

(ОЗНАКОМИТЕЛЬНЫЙ ФРАГМЕНТ)

На правах рукописи

АЛЕКСАНДРОВ ИЛЬЯ МИХАЙЛОВИЧ

**ИССЛЕДОВАНИЕ ПОЛИМЕРИЗАЦИИ
ПРИОННЫХ БЕЛКОВ ДРОЖЖЕЙ *IN VIVO* МЕТОДОМ
ПОЛУДЕНАТУРИРУЮЩЕГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА**

03.00.03 – молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук**

МОСКВА

2006

Работа выполнена в лаборатории молекулярной генетики Института экспериментальной кардиологии Федерального Государственного учреждения «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию, г. Москва.

Научный руководитель:

Кандидат биологических наук, в.н.с. **В. В. Кушниров**

Официальные оппоненты:

доктор химических наук, профессор, член корреспондент РАН **О. А. Донцова**
кандидат биологических наук **А. А. Белогуров**

Ведущая организация: ФГУП ГосНИИ Генетика

Защита состоится «26» октября 2006 года в 11 часов на заседании диссертационного совета К 208.073.02 в ФГУ РКНПК Росздрава по адресу: 121552, Москва, 3-я Черепковская улица, 15 А.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке Института экспериментальной кардиологии ФГУ РКНПК Росздрава.

Автореферат разослан «25» сентября 2006 года.

Учёный секретарь диссертационного совета, кандидат биологических наук



Венгерова Т.И.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Прионы – это инфекционные агенты белковой природы, вызывающие неизлечимые нейродегенеративные заболевания человека и животных, такие как болезнь Крейтцфельда-Якоба, синдром Герстмана-Штраусслера-Шейнкера, скрэпи овец и губчатая энцефалопатия крупного рогатого скота, также известная как коровье бешенство. Эти заболевания сопровождаются морфологическими изменениями тканей мозга и появлением в них амилоидоподобных структур, содержащих фибриллярные нерастворимые белковые агрегаты, которые и представляют собой инфекционное начало. Это придает им сходство с, так называемыми, амилоидными нейродегенеративными заболеваниями (болезнь Хантингтона, Альцгеймера, Паркинсона и т.д.), при которых также происходит образование подобных структур. Необходимо добавить, что все заболевания такого рода на данный момент неизлечимы и являются смертельными для человека.

Обнаружение прионных белков у низших эукариот существенным образом расширило представление о феномене прионов. Стало ясно, что это не просто принципиально новое, но и достаточно общее явление, встречающееся у различных организмов. Изучение дрожжевых прионов дало дополнительную информацию о явлении в целом, а также подтвердили принципиальное сходство прионов с амилоидными фибриллами. В настоящее время прионно-амилоидный феномен интенсивно изучается во многих лабораториях, возрастает список болезней, для которых подтверждена амилоидная природа.

У дрожжей и грибов существование белков с прионными свойствами, по всей видимости, имеет адаптивное значение. Обнаруживаются новые прионоподобные и амилоидные белки млекопитающих, участвующих в различных биологических процессах. Весьма вероятно, что подобные белки распространены еще более широко, чем известно сейчас.

Прионы дрожжей явились весьма удобной модельной системой для изучения явления прионов в целом. Они имеют неоспоримые преимущества перед животными системами по скорости постановки экспериментов, доступности и безопасности для исследователей. Можно надеяться, что результаты, полученные в дрожжевой системе, будут использованы в дальнейшем для исследования прионных свойств патогенных белков, вызывающих прионные или амилоидные заболевания человека и животных, а также прионоподобных белков, имеющих значение для жизнедеятельности клетки.

Центральным моментом в исследовании поддержания прионного состояния белков в клетке является понимание динамики их полимеризации и разборки прионных фибрилл. Однако, представления о механизмах полимеризации, фрагментации, структуре фибрилл и т.д. до сих пор не сформировано. Таким образом, весьма актуальной представляется попытка найти новые подходы к исследованию структурной организации прионных и приноподобных агрегатов. Новая информация в этой области весьма важна для понимания связи структуры фибрилл с динамикой их полимеризации/разборки и роли различных факторов в регуляции этих процессов.

Цели и задачи работы. Целью настоящей работы являлось исследование полимеризации различных прионных белков. Для достижения этой цели были поставлены следующая задача:

Разработать метод определения размера прионных полимеров и использовать его для:

1. Анализа структурной организации прионных агрегатов белка Sup35 дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*.
2. Изучения зависимости параметров полимеризации прионов от уровня шаперона Hsp104.
3. Изучения полимеризации белков, содержащих полиглутаминовые области.
4. Исследования влияния на полимеризацию белков остатков тирозина в их полиглутаминовых областях.

Научная новизна и практическая значимость работы. В результате данной работы были разработаны способы выявления прионных и амилоидных белков дрожжей и млекопитающих и методы анализа их размеров. Методы позволили обнаружить новую структурную единицу прионного макроагрегата белка Sup35 – прионный полимер, размером 10 – 50 мономеров. Показано, что подобные полимеры могут менять свой размер в зависимости от различных физиологических условий. Исследовано влияние шаперона Hsp104 на размер полимеров Sup35. Показано, что дестабилизация наследования приона в результате изменения уровня Hsp104 сопровождаются изменением размера прионных полимеров. С помощью новой методики белкового электрофореза в агарозном геле впервые исследована динамика агрегации белков, содержащих искусственные полиглутаминовые домены polyQ70, polyQ85 и polyQ61Y15. Показано, что наличие тирозиновых остатков сильно повышает узнавание и фрагментацию прионных полимеров полиглутаминовых белков шапероном Hsp104. Обнаружено, что белки Rnq1, Sup35 *P. methanolicus*, Pub1, а также белки, содержащие

полилутаминовые фрагменты, способны образовывать в клетках дрожжей прионоподобные полимеры. Данный метод можно использовать для исследования прионных и амилоидных белков разных организмов, а также для быстрого выявления прионоподобного состояния белков-кандидатов. На сегодняшний день данный метод и используется во многих лабораториях мира, занимающихся прионной и амилоидной тематикой.

Апробация работы. Результаты работы были представлены на межлабораторном семинаре Института экспериментальной кардиологии ФГУ РКНПК Росздрава (2006); Третьем съезде биохимического общества, Санкт-Петербург, Россия, июнь 2002; III съезде ВОГиС 6-12 июня 2004, Москва; 8-ой Международной Пуцинской школе-конференции молодых ученых 17-21 мая 2004г., Пуццино; 2nd International Yeast Prion Meeting, Calistoga, CA, USA. 25-28 Aug. 2002; XXIst International Conference on Yeast Genetics and Molecular Biology, Gothenburg, Sweden, July 2003; FFBS International Summer School on "Molecular Mechanisms in Homeostasis and Disease", Spetses, Greece, Sept 2003; EURESCO Conference "Biology of Molecular Chaperones. Mechanisms and regulation of chaperones" Tomar, Portugal, Aug 2003; 14th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Prague, Czech Republic, 1-4 May 2004; HHMI Meeting of International Research Scholars, Merida, Mexico, June 22 – 25, 2005; Prion Biology – Joint Cold Spring Harbor Laboratory/ Wellcome Trust Conference, Hinxton, UK, September 7 - 11, 2005

Публикации. По материалам диссертации опубликованы 4 статьи и 10 тезисных сообщений, 1 статья находится в печати.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из разделов: «Введение», «Обзор литературы», «Результаты», «Обсуждение», «Материалы и методы», «Выводы» и «Список литературы». Работа изложена на 121 странице и включает 16 рисунков и список литературы, содержащий 163 ссылки.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Штаммы *S. cerevisiae*, *E. coli* и культура клеток человека. В работе использовали штаммы дрожжей: 5V-H19 (MATa *ade2-1 SUP5 can1-100 leu2-3,112 ura3-52 [PSI⁺]* или [*psi*]) (Dagkesamanskaya and Ter-Avanesyan 1991); 74-D694 (MATa *ura3-52 leu2-3,112 trp1-289 his3-Δ200 ade1-14*) (Chernoff et. al., 1995) [делеции генов *SUP35*, *RNQ1* и *HSP104* в этом штамме получены в данной работе]; BY4742 (MATa *his3 Δ leu2 Δ lys2 Δ ura3 Δ trp1*)

(Meriin *et al.*, 2003). В работе использовали стандартные методы генетики дрожжей (Sherman *et al.*, 1986). Трансформацию дрожжей *S. cerevisiae* проводили согласно опубликованным протоколам (Gietz *et al.*, 1995). Трансформацию *E. coli* DH5 α (Sambrook *et al.*, 1989) осуществляли в соответствие с методом Inoue *et al.* (1990). В работе использовали человеческую эмбриональную почечную культуру клеток – HEK293. Конструирование плазмид осуществляли согласно методам, описанным ранее (Sambrook *et al.*, 1989). Электрофорез белков в полиакриламидном геле проводили по методике, описанной Лэммли (Laemmli, 1970). Для электрофоретического разделения прионных полимеров использовали разработанный в данной работе метод SDD-AGE (semi-denaturing detergent agarose gel electrophoresis) (Kryndushkin *et al.*, 2003). Для анализа белков методом иммуноблоттинга проводили их электрический перенос на нитроцеллюлозную мембрану или вакуумный перенос на мембрану PVDF для метода SDD-AGE.

Для выявления детерминанта [PSI^+] использована генетическая система, основанная на супрессии мутации *ade2-1* и *ade1-14*. Эта система позволяет определять наличие детерминанта [PSI^+] визуально по фенотипу колоний. Колонии клеток, не содержащих детерминант [PSI^+], то есть [psi^-], имеют красный цвет и не растут на среде без аденина. Колонии клеток [PSI^+] имеют розовый или белый цвет в зависимости от варианта [PSI^+] и растут при отсутствии аденина в среде.

Для изгнания детерминанта [PSI^+] клетки выращивали на среде, содержащей 3мМ гидрохлорида гуанидина (Tuite *et al.*, 1981).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ структурных свойств прионных агрегатов белка Sup35. Обнаружение того, что белок Sup35 образует *in vitro* фибриллы амилоидного типа (Glover *et al.*, 1997) позволило предположить, что прионные агрегаты в клетках дрожжей состоят из аналогичных фибрилл. До начала нашей работы вся информация о структуре фибрилл Sup35 была получена для фибрилл, образованных *in vitro*. Взаимосвязь прионных агрегатов, обнаруживаемых в клетках дрожжей, и амилоидных фибрилл, образованных *in vitro*, продемонстрирована не была. Для анализа прионных частиц в клетках дрожжей в основном использовались два метода: ультрацентрифугирование в градиенте сахарозы и анализ химерных прионных белков, сшитых с зеленым флуоресцирующим белком (GFP). Оба метода позволяют определять только наличие прионных агрегатов в клетке.

Единственным белком, помимо Sup35, необходимым для поддержания состояния [PSI^+] является шаперон Hsp104 (Chernoff *et al.*, 1995). Ранее в нашей лаборатории была

предложена модель, согласно которой Prp104 осуществляет фрагментацию прионных фибрилл, что является необходимым, как для их дальнейшего роста, так и для передачи в дочерние клетки. Исходя из этой гипотезы, мы предположили, что дрожжевые прионные агрегаты состоят из фрагментируемых фибрилл амилоидного типа, подобных фибриллам Sup35, наблюдаемым *in vitro*.

В задачу настоящего исследования входила проверка данной модели и ее уточнение, для чего потребовалась разработка принципиально нового метода.

Первой задачей, которую требовалось решить, было нахождение условий, которые могли бы разрушить связи между прионными агрегатами и другими белками, но не затрагивали внутри-прионные взаимодействия. Для этого нами были опробованы различные агенты, такие как мочевины, высокая концентрация соли (KCl), гуанидин гидрохлорид и различные ионные и неионные детергенты в частности N-лаурил саркозил, додецил сульфат натрия (SDS). Лучшие результаты по очистке прионных агрегатов были достигнуты при обработке SDS при комнатной температуре. Для анализа размера прионных частиц мы использовали электрофорез как наиболее точный и технологичный подход к такому анализу. Полиакриламидные гели оказались непригодными для данного анализа в виду большого размера прионных частиц, поэтому в качестве форетической среды был использован агарозный гель. Использование SDS оказалось не только необходимым, но и удобным обстоятельством, поскольку SDS, связываясь с белковыми частицами, придает им электрофоретическую подвижность приблизительно пропорциональную массе частиц. SDS также обеспечивает разборку подавляющего большинства макромолекулярных комплексов и, таким образом обеспечивает «очистку» прионных агрегатов от связанных с ними белков. При этом прионные агрегаты устойчивы к SDS, то есть не распадаются на мономеры. Этот метод был назван «Полуденатурирующим электрофорезом в агарозном геле» (SDD AGE; «Semi-Denaturing Detergent Agarose Gel Electrophoresis»). Таким образом, прионные агрегаты в лизатах клеток дрожжей устойчивы к обработке SDS, что подтверждает их сходство с амилоидами, образованными *in vitro*.

Стандартный эксперимент проводили следующим образом: клетки выращивали в жидкой среде до логарифмической фазы и готовили лизат. Перед электрофорезом добавляли буфер для образцов, содержащий 2% SDS, используемый для ПААГ электрофореза, инкубировали 10 мин. при 37°C и наносили на горизонтальный 1,8% агарозный гель. После электрофореза проводили блоттинг и иммуноокрашивание антителами к исследуемому белку. В результате были обнаружены прионные агрегаты в виде широкой полосы, с достаточно четкими границами сверху и снизу (Рис. 1).

полимера *de novo*, определяют характеристики прионного процесса и дают возможность создавать весьма различные по поведению прионы.

ВЫВОДЫ

1. Показано, что прионные полимеры белка Sup35 отличаются от прочих клеточных макромолекулярных комплексов нерастворимостью в SDS при 37°C, что характерно для амилоидных фибрилл Sup35, образующихся *in vitro*.
2. Разработан метод полуденатурирующего электрофореза в агарозном геле для определения размера прионных полимеров.
3. Показано, что прионные агрегаты Sup35 представляют собой комплексы, состоящие из прионных полимеров. Полимеры гетерогенны по размеру и содержат от 10 до 50 мономеров Sup35.
4. Гидрохлорид гуанидина полностью блокирует фрагментацию прионных полимеров Sup35 в клетках дрожжей. Подтверждено предположение о фрагментации прионных полимеров папероном Hsp104.
5. Обнаружено, что химерные белки Q70-Sup35MC, Q85-Sup35MC и QY76-Sup35MC способны к полимеризации *in vivo*. Внедрение остатков тирозина в полиглютаминовые домены улучшает фрагментацию образуемых ими полимеров.
6. Метод полуденатурирующего электрофореза может быть использован для выявления амилоидного состояния разнообразных белков. Способность образовывать полимеры амилоидного типа *in vivo* показана для дрожжевых белков Rnq1 и Pub1, химерного Sup35, содержащего N-концевой домен Sup35 *Pichia methanolica*, а также для химерного белка, содержащего полиглютаминовую последовательность хаптинтина человека.

Список опубликованных работ.

1. D.S. Kryndushkin, I.M. Alexandrov, M.D. Ter-Avanesyan and V.V. Kushnirov "Yeast [PSI+] Prion Aggregates Are Formed by Small Sup35 Polymers Fragmented by Hsp104" *J Biol Chem* 2003 Dec 5; 278(49): 49636-43.
2. Д.С. Крындушкин, И.М. Александров, В.В. Кушниров и М.Д. Тер-Аванесян "Дрожжи как модель для изучения молекулярных основ прионных и амилоидных заболеваний" *Российский Физиологический Журнал им. И.М. Сеченова* 2004 май; 90(5):645-57.
3. Vitaly V. Kushnirov, Ilya M. Alexandrov, Olga V. Mitkevich, Irina S. Shkundina and Michael D. Ter-Avanesyan «Purification and analysis of prion and amyloid aggregates» *Methods* 2006 May;39(1):50-5.

4. M.D. Ter-Avanesyan, A.B. Vishnevskaya, I.M. Alexandrov and V.V. Kushnirov. «Prion and non-prion amyloids: a comparison inspired by the yeast Sup35 protein» (принято к публикации для книги In: Protein-Based Inheritance, Y.O. Chernoff ed. Landes Bioscience)
5. Крындушкин Д.С., Александров И.М., Тер-Аванесян М.Д., Кушниров В.В. “Новый метод анализа структуры прионных агрегатов у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*” Третий съезд биохимического общества, Санкт-Петербург, Россия, июнь 2002, Санкт-Петербург, Тезисы научных докладов, стр. 496.
6. А.Б. Сальникова, Д.С. Крындушкин, И.М. Александров, В.В. Кушниров, М.Д. Тер-Аванесян "Нестандартные прионные состояния белка Sup35 дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*" III съезд ВОГиС 6-12 июня 2004, Москва. Сборник трудов, Том 2, стр.343
7. А.Б. Сальникова, Д.С. Крындушкин, И.М. Александров, В.В. Кушниров, М.Д. Тер-Аванесян "Разнообразие амилоидоподобных состояний белка Sup35 дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*" 8-ая Международная Пушкинская школа-конференция молодых ученых 17-21 мая 2004г., Пушкино. Сборник тезисов, стр. 31
8. V.V. Kushnirov, D.S. Kryndushkin, I.M. Alexandrov and M.D. Ter-Avanesyan. 2nd International Yeast Prion Meeting. Calistoga, CA, USA. 25-28 Aug. 2002.
9. Two-level structure of the [*PSI*⁺] prion particles D.S. Kryndushkin, I.M. Alexandrov, V.V. Kushnirov and M.D. Ter-Avanesyan XXIst International Conference on Yeast Genetics and Molecular Biology, Gothenburg, Sweden, July 2003, Vol.20, No.S1, p.S390.
10. D.S. Kryndushkin, I.M. Alexandrov, V.V. Kushnirov and M.D. Ter-Avanesyan “Two-level structure of the [*PSI*⁺] prion particles” FEBS International Summer School on "Molecular Mechanisms in Homeostasis and Disease", Spetses, Greece, Sept 2003.
11. M. Ter-Avanesyan, V. Kushnirov, D. Kryndushkin and I. Alexandrov “Structural organization of yeast prion protein and the role of hsp104 chaperone in its propagation” EURESCO Conference "Biology of Molecular Chaperones. Mechanisms and regulation of chaperones" Tomar, Portugal, Aug 2003.
12. D. Kryndushkin, I. Alexandrov, V. Kushnirov and M. Ter-Avanesyan, “Purification and analysis of the structure of prion aggregates from yeast *Saccharomyces cerevisiae*” 14th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Prague, Czech Republic, 1-4 May 2004, vol. 10, suppl. 3, P1251.
13. Salnikova A., Shkundina I., Alexandrov I., Kushnirov V., Ter-Avanesyan M., HHMI Meeting of International Research Scholars, Merida, Mexico, June 22 – 25, 2005. Heritable and Nonheritable Amyloids in Yeast Are Distinguished by Susceptibility to Fragmentation. Book of abstracts, p. 80.

14. Shkundina I., Salmikova A., Alexandrov I., Kushnirov V., Tuite M. and Ter-Avanesyan M., Prion Biology – Joint Cold Spring Harbor Laboratory/ Wellcome Trust Conference, Hinxton, UK, September 7 - 11, 2005. Propagation and variability of the yeast Sup35 prion. Book of abstracts, p. 5.

Список сокращений.

ПААГ – Полиакриламидный гель

кДа – Килодальтон

GFP – Зеленый флуоресцирующий белок

GuHCl – Гидрохлорид гуанидина

polyQ – полиглутаминовые белки

polyQY – полиглутаминовые белки, перемежающиеся с остатками тирозина

SDS – Додецил сульфат натрия

SDD AGE (SDD) – Полуденатурирующий SDS электрофорез в агарозном геле

SDS-PAGE – SDS электрофорез в полиакриламидном геле

TAE – Буфер трис-ацетат ЭДТА

TBS – Трис буфер с солью