

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Лейси Евгения Викторовна

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

1.1.10. Биомеханика и биоинженерия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва – 2025

Работа выполнена на факультете биоинженерии и биоинформатики Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

Научные руководители - **Муронец Владимир Израилевич**
доктор биологических наук, профессор
Курочкина Лидия Петровна
кандидат химических наук

Официальные оппоненты - **Левицкий Дмитрий Иванович** – доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», лаборатория структурной биохимии белка, заведующий лабораторией.

Шеваль Евгений Валерьевич – доктор биологических наук, Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н.Белозерского Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», лаборатория ультраструктуры клеточного ядра, заведующий лабораторией.

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

Защита диссертации состоится 3 сентября 2025 года в 16:00 на заседании диссертационного совета МГУ.015.10 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119234, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 73, Факультет биоинженерии и биоинформатики, ауд. 221.

E-mail: dissovet@belozersky.msu.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций Научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Москва, Ломоносовский просп., д. 27) и на портале <https://dissovet.msu.ru/dissertation/3511>

Автореферат разослан «___» _____ 2025 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат химических наук



И.В. Шаповалова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность и степень разработанности темы исследования

Вследствие неправильного сворачивания (мисфолдинга) и агрегации некоторых белков развивается ряд нейродегенеративных заболеваний. В частности, мисфолдинг и агрегация α -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. Неправильное сворачивание и агрегация другого белка, а именно прионного белка, приводит к развитию прионных заболеваний, таких как синдром Крейцфельда–Якоба, куру, синдром Герстманна–Штройслера–Шейнкера и хроническая семейная бессонница у человека, почесуха овец (скрепи) и губчатая энцефалопатия коров.

При этом, с образовавшимися агрегатами так или иначе взаимодействует клеточная система шаперонов. 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. Возможно, формирование фибрилл из амилоидогенных 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. Однако, в настоящее время практически отсутствуют полноценные данные о сравнении влияния разных шаперонов на патологическую трансформацию α -синуклеина и прионного белка.

В настоящее время α -синуклеин 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 α -синуклеина. Так, до конца не ясны факторы, вызывающие изменение структуры α -синуклеина и его последующую агрегацию в живых организмах, из-за чего также неоднозначны представления об этиологии заболеваний. 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.

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 α -синуклеином, до конца не ясны факторы, вызывающие изменение нормальной структуры белка на патологическую.

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

В то же время, в случае прионного белка, шаперонины, вероятно, напрямую участвуют в его неправильном сворачивании. Было показано, что HSP60 специфично взаимодействует с клеточной формой прионного белка. Также, показано, что GroEL может АТФ-зависимо индуцировать образование агрегатов прионного белка из мономеров рекомбинантного белка *de novo*. Показано, что при связывании мономеров прионного белка с апикальным доменом GroEL происходит развертывание α -спирали прионного белка, что, вероятно, играет роль в его трансформации. 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.

Цель и задачи работы

Целью данной работы является выяснение влияния фаговых шаперонинов на патологическую трансформацию α -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 α -синуклеина.
- 2) Продемонстрировать влияние коэкспрессии генов мутантной формы α -синуклеина A53T и шаперонина ОВР в клетках НЕК293Т на агрегацию α -синуклеина.
- 3) Сравнить влияние делеционных мутантов шаперонина ОВР, а именно его апикального домена и мутантной формы, лишенной этих доменов, на амилоидную трансформацию α -синуклеина A53T.
- 4) Оценить влияние шаперонинов EL и ОВР 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 ОВР в отсутствие АТФ препятствуют образованию амилоидных фибрилл α -синуклеина. Инкубация α -синуклеина с EL или ОВР в присутствии АТФ, напротив, стимулирует к образованию амилоидных фибрилл α -синуклеина, токсичных для клеток НЕК293Т и SH-SY5Y. Показано влияние делеционных мутантов ОВР, а именно: его апикального домена и мутантной формы, лишенной этих доменов, на амилоидную трансформацию α -синуклеина A53T.

Впервые показано, что коэкспрессия генов шаперонина ОВР и мутантной формы α -синуклеина A53T в эукариотических клетках НЕК293Т приводит к образованию небольшого количества агрегатов α -синуклеина, которые не влияют на жизнеспособность клеток.

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

Теоретическая и практическая значимость работы

Полученные результаты дополняют теоретические представления о влиянии шаперонинов на патологическую трансформацию амилоидных белков: α -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 α -синуклеина A53T и шаперонина ОВР в эукариотических клетках позволит прояснить роль шаперонинов в трансформации α -синуклеина.

Положения, выносимые на защиту

1) Фаговые шаперонины EL и ОВР оказывают влияние на агрегацию α -синуклеина при инкубации *in vitro*: в отсутствие АТР оба шаперонина препятствуют образованию амилоидных фибрилл, а в присутствии АТР вызывают образование фибрилл α -синуклеина, токсичных для клеток НЕК293Т и SH-SY5Y.

2) Коэкспрессия генов мутантной формы α -синуклеина A53T и шаперонина ОВР в клетках НЕК293Т приводит к образованию небольшого количества агрегатов α -синуклеина, что не влияет на жизнеспособность клеток.

3) Делеционные мутанты шаперонина ОВР влияют на амилоидную трансформацию α -синуклеина A53T: апикальный домен шаперонина ОВР препятствует амилоидной трансформации, а мутантная форма, лишенная апикальных доменов, воздействует на агрегацию α -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.

Степень достоверности данных

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

Личный вклад автора

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 работы

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».

Апробация работы

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 диссертации

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

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Объектами исследования были рекомбинантный α -синуклеин человека с мутацией A53T, рекомбинантный овечий прионный белок, рекомбинантные фаговые шаперонины EL и ОВР и делеционные мутанты ОВР (апикальный домен и мутантная форма без апикальных доменов). **Продукцию рекомбинантных белков** проводили в *E.coli*. Шаперонины EL и ОВР выделяли с помощью ионообменной хроматографии на Q-Sepharose. Прионный белок выделяли с помощью аффинной хроматографии на Ni-связанной сефарозе, α -синуклеин выделяли методом кислотного осаждения примесных белков. Для **определения влияния шаперонинов и их мутантных форм на фибриллизацию α -синуклеина** белки инкубировали в 50 мМ буфере Трис-HCl (pH 7,5),

100 мМ NaCl, 50 мМ KCl, 10 мМ MgCl₂, 0,02% NaN₃ и 0,5 мМ ThT с добавлением или без добавления 10 мМ АТФ при 37°C и орбитальном встряхивании 600 об/мин. Для **определения влияния шаперонинов и их мутантных форм на агрегацию прионного белка** белки инкубировали в 50 мМ буфере Трис-НСl (рН 7,5), 50 мМ KCl, 10 мМ MgCl₂ с добавлением или без добавления 10 мМ АТФ при 25°C и орбитальном встряхивании 570 об/мин. **Трансмиссионную электронную микроскопию** использовали для получения электронных микрографий образуемых агрегатов α -синуклеина и прионного белка. **Интенсивность флуоресценции ThT** измеряли при длине волны возбуждения 435 нм и регистрировали эмиссию при 482 нм на планшетном ридере CLARIOstar (BMG LABTECH GmbH, Германия). **С помощью трансфекции** получали клетки НЕК293Т и SH-SY5Y, продуцирующие α -синуклеин А53Т и шаперонин ОВР. **Успешность трансфекции и локализацию белков определяли** иммуноцитохимически. **Образование агрегатов α -синуклеина А53Т в клетках НЕК293Т** оценивали с помощью вестерн-блот-анализа фракционированных лизатов клеток. Цитотоксичность агрегатов α -синуклеина и прионного белка, получаемых *in vitro*, и выживаемость клеток после трансфекции определяли с помощью **МТТ-теста**. **Спектры флуоресценции ThT** прописывали на спектрофлуориметре FluoroMax-3 (Horiba Jobin Yvon, Франция) при длине волны возбуждающего света 435 нм. **Контроль среднего размера частиц** проводили методом динамического светорассеяния на приборе Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments, Malvern, Великобритания).

Результаты и их обсуждение

1. Влияние двухкольцевого шаперонина EL и однокольцевого шаперонина ОВР на фибриллизацию мутантной формы α -синуклеина А53Т

В начале нашей работы мы оценили влияние фаговых шаперонинов, а именно двухкольцевого EL и однокольцевого ОВР, на фибриллизацию α -синуклеина при их совместной инкубации *in vitro*. Так как по литературным данным шаперонины бактерий и эукариот препятствуют агрегации синуклеина, мы выбрали близкие к физиологическим условиям значения рН и ионной силы, в которых α -синуклеин образует амилоидные фибриллы: концентрация α -синуклеина 50 мкМ, 37°C, 600 об/мин. Мономеры белка инкубировали совместно или без добавления 2,5 мкМ шаперонинов EL или ОВР, в присутствии или без добавления 10 мМ АТФ.

Полученные результаты показывают, что оба шаперонина влияют на фибриллизацию α -синуклеина сходным образом, при этом их действие зависит от АТФ.

Так, в отсутствие АТР шаперонины увеличивают время лаг-фазы по сравнению со спонтанной фибриллизацией α -синуклеина А53Т (рис. 1А). Кроме того, в данном случае через 24 часа с начала инкубации на электронных микрографиях мы наблюдали небольшое количество коротких фибрилл и аморфных агрегатов как в случае EL (рис. 1С), так и в случае ОВР (рис. 1D). В то же время, контрольный α -синуклеин А53Т, инкубируемый без добавления шаперонинов, образует длинные фибриллы (рис. 1В). Полученные данные свидетельствуют о том, что в данном случае шаперонины препятствуют агрегации α -синуклеина.

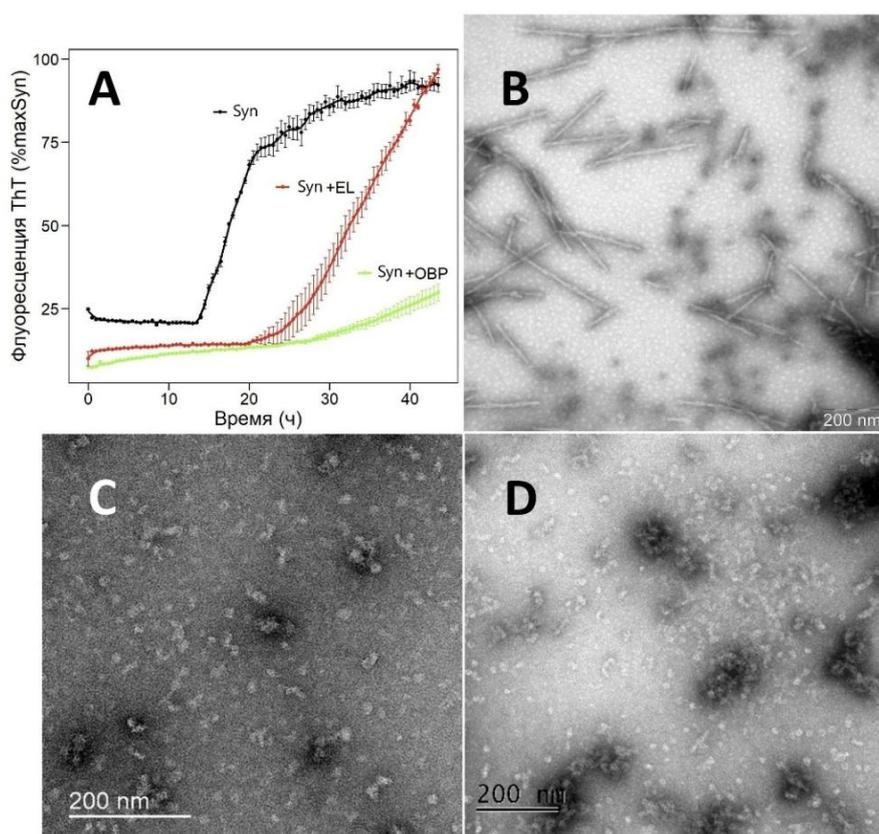


Рисунок 1. Инкубация α -синуклеина А53Т (Syn) совместно с шаперонинами ОВР или EL.

А – изменение флуоресценции ThT.

В-Д – электронные микрографии проб через 24 часа с начала инкубации: **В** – Syn, **С** – Syn+EL, **Д** – Syn+ОВР

Фибриллизация проводилась в 50 мМ Трис-НСl (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 600 об/мин.

Концентрации мономеров α -синуклеина и шаперонинов составляли 50 мкМ и 2,5 мкМ, соответственно.

При инкубации α -синуклеина А53Т совместно с шаперонинами в присутствии АТР мы получили противоположную картину. Как видно на электронных микрографиях фибриллы α -синуклеина образуются через 24 часа с начала инкубации (рис. 2В–D). Об амилоидной природе полученных фибрилл свидетельствуют данные по флуоресценции ThT (рис. 2А). Кроме того, шаперонины, вероятно, ускоряют фибриллизацию α -синуклеина, причем ОВР действует эффективнее, чем EL, о чем свидетельствует более короткая лаг-фаза (рис. 2А).

Затем мы оценили цитотоксичность агрегатов α -синуклеина А53Т, полученных нами *in vitro* при инкубации совместно с ОВР для эмбриональных клеток почек НЕК293Т (рис. 2Е) и клеток нейробластомы SH-SY5Y (рис. 2F). По результатам анализа

были получены сопоставимые результаты как для HEK293T, так и для SH-SY5Y. Как и ожидалось, мономеры α -синуклеина, а также шаперонин ОВР в отдельности не оказали существенного влияния на жизнеспособность клеток.

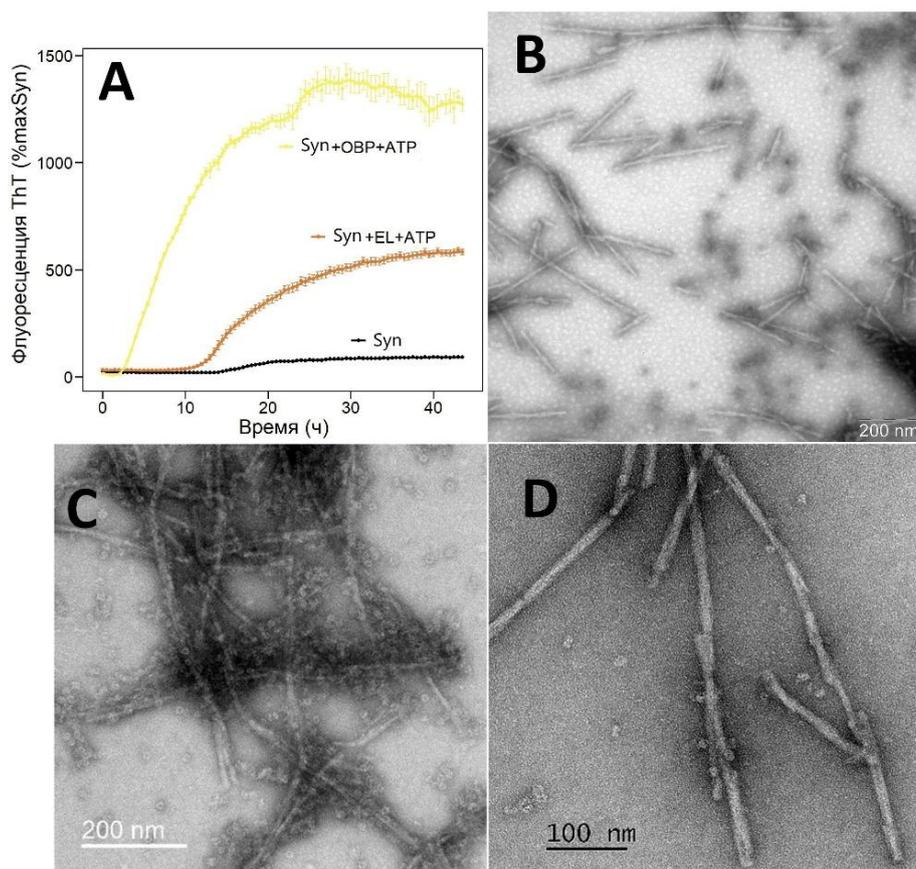


Рисунок 2. Инкубация α -синуклеина A53T (Syn) совместно с шаперонами ОВР или EL в присутствии АТР:

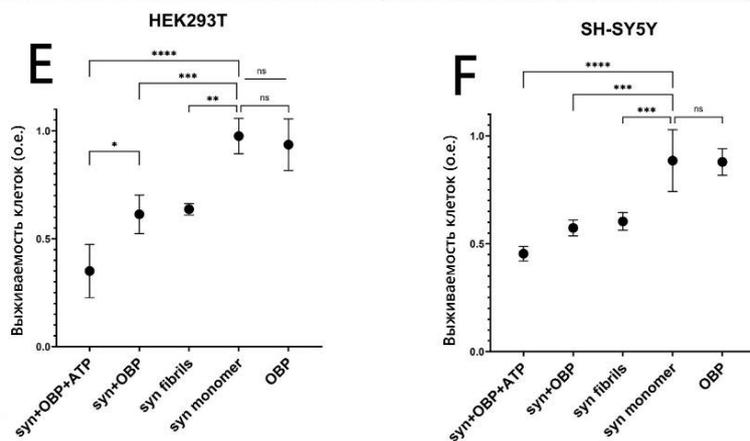
А – Изменение флуоресценции ThT. Фибриллизация проводилась в 50 мМ Трис-НCl (рН 7,5), 100 мМ NaCl, 50 мМ KCl, 10 мМ MgCl₂, 0,02% NaN₃ и 0,5 мМ ThT при 37°C и орбитальном встряхивании 600 об/мин. Концентрации мономеров α -синуклеина, шаперонинов и АТР составляли 50 мкМ, 2,5 мкМ и 10 мМ соответственно.

В-Д – электронные микрографии проб через 24 часа с начала инкубации: В – Syn, С – Syn+EL+АТР, D – Syn+OBP+АТР

Е-Ф – МТТ-тест линий клеток HEK293T (Е) и SH-SY5Y (F). Клетки подвергались воздействию полной среды DMEM/F12, содержащей образцы α -синуклеина A53T в концентрации 0,8 мкМ: контрольный α -синуклеин до фибриллизации *in vitro* (syn monomer), α -синуклеин после 24-часовой инкубации

с шаперонином ОВР и АТР (syn+OBP+АТР), α -синуклеин после 24-часовой инкубации с шаперонином ОВР без АТР (syn+OBP), α -синуклеин после 24-часовой спонтанной фибриллизации (syn fibrils) и контрольный образец шаперонина ОВР (OBP). Статистическая значимость: * скорректированное p-value <0,05; ** скорректированное p-value <0,01; *** скорректированное p-value <0,001; **** скорректированное p-value <0,0001, ns – незначимо.

В то же время, токсичность агрегатов, образуемых α -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 α -синуклеина, инкубируемого в присутствии ОВР без АТР обусловлена наличием в пробе коротких фибрилл и олигомеров, которые появляются в процессе инкубации. Наибольшей токсичностью обладают фибриллы, образуемые под действием ОВР в присутствии АТР. Стоит отметить, что статистически значимые результаты нами были получены лишь для клеток НЕК293Т. Вероятно, такой эффект связан с тем, что АТР-зависимое действие шаперонина приводит к образованию большего количества амилоидных фибрилл, которые обеспечивают высокую токсичность образца.

Таким образом, полученные результаты показывают, что фаговые шаперонины могут способствовать фибриллизации α -синуклеина в присутствии АТР и подавлять ее в отсутствие АТР.

2. Влияние однокольцевого шаперонина ОВР на агрегацию α -синуклеина А53Т при их коэкспрессии в клетках млекопитающих

Чтобы проверить влияние фаговых шаперонинов на амилоидное превращение α -синуклеина в условиях, более близких к условиям *in vivo*, исследуемые белки были коэкспрессированы в клеточной линии эмбриональных почек человека НЕК293Т. Для экспериментов мы выбрали наиболее эффективно действующий на конверсию α -синуклеина однокольцевой шаперонин ОВР. Помимо этого, мы остановили свой выбор на мутантной форме α -синуклеина – А53Т, для которого характерна более быстрая кинетика фибриллизации.

Чтобы проверить, будут ли продуцироваться исследуемые нами белки в клетках, мы трансфицировали клетки НЕК293Т плазмидой, содержащий ген 246, кодирующий шаперонин ОВР. Аналогично мы трансфицировали клетки НЕК293Т плазмидой, содержащей ген SNCA с мутацией А53Т, кодирующим мутантную форму α -синуклеина – А53Т. Через 2 дня после трансфекции клетки лизировали PBS, содержащим Тритон X-100, и центрифугировали для разделения на растворимую и нерастворимую фракции. По результатам эксперимента показано, что α -синуклеин А53Т (рис. 3С) и шаперонин ОВР (рис. 3В) успешно продуцируются в клетках, причем обнаруживаются только в растворимой фракции. Стоит отметить, что в данном случае, α -синуклеин А53Т в клетках, вероятно, находится в мономерной форме, т.к. известно, что агрегированный α -синуклеин нерастворим в детергентах.

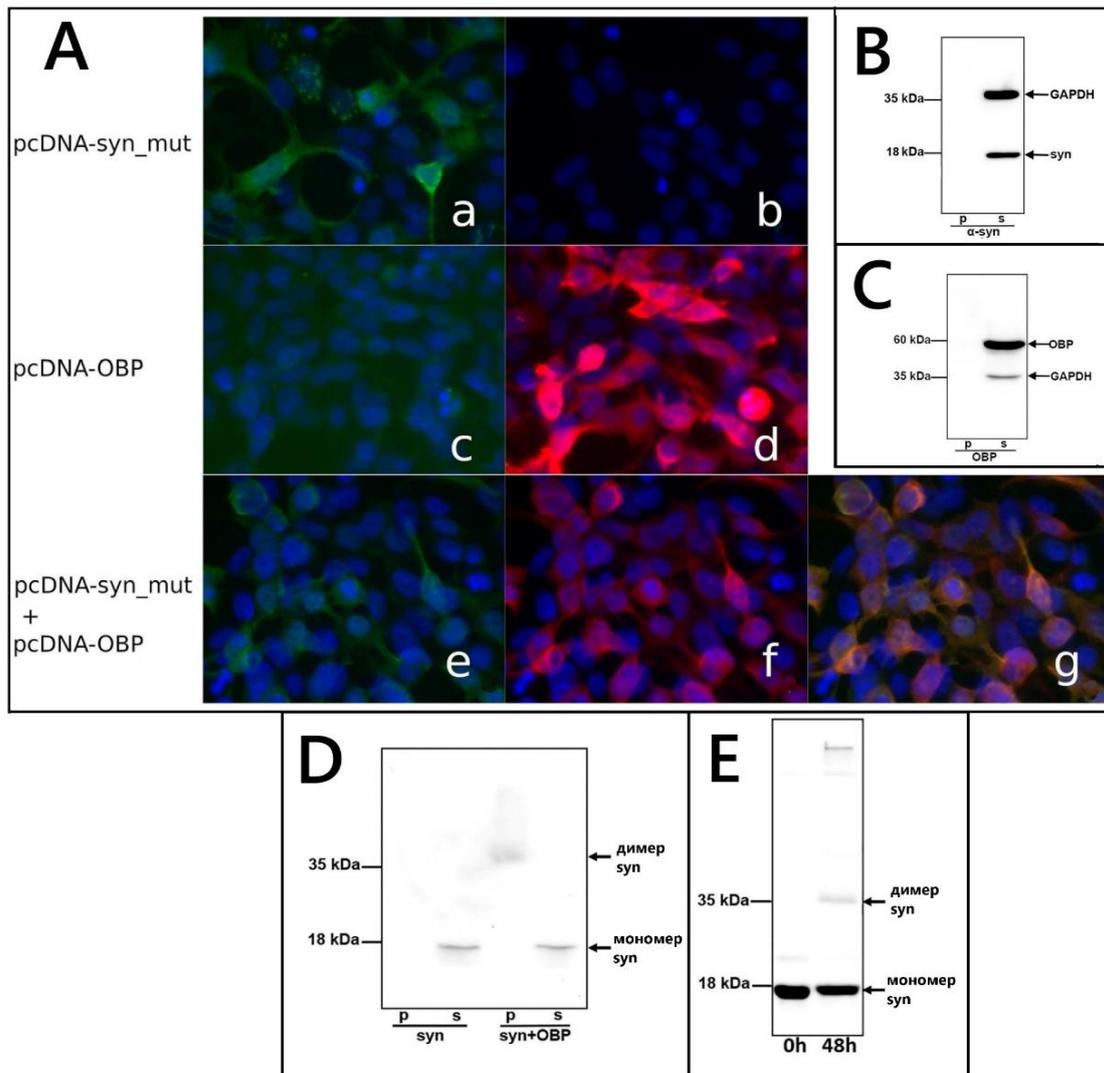


Рисунок 3. Влияние шаперонина OBP на агрегацию α -синуклеина A53T (syn) при их коэкспрессии в клетках:

A – Иммуноцитохимический анализ клеток HEK293T, экспрессирующих α -синуклеин и/или OBP. *a, b* - Транзientная трансфекция клеток плазмидой, содержащей мутантный ген α -синуклеина (pcDNA-syn_mut). *c, d* - Транзientная трансфекция клеток плазмидой, содержащей ген шаперонина OBP (pcDNA-OBP). *e, f, g* - Транзientная трансфекция клеток смесью плазмид, содержащих ген шаперонина OBP и ген α -синуклеина A53T (pcDNA-OBP + pcDNA-syn_mut). Окрашивание антителами против α -синуклеина (зеленый канал, *a, c, e*) 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*).

B-D – Вестерн-блот-анализ фракционированных лизатов клеток HEK293T после трансфекции плазмидой, кодирующей мутантную форму α -синуклеин A53T (**B**), шаперонин OBP (**C**) и после котрансфекции плазмидами, кодирующими гены обоих белков (**D**). Показаны нерастворимые (p) и растворимые (s) в Тритон X-100 фракции клеток через 48 ч после трансфекции. Мембраны также были окрашены первичными антителами против глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (GAPDH) (**B, C**). В качестве вторичных антител использовались конъюгированные с пероксидазой хрена антимышьиные антитела.

E – Вестерн-блот-анализ нерастворимых фракций контрольных фибрилл α -синуклеина A53T, полученных *in vitro* с рекомбинантным шаперонином OBP в присутствии ATP в начале (0 ч) и в конечной точке (48 ч) фибриллизации.

Затем мы трансфицировали клетки обеими плазмидами. Для визуализации белков в клетках мы использовали иммуоцитохимический анализ. По результатам эксперимента видно, что оба белка как по отдельности (рис. 3А a-d), так и при совместной экспрессии (рис. 3А e-f) успешно продуцируются в клетках и преимущественно диффузно распределены в цитоплазме. Анализ колокализации (рис. 3А g) показал, что во время совместной продукции, по сравнению с их отдельной продукцией, не наблюдается существенных изменений в локализации любого из белков.

Для обнаружения агрегатов α -синуклеина в клетках мы использовали более чувствительный метод, а именно вестерн-блот-анализ растворимых и нерастворимых в Тритон X-100 фракций клеточных лизатов. Видно, что трансфекция клеток НЕК293Т сразу двумя плазмидами, содержащими ген шаперонина ОВР и ген α -синуклеина А53Т, приводит к образованию в клетках небольшого количества олигомерных форм α -синуклеина, обнаруживаемых в нерастворимой фракции (рис. 3D).

Для сравнения мы таким же образом проанализировали фибриллы α -синуклеина А53Т, полученные *in vitro* с участием рекомбинантного шаперонина ОВР в присутствии АТР (рис. 3Е). Было обнаружено, что в нерастворимой в Тритон X-100 фракции таких фибрилл, в дополнение к полосе мономеров α -синуклеина, четко обнаруживались полосы димеров и высокомолекулярных продуктов, аналогичные полосам, полученным при коэкспрессии белков в клетках НЕК293Т (рис. 3D).

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что шаперонин ОВР способствует агрегации α -синуклеина А53Т в клетках НЕК293Т.

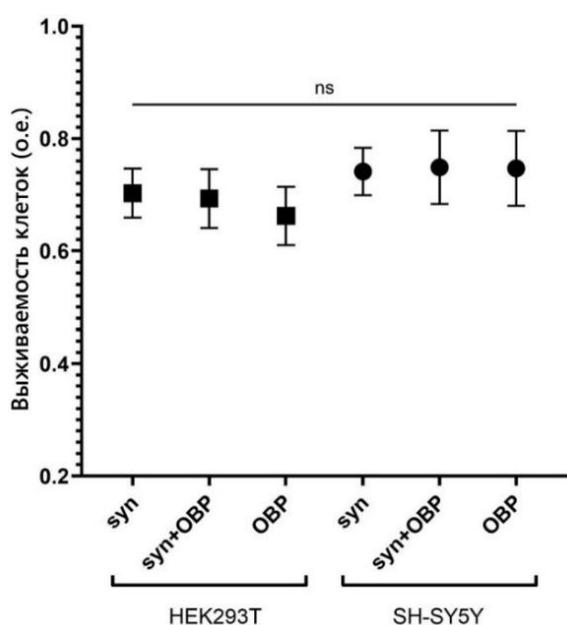


Рисунок 4. Выживаемость линий клеток НЕК293Т и SH-SY5Y через 3 дня после трансфекции плазмидой, кодирующей α -синуклеин А53Т (syn), плазмидой, кодирующей шаперонин ОВР (OVP), или смесью этих плазмид (syn+OVP), определенная с использованием МТТ-теста. Различия внутри каждой линии клеток статистически не значимы (ns).

Так как при коэкспрессии белков образуются агрегированные формы α -синуклеина, мы проанализировали, как это влияет на выживаемость клеток (рис. 4). Поскольку клеточные пути агрегации α -синуклеина представляют интерес для моделирования патологических процессов при синуклеинопатиях, эффект коэкспрессии на выживаемость клеток был оценен не только на клеточной линии НЕК293Т, но и на клеточной линии SH-SY5Y, которая является принятой нейроноподобной моделью. По результатам МТТ-теста через 3 дня после трансфекции не было выявлено различий в жизнеспособности клеток двух линий при экспрессии α -синуклеина и шаперонина ОВР как по отдельности, так и при совместной экспрессии. Полученные данные свидетельствуют о том, что количество олигомерных форм, накапливаемых в клетке при коэкспрессии α -синуклеина А53Т и ОВР, недостаточно для значимого цитотоксического эффекта. Не исключено, что эти олигомерные формы обладают свойствами, отличными от свойств олигомеров α -синуклеина, образующихся в отсутствие шаперонина.

3. Влияние делеционных мутантов ОВР на агрегацию α -синуклеина А53Т

3.1. Влияние апикального домена ОВР агрегацию α -синуклеина А53Т

Апикальные домены шаперонинов отвечают за узнавание и связывание белков-субстратов. Мы проанализировали, как будет меняться кинетика фибриллизации α -синуклеина при добавлении апикального домена ОВР. Для этого мы инкубировали α -синуклеин А53Т совместно с апикальным доменом ОВР и отслеживали образование амилоидных фибрилл по увеличению флуоресценции ThT.

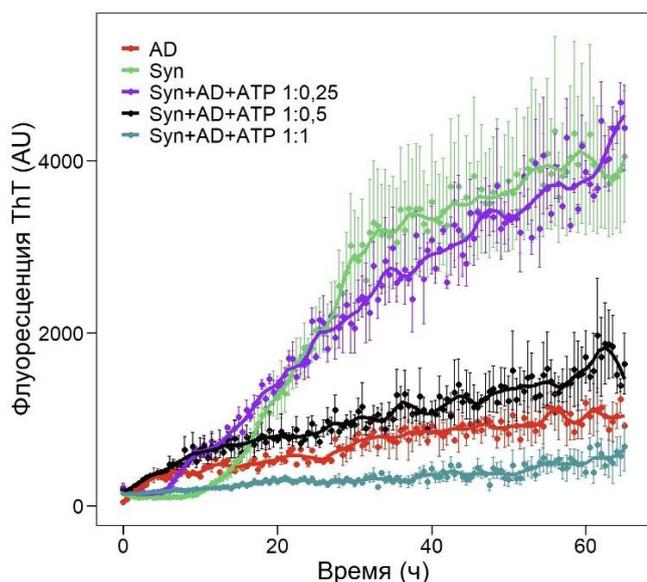


Рисунок 5. Изменение флуоресценции ThT во время фибриллизации α -синуклеина А53Т (Syn) при его инкубации совместно с апикальным доменом шаперонина ОВР (AD) при различных соотношениях белков в образце.

Реакция проводилась в 50 мМ буфере Трис-НСl, рН 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 мономера α -синуклеина А53Т и ATP составляли 50 мкМ и 10 мМ, соответственно.

Результаты эксперимента показали, что при увеличении концентрации апикального домена наблюдается снижение интенсивности флуоресценции ThT. Таким

образом, можно заключить, что рекомбинантный апикальный домен ОВР препятствует амилоидизации α -синуклеина A53T. Вероятно, данный эффект обусловлен связыванием апикального домена с мономерами α -синуклеина.

3.2. Влияние мутантной формы ОВР, не содержащей апикальных доменов на агрегацию α -синуклеина A53T

Анализ рекомбинантной мутантной формы ОВР, не содержащей апикальных доменов (ОВР Δ AD) с помощью электронной микроскопии показал, что она, подобно полноразмерному шаперонину, состоит из 7 субъединиц, формирующих кольцевую структуру (рис. 6А).

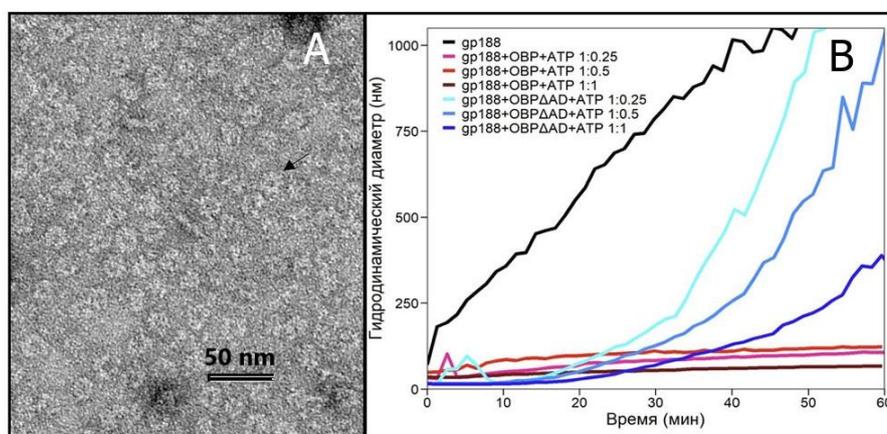


Рисунок 6. Характеристика ОВР Δ AD: **А** – Электронная микрография ОВР Δ AD; **В** – Сравнение влияния полноразмерного шаперонина ОВР и его мутантной формы без апикальных доменов (ОВР Δ AD) на термическую агрегацию эндолизина (gp188) при 45°C.

Концентрация gp188 составляла 3 мкМ.

Гидродинамический диаметр измеряли при различных соотношениях gp188:шаперонин в присутствии 1,2 мМ АТФ в 50 мМ буфере Трис-НСl, рН 7,5, 100 мМ КСl, 10 мМ MgCl₂.

Перед началом экспериментов, мы сравнили функциональную активность полноразмерного ОВР и ОВР Δ AD по их способности защищать свой субстрат – эндолизин – от термической агрегации (рис. 6В). Оба белка защищают эндолизин от агрегации, однако мутантная форма действует с несколько меньшей эффективностью. В частности, при инкубации эндолизина совместно с ОВР не происходит увеличения диаметра частиц на протяжении 60 минут. Однако, при инкубации с ОВР Δ AD даже при соотношении 1:1 диаметр частиц начинает увеличиваться уже 20 минут с начала инкубации. Защитный эффект снижается с уменьшением концентрации ОВР Δ AD.

Затем мы сравнили влияние полноразмерного ОВР и его мутантной формы ОВР Δ AD на фибриллизацию α -синуклеина (рис. 7). По результатам эксперимента, оба белка в данном случае действуют сходным образом. При инкубации α -синуклеина совместно с шаперонинами в отсутствие АТФ интенсивность флуоресценции ThT не увеличивается на протяжении всего эксперимента. Вероятно, это означает, что ОВР Δ AD так же, как и полноразмерный шаперонин, способен связываться с α -синуклеином A53T

и тем самым препятствовать его спонтанной фибриллизации. При инкубации шаперонинов совместно α -синуклеином A53T в присутствии АТФ мы также наблюдали образование амилоидных фибрилл α -синуклеина.

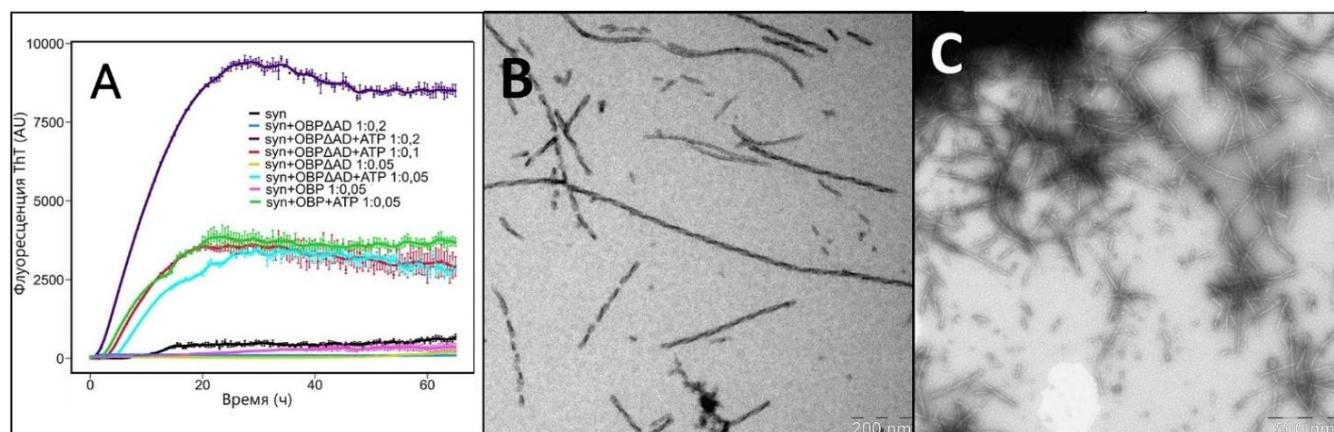


Рисунок 7. Сравнение влияния ОВР и ОВРΔAD на фибриллизацию α -синуклеина A53T: **А** – Изменение интенсивности флуоресценции ThT; **В-С** – электронные микрофотографии фибрилл α -синуклеина, полученных после 67-часовой инкубации с мутантной формой шаперонина ОВРΔAD (**В**) или полноразмерным шаперонином (**С**) в присутствии АТФ. Фибриллизация проводилась в 50 мМ буфере Трис-НСl, рН 7,5, 100 мМ NaCl, 50 мМ KCl, 10 мМ MgCl₂, 0,02% NaN₃ и 0,5 мМ ThT при 37°С и орбитальном встряхивании 700 об/мин. Концентрации мономеров α -синуклеина и АТФ составили 50 мкМ и 10 мМ, соответственно.

4. Влияние фаговых шаперонинов на агрегацию прионного белка

Как известно из литературных данных, шаперонины, такие как GroE, способствуют развитию патологии. Поэтому в работе было исследовано влияние фаговые шаперонины, а именно однокольцевой ОВР и двухкольцевой EL, на агрегацию прионного белка. Для проведения экспериментов мы выбрали условия, в которых не происходит спонтанной амилоидизации прионного белка: нейтральный рН, T = 25°С и отсутствие в растворе детергентов. Мы проводили реакцию как в присутствии, так и в отсутствие АТФ, чтобы убедиться, что оказываемый эффект связан именно с функционированием шаперонинов.

В процессе инкубации мы отбирали аликвоты из реакционных смесей и анализировали спектры флуоресценции ThT. Для подтверждения агрегации прионного белка мы также дополняли исследование другими методами, а именно трансмиссионной электронной микроскопией и динамическим светорассеянием.

Из результатов эксперимента следует, что в данных условиях действительно не происходит спонтанной конверсии и агрегации прионного белка (рис. 8). Интенсивность флуоресценции ThT остается на низком уровне, а также не происходит увеличения гидродинамического диаметра частиц. Кроме того, при инкубации мономеров прионного

белка совместно с шаперонинами в отсутствие АТР также не происходит заметных изменений указанных параметров (рис. 8). Таким образом, можно сделать вывод, что фаговые шаперонины EL и ОВР 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 этом случае значительно увеличивается интенсивность флуоресценции ThT, что может говорить об образовании амилоидных структур (рис. 8E-F). 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. Это может быть обусловлено эффектом вторичного внутреннего фильтра, вызванного образованием крупных частиц в растворе, так как известно, что характерным свойством фибрилл прионного белка является их слипание при трансформации при $pH > 7$.

Чтобы проверить данное предположение, мы измерили гидродинамический диаметр образуемых агрегатов. Согласно полученным данным, через 4,5 часа с начала инкубации диаметр частиц становится выше 500 нм, в то время как исходные диаметры прионного белка и шаперонинов составляют 7 и 19 нм, соответственно.

Кроме того, образование крупных агрегатов прионного белка при его инкубации с шаперонинами в присутствии АТР, также подтверждается данными трансмиссионной электронной микроскопии. Как видно на электронных микрографиях, прионный белок при участии однокольцевого ОВР в присутствии АТР в течение 4 часов образует короткие фибриллы длиной менее 100 нм (рис. 8А), которые со временем слипаются в крупные кластеры, которые мы наблюдаем на микрографиях через 24 часа инкубации (рис. 8В). Двухкольцевой EL в данном случае ведет себя эффективнее и крупные кластеры мы наблюдаем уже через 4,5 часа с начала инкубации (рис. 8С-Д).

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

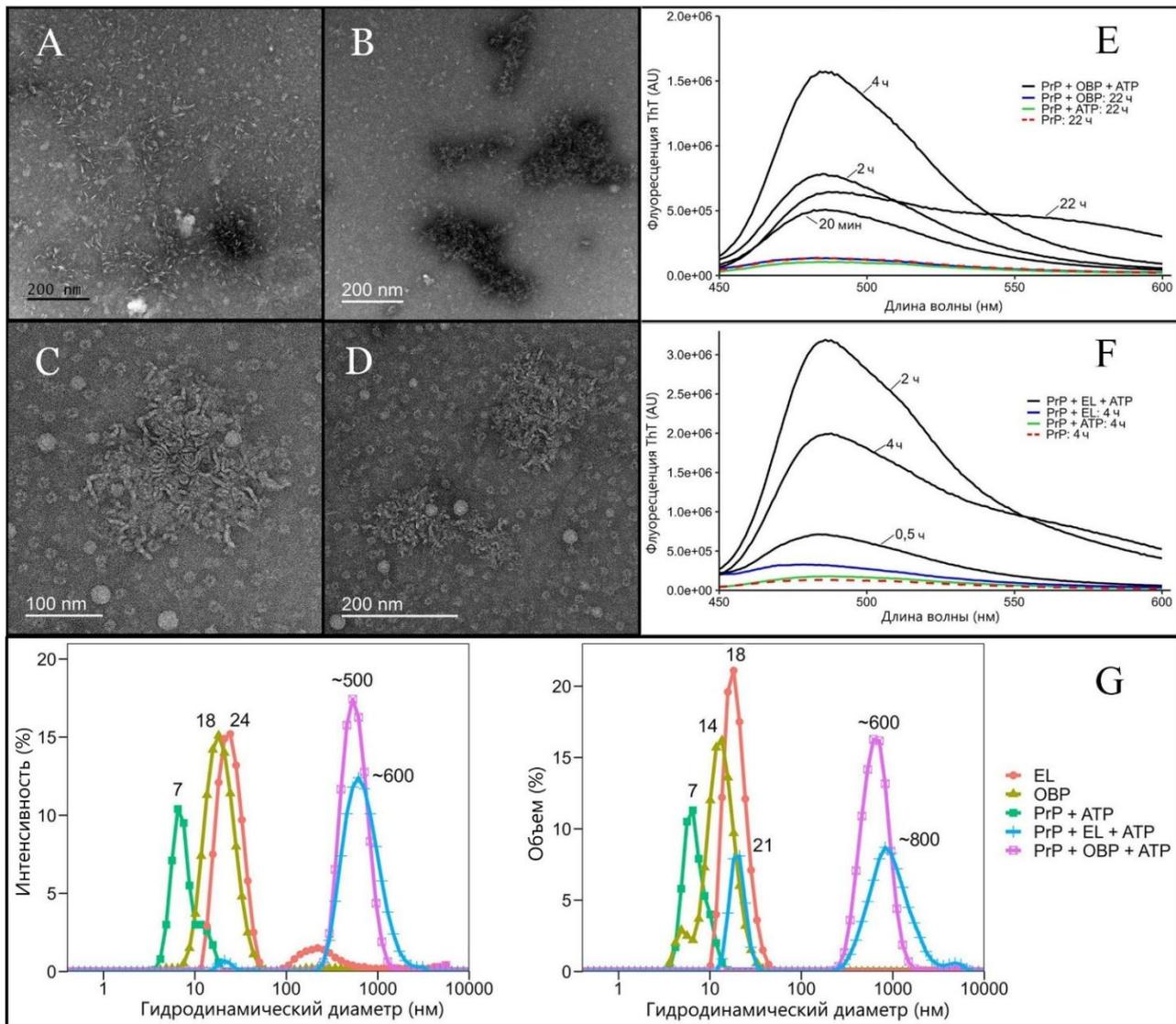


Рисунок 8. Влияние однокольцевого шаперонина ОВР и двухкольцевого EL на амилоидную трансформацию мономеров прионного белка (PrP).

A-D – электронные микрофотографии агрегатов прионного белка, образованных при его совместной инкубации с однокольцевым шаперонином ОВР через 4 ч (A) и 24 ч (B), а также с двухкольцевым шаперонином EL через 4,5 ч (C, D) в присутствии АТР.

E-F – Изменение спектров флуоресценции ThT.

Реакция проводилась в 50 мМ буфере Трис-НСl, рН 7,5, 50 мМ КСl, 10 мМ MgCl₂ при 25°С и орбитальном встряхивании 570 об/мин. Концентрации мономеров прионного белка, каждого шаперонина и АТР составляли 10 мкМ, 1 мкМ и 10 мМ, соответственно. На рисунках E и F показаны только спектры, соответствующие максимальному времени фибриллизации для образцов PrP, PrP+АТР, PrP+ОВР и PrP+EL. Для образцов PrP+ОВР+АТР и PrP+EL+АТР показаны спектры для различных времен (время фибриллизации указано около каждой кривой).

G – Гидродинамический диаметр частиц после 4,5 ч инкубации мономеров прионного белка с однокольцевым шаперонином ОВР и двухкольцевым шаперонином EL в присутствии АТР. Показана зависимость интенсивности и объема образующихся агрегатов от их гидродинамического диаметра в сравнении с исходными мономерами прионного белка и шаперонинами.

Как известно, различные формы прионного белка обладают различной токсичностью. Наиболее токсичной формой являются олигомеры из-за высокой доступности гидрофобных поверхностей в своей структуре. В то же время, фибриллы

имеют всего две такие поверхности на своих концах, поэтому они относительно нетоксичны. В работе была проанализирована цитотоксичность фибрилл прионного белка, образуемых за счет АТР-зависимого действия шаперонина ОВР в течение 4 и 24 часов, на клетках нейробластомы SH-SY5Y. Помимо этого, мы сравнили цитотоксичность таких фибрилл с цитотоксичностью фибрилл, образовавшихся спонтанно при рН 4,0 в течение 48 часов.

Согласно полученным результатам МТТ-теста (рис. 9А), самая низкая токсичность для SH-SY5Y после инкубации их с образцами в течение 24 часов наблюдается для кластеров фибрилл, полученных при помощи ОВР и 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%.

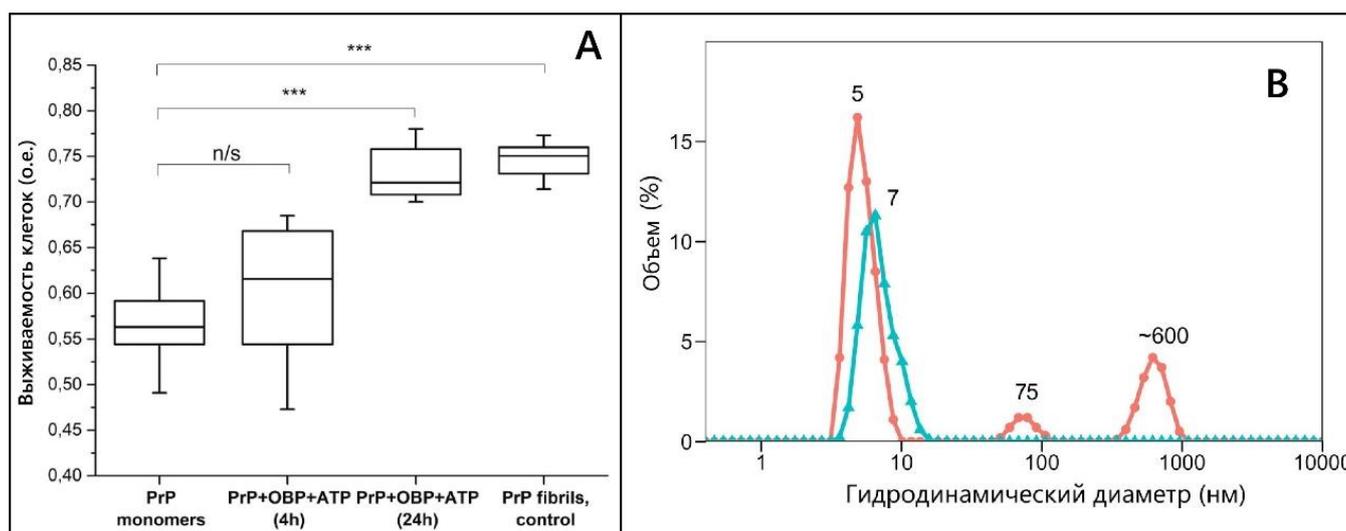


Рисунок 9. Влияние мономеров и агрегатов прионного белка на жизнеспособность клеточной линии SH-SY5Y:

А – МТТ-тест клеток SH-SY5Y после 24-часовой инкубации с формами прионного белка при 37°C.

Клетки подвергались воздействию полной среды 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 ОВР и АТР (*PrP+OVP+ATP*); контрольные фибриллы, образованные путем 48-часовой спонтанной трансформации мономеров прионного белка при рН 4,0 с гуанидингидрохлоридом (*PrP fibrils control*). Статистически значимые различия в жизнеспособности клеток SH-SY5Y обозначены звездочками, «n/s» указывает на незначимую разницу.

В – 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). Показано определение гидродинамического диаметра по распределению по объему образующихся частиц.

В нашей системе наиболее токсичной формой в отношении клеток нейробластомы SH-SY5Y оказались мономеры прионного белка. Однако в экспериментах образцы прионного белка инкубировали с клетками в культуральной среде (рН 7,2) при 37°C в течение 24 ч. Мы предположили, что длительная инкубация при повышенной температуре также может способствовать превращению мономерного прионного белка в более цитотоксичные олигомеры. Чтобы подтвердить это предположение, мы сравнили размер частиц прионного белка, инкубированных в культуральной среде при 37°C в течение 24 ч, с размерами мономеров прионного белка с использованием метода динамического светорассеяния (рис. 9В). Полученные результаты показывают, что при инкубации мономеров прионного белка в культуральной среде при 37°C действительно образуются частицы более крупного размера. Это указывает на то, что большая часть мономеров прионного белка превращается в олигомеры во время инкубации, что и приводит к повышенной токсичности препаратов мономеров прионного белка в нашем случае.

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

Мы также проанализировали, как влияет ОВРΔAD на конверсию прионного белка. Так же, как и в случае с полноразмерным ОВР, реакцию проводили при рН7,5, Т 25°C и постоянной концентрации прионного белка, равной 10 мкМ. Прионный белок инкубировали с ОВРΔAD в молярных соотношениях 1:0,1 и 1:0,2 (прион:ОВРΔAD) как в присутствии, так и в отсутствие АТР.

Из результатов эксперимента следует, что, как и в случае с α-синуклеином, мутантная форма шаперонина действует сходным образом с полноразмерным шаперонином, но с меньшей эффективностью. Так, 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. Затем в процессе инкубации появляется дополнительный пик на 555 нм, что также связано с образованием крупных агрегатов. Анализ микрографий, полученных с помощью трансмиссионной электронной микроскопии, показал, что в присутствии АТР мутантная форма шаперонина ОВРΔAD стимулирует образование амилоидных фибрилл, которые ассоциируют с образованием более крупных агрегатов (рис. 38С).

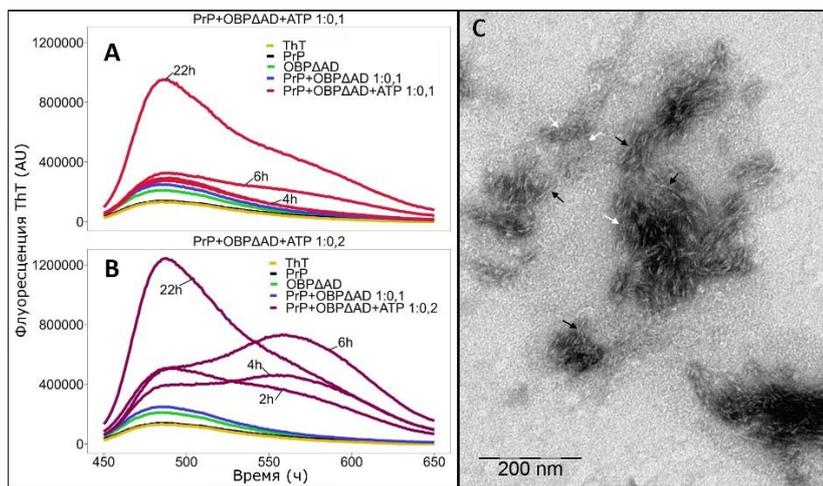


Рисунок 10. Влияние мутантной формы ОВР без апикальных доменов (ОВРΔAD) на фибриллизацию прионного белка: **А-В** – Изменение спектров флуоресценции ThT при инкубации прионного белка совместно с мутантной формой шаперонина ОВРΔAD при различных соотношениях белков. Реакция проводилась в 50 мМ Трис-НСl, рН 7,5, 50 мМ КСl, 10 мМ MgCl₂ при 25°С и орбитальном

встряхивании 570 об/мин. Концентрации мономеров прионного белка и АТФ составляли 10 мкМ и 10 мМ соответственно. Для образцов PrP, ОВРΔAD и PrP+ОВРΔAD показаны только спектры, соответствующие максимальному времени фибриллизации. Для образца PrP+ОВРΔAD+АТФ показаны спектры для различного времени фибриллизации (время фибриллизации указано около каждой кривой)

С – Электронные микрофотографии фибрилл прионного белка, полученных после 5,5-часовой инкубации с ОВРΔAD в присутствии АТФ.

Черные стрелки указывают на фибриллы PrP, белые стрелки указывают на ОВРΔAD.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изменение нормальной структуры таких белков, как α-синуклеин и прионный белок, может привести к их агрегации и дальнейшему развитию нейродегенеративных заболеваний. С образовавшимися агрегатами и мономерами белков, так или иначе, взаимодействует клеточная система шаперонов, к которым, в частности, относятся шаперонины. В то же время, до конца не ясно, как детали архитектуры шаперонинов и их происхождение будут влиять на оказываемый ими эффект.

Показано, что в системах *in vitro* бактериальные и эукариотические шаперонины, а также их мутантные варианты могут связывать разные формы α-синуклеина и тем самым препятствовать их агрегации, что делает перспективной разработку лекарственных препаратов на основе шаперонинов. Однако, как показало наше исследование, фаговые шаперонины ОВР и EL, в зависимости от наличия АТФ по-разному влияют на амилоидную трансформацию α-синуклеина. В частности, в отсутствие АТФ оба шаперонина подавляют фибриллизацию α-синуклеина, а в присутствии АТФ, напротив ее стимулируют. Способность шаперонина ОВР способствовать агрегации α-синуклеина А53Т была также подтверждена на клеточной модели НЕК293Т.

Из литературных данных известно, что некоторые шаперонины бактерий и эукариот способствуют патологии прионного белка. Наше исследование подтверждает,

что вирусные шаперонины, обладающие более простой структурой, также могут оказывать пагубное влияние на трансформацию прионного белка. Так, оба шаперонина способствовали агрегации прионного белка АТР-зависимым образом, причем двухкольцевой EL действовал эффективнее, чем ОВР.

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

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

1. Установлено, что при инкубации *in vitro* α -синуклеина с фаговыми шаперонинами, а именно с двухкольцевым EL или однокольцевым ОВР, в присутствии АТР образуются амилоидные фибриллы α -синуклеина, токсичные для клеток НЕК293Т и SH-SY5Y. В отсутствие АТР оба шаперонина препятствуют образованию амилоидных фибрилл α -синуклеина.

2. Показано, что коэкспрессия генов мутантной формы α -синуклеина А53Т и шаперонина ОВР в клетках НЕК293Т приводит к образованию небольшого количества агрегатов α -синуклеина, что не влияет на жизнеспособность клеток.

3. Показано, что апикальный домен шаперонина ОВР препятствует амилоидной трансформации α -синуклеина А53Т, а лишенный этих доменов шаперонин влияет на агрегацию α -синуклеина так же, как и полноразмерный ОВР.

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

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

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 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

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

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

АТФ	Аденозинтрифосфат
ОВРΔAD	Мутантная форма шаперонина ОВР, без апикальных доменов
ТhТ	Тиофлавин Т
Трис	трис(гидроксиметил)аминометан
GroEL	бактериальный шаперонин, выделенный из клеток <i>E.coli</i>
GroE	система из шаперонина GroEL и его кошаперонина GroES
ОВР	шаперонин фага ОВР, кодируемый геном 246
EL	шаперонин фага EL, кодируемый геном 146