa.12694
- [164] Younan, N. D., Sarell, C. J., Davies, P., Brown, D. R., Viles, J. H. (2013) The cellular prion protein traps Alzheimer's Abeta in an oligomeric form and disassembles amyloid fibers. *FASEB J.*, **27**, 1847-1858. doi:10.1096/fj.12-222588
- [165] Ferreira, D. G., Temido-Ferreira, M., Vicente Miranda, H., Batalha, V. L., Coelho, J. E., Szego, E. M., Outeiro, T. F. et. al. (2017) alpha-synuclein interacts with PrP(C) to induce cognitive impairment through mGluR5 and NMDAR2B. *Nat. Neurosci.*, **20**, 1569-1579. doi:10.1038/nn.4648
- [166] Head, M. W., Ironside, J. W. (2012) Review: Creutzfeldt-Jakob disease: prion protein type, disease phenotype and agent strain. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, **38**, 296-310. doi:10.1111/j.1365-2990.2012.01265.x
- [167] Artikis, E., Kraus, A., Caughey, B. (2022) Structural biology of ex vivo mammalian prions. *J. Biol. Chem.*, **298**, 102181. doi:10.1016/j.jbc.2022.102181
- [168] Hallinan, G. I., Ozcan, K. A., Hoq, M. R., Cracco, L., Vago, F. S., Bharath, S. R., Vidal, R. et al. (2022) Cryo-EM structures of prion protein filaments from Gerstmann-Straussler-Scheinker disease. *Acta Neuropathol.*, **144**, 509-520. doi:10.1007/s00401-022-02461-0

- [169] Wang, L. Q., Zhao, K., Yuan, H. Y., Li, X. N., Dang, H. B., Ma, Y., Liang, Y. et al. (2021) Genetic prion disease-related mutation E196K displays a novel amyloid fibril structure revealed by cryo-EM. *Sci. Adv.*, **7**, eabg9676. doi:10.1126/sciadv.abg9676
- [170] Hermann, P., Appleby, B., Brandel, J. P., Caughey, B., Collins, S., Geschwind, M. D., Zerr, I. et al. (2021) Biomarkers and diagnostic guidelines for sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet Neurol.*, **20**, 235-246. doi:10.1016/S1474-4422(20)30477-4
- [171] Sawaya, M. R., Sambashivan, S., Nelson, R., Ivanova, M. I., Sievers, S. A., Apostol, M. I., Eisenberg, D. et al. (2007) Atomic structures of amyloid cross-beta spines reveal varied steric zippers. *Nature*, **447**, 453-457. doi:10.1038/nature05695
- [172] Apostol, M. I., Wiltzius, J. J., Sawaya, M. R., Cascio, D., Eisenberg, D. (2011) Atomic structures suggest determinants of transmission barriers in mammalian prion disease. *Biochemistry*, **50**, 2456-2463. doi:10.1021/bi101803k
- [173] Will, R. G. (2003) Acquired prion disease: iatrogenic CJD, variant CJD, kuru. *Br. Med. Bull.*, **66**, 255-265. doi:10.1093/bmb/66.1.255
- [174] Will, R. G., Ironside, J. W., Zeidler, M., Cousens, S. N., Estibeiro, K., Alperovitch, A., Smith, P. G. et al. (1996) A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. *Lancet*, **347**, 921-925. doi:10.1016/s0140-6736(96)91412-9
- [175] Cracco, L., Appleby, B. S., Gambetti, P. (2018) Fatal familial insomnia and sporadic fatal insomnia. *Handb. Clin. Neurol.*, **153**, 271-299. doi:10.1016/B978-0-444-63945-5.00015-5
- [176] Webb, T. E., Poulter, M., Beck, J., Uphill, J., Adamson, G., Campbell, T., Mead, S. et al. (2008) Phenotypic heterogeneity and genetic modification of P102L inherited prion disease in an international series. *Brain*, **131**, 2632-2646. doi:10.1093/brain/awn202
- [177] Maddox, R. A., Person, M. K., Blevins, J. E., Abrams, J. Y., Appleby, B. S., Schonberger, L. B., Belay, E. D. (2020) Prion disease incidence in the United

- States: 2003-2015. *Neurology*, **94**, e153-e157.
doi:10.1212/WNL.00000000000008680
- [178] Brandel, J. P., Peckeu, L., Haik, S. (2013) The French surveillance network of Creutzfeldt-Jakob disease. Epidemiological data in France and worldwide. *Transfus. Clin. Biol.*, **20**, 395-397. doi:10.1016/j.traccli.2013.02.029
- [179] Bueler, H., Aguzzi, A., Sailer, A., Greiner, R. A., Autenried, P., Aguet, M., Weissmann, C. (1993) Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell*, **73**, 1339-1347. doi:10.1016/0092-8674(93)90360-3
- [180] Hara, H., Chida, J., Uchiyama, K., Pasiana, A. D., Takahashi, E., Kido, H., Sakaguchi, S. (2021) Neurotropic influenza A virus infection causes prion protein misfolding into infectious prions in neuroblastoma cells. *Sci. Rep.*, **11**, 10109. doi:10.1038/s41598-021-89586-6
- [181] Saa, P., Sferrazza, G. F., Ottenberg, G., Oelschlegel, A. M., Dorsey, K., Lasmezas, C. I. (2012) Strain-specific role of RNAs in prion replication. *J. Virol.*, **86**, 10494-10504. doi:10.1128/JVI.01286-12
- [182] Asuni, A. A., Pankiewicz, J. E., Sadowski, M. J. (2013) Differential molecular chaperone response associated with various mouse adapted scrapie strains. *Neurosci. Lett.*, **538**, 26-31. doi:10.1016/j.neulet.2013.01.027
- [183] McBride, P. A., Schulz-Schaeffer, W. J., Donaldson, M., Bruce, M., Diringer, H., Kretzschmar, H. A., Beekes, M. (2001) Early spread of scrapie from the gastrointestinal tract to the central nervous system involves autonomic fibers of the splanchnic and vagus nerves. *J. Virol.*, **75**, 9320-9327. doi:10.1128/JVI.75.19.9320-9327.2001
- [184] Kaatz, M., Fast, C., Ziegler, U., Balkema-Buschmann, A., Hammerschmidt, B., Keller, M., Groschup, M. H. et al. (2012) Spread of classic BSE prions from the gut via the peripheral nervous system to the brain. *Am. J. Pathol.*, **181**, 515-524. doi:10.1016/j.ajpath.2012.05.001
- [185] Diaz Heijtz, R., Wang, S., Anuar, F., Qian, Y., Bjorkholm, B., Samuelsson, A., Pettersson, S. et al. (2011) Normal gut microbiota modulates brain

- development and behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 3047-3052. doi:10.1073/pnas.1010529108
- [186] Lee, Y. K., Menezes, J. S., Umesaki, Y., Mazmanian, S. K. (2011) Proinflammatory T-cell responses to gut microbiota promote experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 4615-4622. doi:10.1073/pnas.1000082107
- [187] Kryndushkin, D. S., Engel, A., Edskes, H., Wickner, R. B. (2011) Molecular chaperone Hsp104 can promote yeast prion generation. *Genetics*, **188**, 339-348. doi:10.1534/genetics.111.127779
- [188] Nakato, G., Hase, K., Suzuki, M., Kimura, M., Ato, M., Hanazato, M., Ohno, H. et al. (2012) Cutting Edge: *Brucella abortus* exploits a cellular prion protein on intestinal M cells as an invasive receptor. *J. Immunol.*, **189**, 1540-1544. doi:10.4049/jimmunol.1103332
- [189] Le-Dao, H. A., Dinh, T. T., Tran, T. L., Lee, V. S., Tran-Van, H. (2024) Molecular Dynamics Simulations Reveal Novel Interacting Regions of Human Prion Protein to *Brucella abortus* Hsp60 Protein. *Mol. Biotechnol.*, **66**, 687-695. doi:10.1007/s12033-023-00655-9
- [190] Baykov, A. A., Evtushenko, O. A., Avaeva, S. M. (1988) A malachite green procedure for orthophosphate determination and its use in alkaline phosphatase-based enzyme immunoassay. *Anal. Biochem.*, **171**, 266-270. doi:10.1016/0003-2697(88)90484-8
- [191] Melnikova, A., Pozdyshev, D., Barinova, K., Kudryavtseva, S., Muronetz, V. I. (2020) α -Synuclein Overexpression in SH-SY5Y Human Neuroblastoma Cells Leads to the Accumulation of Thioflavin S-positive Aggregates and Impairment of Glycolysis. *Biochemistry (Mosc)*, **85**, 604–613. doi: 10.1134/S0006297920050090.
- [192] Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685. doi: 10.1038/227680a0.
- [193] Giehm, L., Lorenzen, N., Otzen, D. E. (2011) Assays for alpha-synuclein aggregation. *Methods*, **53**, 295-305. doi:10.1016/j.ymeth.2010.12.008

- [194] Bousset, L., Pieri, L., Ruiz-Arlandis, G., Gath, J., Jensen, P. H., Habenstein, B., Melki, R. et al. (2013) Structural and functional characterization of two alpha-synuclein strains. *Nat. Commun.*, **4**, 2575. doi:10.1038/ncomms3575
- [195] Lee, H. J., Shin, S. Y., Choi, C., Lee, Y. H., Lee, S. J. (2002) Formation and removal of alpha-synuclein aggregates in cells exposed to mitochondrial inhibitors. *J. Biol. Chem.*, **277**, 5411-5417. doi:10.1074/jbc.M105326200
- [196] Delenclos, M., Burgess, J. D., Lamprokostopoulou, A., Outeiro, T. F., Vekrellis, K., McLean, P. J. (2019) Cellular models of alpha-synuclein toxicity and aggregation. *J. Neurochem.*, **150**, 566-576. doi:10.1111/jnc.14806
- [197] Hill, A. F. (2008) Prion Protein Protocols: Humana Press.
- [198] Bocharova, O. V., Makarava, N., Breydo, L., Anderson, M., Salnikov, V. V., Baskakov, I. V. (2006) Annealing prion protein amyloid fibrils at high temperature results in extension of a proteinase K-resistant core. *J. Biol. Chem.*, **281**, 2373-2379. doi:10.1074/jbc.M510840200
- [199] Qi, X., Moore, R. A., McGuirl, M. A. (2012) Dissociation of recombinant prion protein fibrils into short protofilaments: implications for the endocytic pathway and involvement of the N-terminal domain. *Biochemistry*, **51**, 4600-4608. doi:10.1021/bi300201e
- [200] Simoneau, S., Rezaei, H., Sales, N., Kaiser-Schulz, G., Lefebvre-Roque, M., Vidal, C., Lasmezas, C. I. et al. (2007) In vitro and in vivo neurotoxicity of prion protein oligomers. *PLoS Pathog.*, **3**, e125. doi:10.1371/journal.ppat.0030125
- [201] Rezaei, H., Eghiaian, F., Perez, J., Doublet, B., Choiset, Y., Haertle, T., Grosclaude, J. (2005) Sequential generation of two structurally distinct ovine prion protein soluble oligomers displaying different biochemical reactivities. *J. Mol. Biol.*, **347**, 665-679. doi:10.1016/j.jmb.2005.01.043