

СЕРПИОНОВ ГЕНРИХ ВЛАДИМИРОВИЧ

**РОЛЬ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ МЕЖДУ АМИЛОИДОГЕННЫМИ БЕЛКАМИ В
ВОЗНИКНОВЕНИИ И ТОКСИЧНОСТИ АМИЛОИДОВ ГЕНТИНГИНА ЧЕЛОВЕКА У
ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE***

03.01.04 Биохимия

Автореферат диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель:

кандидат биологических наук
Александров А. И.

Москва 2019

Работа выполнена в лаборатории молекулярной генетики Института биохимии им. А.Н. Баха Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук».

Научный руководитель:

кандидат биологических наук
Александров Александр Иванович

Официальные оппоненты:

Каменский Петр Андреевич, доктор биологических наук, Биологический факультет Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова», профессор кафедры молекулярной биологии

Радько Сергей Павлович, кандидат биологических наук, отдел протеомных исследований и масс-спектрометрии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В. Н. Ореховича», ведущий научный сотрудник, руководитель группы транскриптомного анализа

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта Российской академии наук (ИМБ РАН).

Защита состоится «___» _____ 201 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 002.247.01 по защите диссертаций на соискание ученой степени доктора наук, на соискание ученой степени кандидата наук на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» по адресу: 119071, Москва, Ленинский проспект, д. 33, строение 2.

С диссертацией можно ознакомиться в Библиотеке биологической литературы Российской академии наук по адресу: 119071, Москва, Ленинский проспект, д. 33, строение 1 и на сайте <http://fbras.ru/>

Автореферат разослан «___» _____ 201 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
кандидат биологических наук

А.Ф. Орловский

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. В данной диссертационной работе рассмотрены патологические процессы, связанные с образованием амилоидов некоторыми клеточными и рекомбинантными глутамин-богатыми белками, в норме существующими в растворимой форме и имеющими неструктурированные домены.

Амилоиды – агрегаты с регулярной структурой, образованной за счет возникновения межмолекулярных β -слоев. Они обладают повышенной устойчивостью к физическим и химическим воздействиям. Амилоиды устойчивы к протеолизу, поэтому могут накапливаться внутри и вне клеток, что может приводить к развитию заболеваний, называемых амилоидозами.

Амилоидозы широко распространены и вероятность их возникновения увеличивается с возрастом. Эти болезни поражают различные типы тканей и в настоящее время являются неизлечимыми. К ним относятся болезни Альцгеймера, Паркинсона, Гентингтона, Крейцфельда-Якоба, куру, амиотрофический латеральный склероз и другие.

Амилоиды могут быть образованы самыми разнообразными, структурно различающимися белками, однако целый класс амилоидных заболеваний связан с агрегацией белков с полиглутаминовыми доменами. Среди этих заболеваний наиболее изучена болезнь Гентингтона – нейродегенеративное заболевание, которое сопровождается агрегацией белка гентингтина. Гентингтин содержит полиглутаминовый участок, длина которого может варьировать. При этом, чем длиннее этот участок, тем раньше начинается болезнь и тем тяжелее она протекает.

Для изучения молекулярных основ болезни Гентингтона используют целый ряд модельных организмов, в том числе дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*.

Дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* являются удобным организмом для изучения амилоидозов, поскольку клетки дрожжей быстро делятся, просты для культивирования и удобны для молекулярно-генетических манипуляций. Кроме того, ряд амилоидогенных белков дрожжей имеет неструктурированные домены, обогащенные аспарагином и глутамином, напоминающие глутамин-богатые амилоидообразующие домены некоторых патологических амилоидогенных белков млекопитающих.

В работах по моделированию болезни Гентингтона в дрожжевых клетках, продуцирующих белковый продукт первого экзона гена гентингтина, показано, что токсический эффект этого белка также, как и в клетках млекопитающих, зависит от длины его глутаминового домена. Данный участок у мутантного гентингтина содержит 103 остатка глутамина (Htt103Q), при этом мутантный белок агрегирует и вызывает цитотоксический эффект, тогда как гентингтин дикого типа, содержащий 25 остатков глутамина (Htt25Q), в норме не агрегирует и не токсичен для клеток дрожжей.

Образование амилоидов является первопричиной патологии при амилоидозах, но механизмы развития патологии могут различаться. Переход белков в амилоидную форму обычно нарушает их функцию. Кроме того, различные функциональные белки клетки могут включаться в эти амилоидные агрегаты, приобретая амилоидную конформацию и внося вклад в цитотоксический эффект.

Как правило, при болезни Гентингтона одна из аллелей гентингтина не является мутантной. В настоящее время нет ясных представлений о том, какую роль в патогенезе болезни Гентингтона играет эта аллель. Имеются данные о том, что немутантный гентингтин может включаться в агрегаты мутантного гентингтина (Busch *et al.*, J. Biol. Chem., 2003), однако какой вклад в токсический эффект вносит эта агрегация - неизвестно. Неизвестно также, может ли нормальный гентингтин агрегировать и вызывать токсичность в отсутствие агрегатов

мутантного гентингина, но в присутствии других амилоидов. Помимо “внутренних” взаимодействий между разными вариантами белковых продуктов одного гена, можно предположить, что существуют взаимодействия между белками, агрегация которых сопряжена с разными амилоидными заболеваниями. Возможность такого рода физических взаимодействий между белками уже показана, однако роль таких взаимодействий в токсичности тех или иных амилоидов не ясна.

В данной диссертационной работе мы попытались изучить некоторые неясные аспекты в механизмах токсичности, которая возникает вследствие агрегации полиглутаминовых и глутамин-богатых белков; установить принципиальную возможность наличия сложных схем взаимодействия между амилоидогенными белками, которые приводили бы к передаче амилоидной конформации от одних белков другим; установить роль немутантных аллелей в патогенезе наследственных нейродегенеративных амилоидозов на примере болезни Гентингтона.

С учетом всего вышеизложенного целями данной работы стали изучение способности нормального гентингина человека - белка 25Q-GFP к переходу в амилоидное состояние и его токсичности для клеток дрожжей, а также сравнение механизмов токсичности мутантного гентингина человека, белка 103Q у двух разных штаммов дрожжей BY4742 и 74D-694. Для достижения этих целей были поставлены следующие задачи:

1. Выяснить, будет ли сверхпродукция белка Htt25Q-GFP в присутствии амилоидов других белков токсична для клеток дрожжей. Выявить амилоидогенные белки, которые при совместной продукции с белком 25Q-GFP ингибируют рост клеток дрожжей.
2. Установить, может ли белок Htt25Q-GFP переходить в амилоидное состояние в присутствии амилоидов других белков.
3. Изучить механизм токсического эффекта, связанного с продукцией белка 25Q-GFP.
4. Выяснить, связан ли механизм токсического эффекта мутантного гентингина человека 103Q в штамме BY4742 с уменьшением количества растворимых белков Sup35 и Sup45.
5. Изучить влияние делеции гена *DEF1* на токсичность 103Q в штамме 74D-694.

Научная новизна и практическая значимость. В данной диссертационной работе впервые показано, что белок Htt25Q-GFP может быть токсичен для дрожжевых клеток как в агрегированной, так и в растворимой форме. Был выяснен механизм, лежащий в основе токсичности, связанной с агрегацией белка Htt25Q-GFP. Показано, что ключевую роль в токсичности Htt25Q-GFP играет уменьшение количества растворимой формы жизненно важного белка Sup35 в результате его полимеризации, а также снижение уровня белка Sup45 в результате его включения в амилоидные агрегаты, образованные белком Sup35. Также впервые обнаружен “эффект посредника” в передаче амилоидной конформации от одних амилоидов другим. Показан эффект асимметрии в передаче амилоидной конформации. Продemonстрировано, что в основе токсичности мутантного гентингина могут лежать механизмы, различающиеся для разных дрожжевых штаммов.

Результаты, полученные в данной диссертационной работе, могут быть использованы для более детального понимания механизмов патогенеза полиглутаминовых заболеваний, что может способствовать разработке более совершенных методов диагностики этих заболеваний, а также выявлению новых факторов, влияющих на развитие этих заболеваний.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту:

1. Непатогенная форма гентингина человека (белок-Htt25Q-GFP) в присутствии амилоидов других белков может образовывать амилоидные полимеры в клетках дрожжей и вызывать токсичность.
2. Токсичность амилоидных полимеров белка Htt25Q-GFP для клеток дрожжей в штамме 74D-694 связана с инактивацией жизненно-важных факторов терминации трансляции Sup35 и Sup45.
3. Амилоиды белка Htt25Q-GFP являются посредником в передаче амилоидной конформации.
4. Амилоиды белка Htt25Q-GFP индуцируют переход белка Sup35 в амилоидное состояние, однако прионные амилоиды белка Sup35 не индуцируют амилоидную полимеризацию белка Htt25Q-GFP (эффект асимметрии амилоидной полимеризации).
5. Токсический эффект мутантного гентингина человека Htt103Q в штамме BY4742, в отличие от штамма 74-D694, не связан с уменьшением количества растворимых белков Sup35 и Sup45.
6. Делеция гена *DEF1* в штамме 74-D694, в отличие от штамма BY4742, не снимает токсический эффект, связанный со сверхпродукцией белка Htt103Q. Делеция гена *DEF1* ингибирует рост клеток дрожжей штамма 74-D694, но не BY4742.

Личный вклад диссертанта. Диссертантом выполнена вся экспериментальная часть диссертационной работы, а также анализ и подготовка данных для публикации в научных журналах.

Методы исследования. В диссертации использованы классические биохимические методы работы с белками, микробиологические методы работы с бактериальными и дрожжевыми клетками, молекулярно-генетические методы, а также метод флуоресцентной корреляционной спектроскопии.

Степень достоверности и апробация работы. Для решения поставленных задач использовались различные биохимические, микробиологические и молекулярно генетические методы. Материалы, изложенные в диссертации, опубликованы в зарубежных рецензируемых журналах: Plos One, Scientific Reports, Prion, FEMS Yeast Research. Основные результаты работы представлены на следующих отечественных и международных конференциях: Конференции “Ломоносов” (Москва, Россия, 2013), Съезде Федерации Европейских Биохимических сообществ FEBS (Санкт-Петербург, Россия, 2013), Международной конференции по молекулярной биологии и генетике дрожжей (Франкфурт, Германия, 2013), Международной конференции, посвященной прионам и амилоидам (Форт Коллинс, США, 2015).

Связь с государственными программами. Работа выполнена при поддержке Российского Фонда Фундаментальных исследований (РФФИ) (номера проектов: 14-04-00073 и 12-04-32080), а также Российского Научного Фонда (РНФ) (14-14-00361). Работа поддержана премиальной стипендией имени В. Л. Кретовича.

Публикации. По материалам диссертационной работы опубликовано 4 статьи в международных рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ, и 4 тезиса в материалах отечественных и международных конференций.

Объем и структура диссертации. Диссертация состоит из 143 страниц, содержит 37 рисунков и 4 таблицы. Диссертация содержит следующие разделы: “Введение”, “Обзор литературы”,

“Материалы и методы”, “Результаты”, “Обсуждение”, “Заключение”, “Список литературы”. В список литературы включено 213 источников.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Индукция синтеза рекомбинантных белков

Для индукции синтеза белков Htt25Q-/103Q-GFP, Htt25Q-/103Q-RFP, гены которых находились под контролем промотора, репрессируемого в присутствии глюкозы и активируемого в присутствии галактозы, использовались жидкие или твердые синтетические среды (YNB: 0.67% Yeast Nitrogen Base, 2% глюкозы), в которых в качестве источника углерода использовали 2% раффинозу и 2% галактозу вместо глюкозы. Процедура подготовки клеток: трансформанты, несущие соответствующие плазмиды выращивали до середины логарифмической фазы роста в среде с глюкозой, затем переносили на несколько часов в селективную среду, содержащую раффинозу в качестве источника углерода, что приводило к дерепрессии галактозного промотора. После этого клетки переносили в селективную среду, содержащую галактозу в качестве единственного источника углерода и инкубировали в течение 10 часов.

Для индукции синтеза белков Htt25Q-/103Q-GFP, Htt25Q-/103Q-RFP на твердой среде, клеточные суспензии выращивали в жидкой среде с глюкозой, переносили на 3 часа в среду с раффинозой, а затем переносили на твердую среду, содержащую 2% галактозу.

SDD-AGE-Анализ

Для электрофоретического разделения амилоидных полимеров применяли агарозный электрофорез в полуденатурирующих условиях (SDD-AGE). Для данного метода использовали горизонтальные 2% агарозные гели, приготовленные на буфере TAE (Tris-Acetate-EDTA) с 0,1% SDS. Данный метод основан на том, что в присутствии SDS белковые агрегаты распадаются на отдельные фибриллы, которые можно разделять в агарозном геле. Такое неклассическое применение агарозного геля связано с тем, что в таком геле размер пор больше, чем в акриламидном, и это позволяет амилоидным полимерам, насыщенным ДСН, мигрировать через гель под действием разности потенциалов.

Приготовленные образцы (осветленные клеточные лизаты) смешивали с буфером для нанесения образцов (0,5 кратный TAE, 2% SDS, 5% глицерол и 0,05% бромфеноловый синий) и наносили на агарозный электрофорез. Амилоидные полимеры отличаются по размеру, поэтому мигрируют в геле с различной скоростью, растягиваясь в геле в сплошную длинную полосу, в то время как мономерная фракция бежит одним пятном наравне с фронтом.

После электрофоретического разделения белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану и детектировали при помощи иммуноблотинга. Перенос белков после агарозного электрофореза осуществляли при помощи вакуумной установки Vacugene XL (Pharmacia) в течение 5 часов. Для переноса использовали буфер TBS (25 mM Трис, 150 mM NaCl, 2 mM KCl, pH 7,4).

Основные результаты работы и обсуждение

1. Продукция некоторых искусственных глутамин-богатых белков вместе с белком Htt25Q-GFP токсична для клеток дрожжей *S. cerevisiae*

Белковый продукт первого экзона гена гентингина (IT15) с удлиненным полиглутаминовым трактом, состоящий из FLAG-эпитопа, первых 17 аминокислот первого экзона гена IT15 и полиглутаминовой последовательности длиной 103 аминокислотных остатка (Htt103Q), соединенной с зеленым флуоресцирующим белком (GFP) часто используется для моделирования болезни Гентингтона в дрожжах *S. cerevisiae*, так как продукция склонного к агрегации белка Htt103Q сильно замедляет рост клеток дрожжей, тем самым проявляя токсический эффект. Для проявления сильного цитотоксического эффекта необходимы высокие уровни продукции данного белка в клетке, поэтому экспрессия Htt103Q находится под контролем сильного галактозного промотора (GAL1). Наличие GFP позволяет использовать микроскопические методы для наблюдения за агрегатами Htt103Q-GFP. Важно, что похожий белок, но содержащий 25 остатков глутамина, Htt25Q-GFP, не образует амилоидных агрегатов и не вызывает токсического эффекта, поэтому обычно используется в качестве контроля (Meriin *et al.*, Mol. Cell. Biol., 2003). В данной работе эти результаты были воспроизведены и подтверждены (Рис. 1).

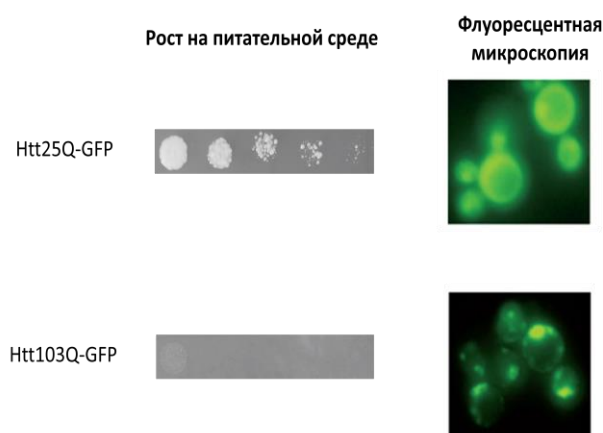


Рисунок 1. Дрожжевая модель болезни Гентингтона. Слева показан рост клеток дрожжей на твердой питательной среде с галактозой в присутствии мутантного (Htt103Q-GFP) и нормального (Htt25Q-GFP) Гентингина. Продукция Htt103Q-GFP в отличие от Htt25Q-GFP замедляет рост клеток. Справа показана локализация флуоресценции, диффузная флуоресценция в случае продукции Htt25Q-GFP и образование точечных агрегатов в случае продукции Htt103Q-GFP.

Ранее было показано, что в дрожжевых клетках Htt103Q-GFP формирует ДСН-устойчивые агрегаты, которые имеют амилоидную природу, так как они устойчивы к обработке детергентами, что является общим свойством для всех амилоидов. Также было продемонстрировано, что агрегаты Htt103Q-GFP могут вызывать амилоидную агрегацию белка Sup35, что в свою очередь вызывает вовлечение его партнера - белка Sup45 в состав амилоидных агрегатов. Этот процесс был одним из факторов, вызывавших токсичность Htt103Q-GFP в клетках дрожжей (Kochneva-Pervukhova *et al.*, PLoS One, 2012).

Амилоидная природа детергент устойчивых полимеров Htt103Q-GFP, формируемых в дрожжевых клетках, также подтверждается, тем фактом, что они содержат универсальные амилоидные эпитопы для связывания специфических анти-амилоидных ДНК аптамеров

(Mitkevich *et al.*, Prion, 2012). Несмотря на то, что в отличие от Htt103Q-GFP, Htt25Q-GFP не вызывает токсичности у дрожжей и не формирует флуоресцентные точечные агрегаты, при помощи SDD-AGE-анализа нам удалось выявить следовое количество полимеров Htt25Q-GFP, возникающее вследствие взаимодействия мономерного Htt25Q-GFP с прионными фибриллами белка Rnq1, что позволило нам предположить, что более эффективная полимеризация Htt25Q-GFP могла бы приводить к токсичности. Так как белки с длинными полиглутаминовыми областями формируют полимеры, которые способствуют агрегации белков с короткими полиглутаминовыми областями, неагрегирующими в отсутствие затравочной амилоидной матрицы (Perez *et al.*, J. Cell. Biol., 1998; Shimohata *et al.*, Nature Genet., 2000), можно предположить, что полимеры белков с длинными полиглутаминовыми областями могут являться матрицами для эффективной кополимеризации белка Htt25Q-GFP.

Ранее в нашей лаборатории был сконструирован набор плазмид, кодирующих белок Sup35, у которого N-концевой домен был заменен на полиглутаминовый домен со вставками всех других кодируемых аминокислотных остатков, кроме лизина и аспарагиновой кислоты. Таким образом, полученные белки состояли из MC-доменов Sup35 и полиглутаминового тракта, имеющего вид (QQQXQ)_n, где n – число повторяющихся элементов, а X – это вставочная аминокислота (Рис. 2).

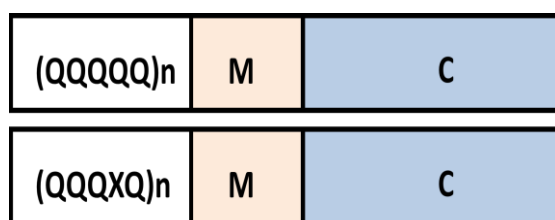


Рисунок 2. Схематическое изображение искусственных полиглутаминовых белков. Полиглутаминовая область вида (QQQXQ)_n, где X-любая аминокислота, а n-количество tandemных повторов, соединенная с MC-доменами белка Sup35.

Было показано, что такие белки формируют нетоксичные ДСН-устойчивые полимеры в клетках дрожжей (Alexandrov *et al.*, J. Biol. Chem., 2008). В данной работе мы модифицировали эти белки, заменив C-домен белка Sup35 на зеленый флуоресцентный белок, GFP, либо на два повтора последовательности гемагглютинаина вируса гриппа (2НА). Далее нами была изучена способность данных белков индуцировать полимеризацию и вызывать токсичность белка Htt25Q-GFP.

Сначала мы провели ряд экспериментов, в которых продуцировали белок Htt25Q-GFP с индивидуальными искусственными полиглутаминовыми белками, соединенными с GFP. Было обнаружено, что совместная продукция некоторых из этих белков с нормальным гентингином приводит к токсичности. Это был белок с длинным полиглутаминовым трактом (Q131), а также белки со вставкой тирозина, треонина, изолейцина, триптофана и серина (данные не представлены).

Таким образом, наблюдаемый токсический эффект указывал на возможность полимеризации белка Htt25Q-GFP на матрицах искусственных полиглутаминовых белков. Чтобы подтвердить данное предположение, необходимо было непосредственно визуализировать амилоидные полимеры нормального гентингина Htt25Q-GFP.

Для того чтобы изучить способность белка Htt25Q-GFP к образованию амилоидных агрегатов были созданы клетки, продуцирующие этот белок совместно с искусственными полиглутаминовыми белками с 2НА-тэгом - полиQ/QX-2НА. Альтернативный биохимический

маркер был необходим для наблюдения за поведением амилоидных полимеров нормального гентингина и искусственных полиQ/QX белков на белковом агарозном фореze независимо друг от друга. Было проанализировано 7 полиглютаминовых белков, для которых GFP был заменен на 2HA эпитоп. Замена эпитопа была проведена для тех полиQ/QX последовательностей, у которых токсический эффект нормального гентингина был наиболее очевиден (76QY-, 131Q-, 120QY-, 101QT-). Белки 85Q- и 91QV-НА были также проанализированы в качестве контроля. Важно, что замена GFP на НА-тэг, не повлияла на способность этих белков вызывать токсичность в присутствии Htt25Q-GFP (Рис. 4).

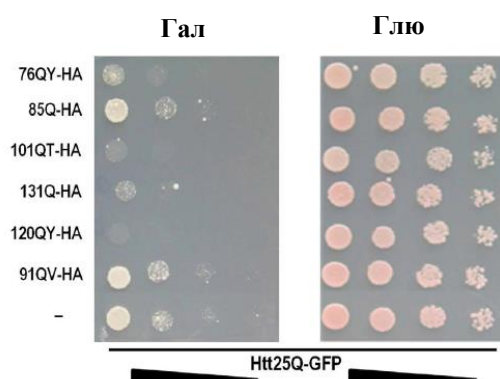
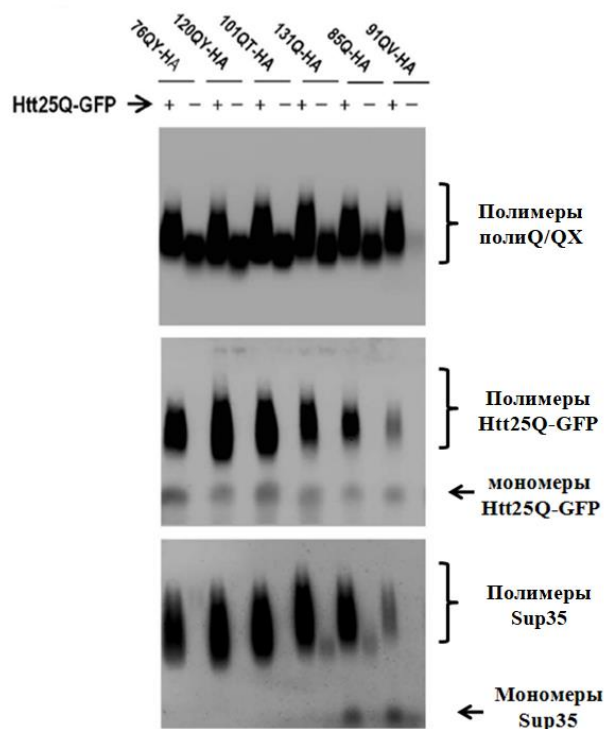


Рисунок 4. Совместная продукция нормального гентингина Htt25Q-GFP с полиQ/QX-НА белками приводит к токсичности. Клетки $[psi^-][PIN^+]$ штамма 74-D694, несущие пару мульткопийных плазмид: p25Q-GFP, кодирующую нормальный гентингин Htt25Q-GFP и Yер181-QX-2НА, кодирующую один из полиглютаминовых белков полиQ/QX-НА (-, пустой вектор), выращивали в жидкой селективной среде YNB с глюкозой, переносили в жидкую селективную среду YNB с раффинозой на 4 часа, выравнивали концентрацию клеток по оптической плотности ($OD_{600}=1$) и высевали их на чашку галактозой. Суспензии наносили последовательным разведением в пять раз. Для количественного контроля за нанесением одинакового числа клеток использовали чашку с глюкозой, так как на среде с глюкозой цитотоксический эффект полимеров нормального гентингина не проявляется.

Затем мы исследовали лизаты клеток, продуцирующих полиQ/QX-НА белки вместе с белком Htt25Q-GFP, при помощи агарозного фореze в полуденатурирующих условиях. Как и ожидалось, клетки, содержащие полимеры полиQ/QX белков, содержали также и полимеры белка Htt25Q-GFP, что подтверждало наше предположение о том, что полимеры полиQ/QX белков способны индуцировать полимеризацию белка Htt25Q-GFP. Интересно, что сверхпродукция белка Htt25Q-GFP в клетках, синтезирующих белки полиQ/QX увеличивала размер их полимеров. Скорее всего, это связано с ДСН-устойчивым присоединением мономеров Htt25Q-GFP. Интересно также, что помимо вышеназванных амилоидных полимеров, нами были обнаружены детергент устойчивые агрегаты белка Sup35 в клетках, продуцирующих белок Htt25Q-GFP (Рис. 5). Данное наблюдение позволило нам сделать предположение, что именно переход этого жизненно важного белка в полимерное состояние, играет основную роль в токсичности нормального гентингина, по аналогии с механизмом токсичности мутантного гентингина, продемонстрированного в работе Кочневой с соавторами (2012) (Kochneva-Pervukhova *et al.*, PLoS One, 2012). Доказательство данного предположения изложено ниже. Стоит также отметить, что в клетках, синтезирующих искусственные полиглютаминовые белки 85Q-НА и 131Q-НА, но не продуцирующих белок Htt25Q-GFP, также были обнаружены полимеры Sup35, что согласуется с данными, полученными в нашей

лаборатории ранее (Urakov *et al.*, Prion, 2010). По всей видимости, незначительное снижение количества растворимого Sup35 в этих случаях не влияет на рост клеток.

Рисунок 5. Полимеризация искусственных полиглутаминовых белков вызывает агрегацию белка Htt25Q-GFP. Полимеры Htt25Q-GFP способствуют эффективной полимеризации белка Sup35. В клетки штамма дрожжей 74-D694 [*psi⁻*][*PIN⁺*] вводили одну из плазмид, кодирующих искусственные полиQ/QX белки (76QY-, 85Q-, 91QV, 131Q-, 120QY-, 101QT-НА), вместе с плазмидой, содержащей ген нормального гентингтина Htt25Q-GFP (-, пустой вектор в качестве контроля). Индукцию синтеза белка Htt25Q-GFP проводили в соответствии с протоколом, описанном в разделе “материалы и методы”. Клетки инкубировали в жидкой среде с галактозой 10 ч. После этого клетки осаждали и лизировали. Лизаты клеток были подвергнуты SDD-AGE-анализу на предмет наличия ДСН-устойчивых полимеров белков полиQ/QX-НА, Htt25Q-GFP и Sup35.



2. Токсичность Htt25Q связана с истощением растворимых форм белков Sup35 и Sup45

У дрожжей важным источником токсичности мутантного гентингтина Htt103Q является уменьшение количества растворимой формы жизненно важного фактора терминации трансляции Sup35 из-за его перехода в амилоидное состояние и, как следствие этого процесса, уменьшение растворимой формы белка Sup45, который при взаимодействии с белком Sup35 переходит в нерастворимую амилоидную фракцию (Kochneva-Pervukhova *et al.*, PLoS One, 2012). Таким образом, можно было предполагать, что аналогичный механизм лежит и в основе токсического эффекта агрегатов Htt25Q, о чем также свидетельствовали результаты, полученные при изучении полимеризации белков Htt25Q и Sup35 при помощи агарозного фореа. Электрофорез в полуденатурирующих условиях показал, что сами по себе полимеры белков полиQ/QX-НА не способны эффективно индуцировать полимеризацию Sup35 (Рис. 5). Только амилоиды белков 85Q-НА и 131Q-НА способствовали появлению следовых количеств полимеров Sup35. Это согласуется с наблюдениями, сделанными ранее в нашей лаборатории, демонстрирующими, что гомогенные полиQ последовательности индуцируют полимеризацию Sup35 лучше, чем полиглутаминовые последовательности со вставкой какой-либо аминокислоты, например, тирозина (полиQY) (Urakov *et al.*, Prion, 2010). Напротив, совместная продукция ряда искусственных полиQ белков совместно с белком Htt25Q, вызывающая появление амилоидов нормального гентингтина, всегда приводила к появлению полимеров Sup35.

Мы предположили, что различия в кополимеризационных свойствах между амилоидами белка Htt25Q-GFP и амилоидами полиQ/QX-НА белков возникают вследствие существенной разницы в уровнях экспрессии нормального модельного гентингтина и модельных полиQ белков. Уровень экспрессии Htt25Q-GFP гораздо выше, чем у полиQ/QX-НА последовательностей, а, следовательно, и полимеров Htt25Q-GFP должно быть больше, чем полимеров полиQ/QX-НА белков, и, таким образом, большее количество амилоидных полимеров Htt25Q-GFP будет эффективнее индуцировать амилоидную полимеризацию белка Sup35. Однако количественный анализ показал, что уровень полимеров Htt25Q-GFP превышает уровень полимеров белков 76QY- или 120QY-GFP не более чем в 2 раза (Рис. 7). Для количественной оценки уровня полимеризованного вещества был использован метод денситометрического анализа изображений с помощью программы ImageJ. Измерения были проведены для 6 независимо полученных трансформантов. Скорее всего, такая небольшая разница в количестве полимеров Htt25Q-GFP и полиQ/QX белков не объясняет существенные различия в их кополимеризационных свойствах.

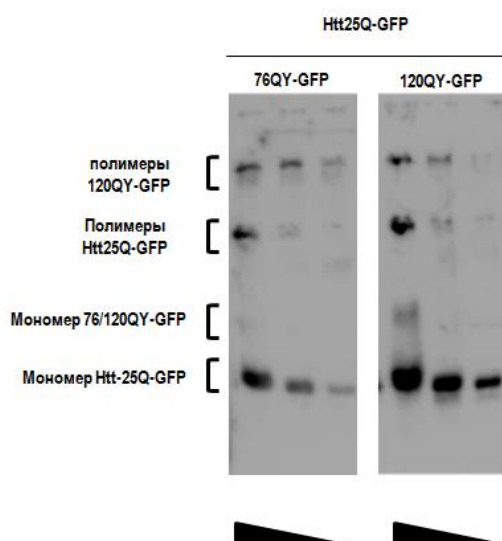


Рисунок 7. Сравнение количества мономеров Htt25Q-GFP и QY-белков в составе амилоидных полимеров. Использовали дрожжевые клетки штамма 74D-694 [*psi⁺*] [*PIN⁺*], содержащие плазмиды, кодирующие белки Htt25Q-GFP и 76QY-GFP, либо Htt25Q-GFP и 120QY-GFP. Клетки были выращены в соответствии с методикой, описанной в разделе “Материалы и методы”. Индукция синтеза Htt25Q-GFP, электрофорез в полиакриламидном геле с последующим кипячением и иммуноблоттинг проводили в соответствии с описанными протоколами. Покраску блотов осуществляли с помощью антител к GFP. Мономерная форма белков бежит ближе к фронту. Полимеры Htt25Q-GFP и полиQY белков в результате кипячения в ДСН распадаются до мономеров, которые входят в полиакриламидный гель. Количества мономерных белков Htt25Q-GFP и полиQY в составе полимера отличаются незначительно: уровень мономерного Htt25Q-GFP превосходит уровень мономерного полиQY белка в составе полимера не более, чем в 2 раза (в 1,4 для 76QY-GFP, в 2 для 120QY-GFP). Количественные измерения проводили с использованием программы денситометрического анализа изображений ImageJ.

Таким образом, различия в эффективности кополимеризации амилоидами белков полиQ/QX и Htt25Q-GFP белка Sup35 остаются неясными. Возможно, различие в кополимеризационных свойствах этих белков связано с N-концевой последовательностью

Htt25Q-GFP (FLAG-эпитоп вместе с 17 аминокислотами, кодирующие начало первого экзона гена гентингина), которая делает этот белок эффективным индуктором полимеризации Q/N-богатых белков, в частности белка Sup35.

Полученные данные показали, что полимеры Htt25Q-GFP индуцируют полимеризацию белка Sup35, что может быть причиной токсического эффекта в клетках дрожжей. Для проверки этой гипотезы в клетках дрожжей штамма 74-D694 [*psi*⁻][*PIN*⁺] была продуцирована неагрегирующая форма белка Sup35, которая лишена NM доменов (Sup35C), вместо полноразмерного белка. Нами было показано, что замена полноразмерного белка Sup35 на его С-домен, приводит к снятию токсического эффекта полимеров Htt25Q-GFP (Рис. 8).

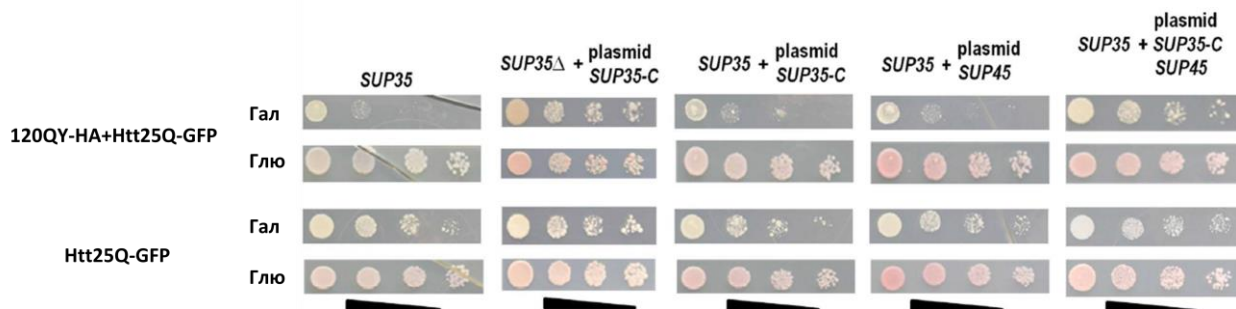


Рисунок 8. Токсичность полимеров Htt25Q-GFP связана с истощением жизненно важных факторов терминации Sup35 и Sup45. Использовали дрожжевые клетки штамма 74-D694 [*psi*⁻][*PIN*⁺], содержащие плазмиду, кодирующую последовательности одновременно двух белков 120QY-NA и Htt25Q-GFP, или клетки, содержащие плазмиду, кодирующую белок Htt25Q-GFP. Также использовали клетки штамма 74-D694 [*psi*⁻][*PIN*⁺] с делецией гена *SUP35*, прикрытую автономной центромержной плазмидой, кодирующей жизненно важный С-концевой домен белка Sup35. В дрожжевые клетки без делеции гена *SUP35* вводили одну из трех плазмид, кодирующую либо С-домен белка Sup35, либо белок Sup45, либо одновременно и С-домен белка Sup35, и белок Sup45. Дрожжевые клетки с делецией гена *SUP35* трансформировали одной из двух плазмид, экспрессирующих гены *HTT25Q-GFP*+*120QY-NA* в первом случае, *HTT25Q-GFP* во втором. Клетки выращивали в селективной среде и проводили дерепрессию галактозного промотора в соответствии с протоколами, описанными в разделе “Материалы и методы”. Затем делали последовательные разведения в 5 раз и переносили клетки на среду с глюкозой и галактозой в соответствии с методикой. Одновременная продукция С-домена белка Sup35 и белка Sup45 приводила к снятию токсического эффекта, вызванного полимерами белка Htt25Q-GFP в штамме 74-D694 [*psi*⁻][*PIN*⁺] дикого типа. Продукция белков Htt25Q-GFP и 120QY-NA в штамме 74-D694 [*psi*⁻][*PIN*⁺] Δ*SUP35*(+*SUP35C*) не приводила к появлению токсического эффекта, что также свидетельствует об участии белка Sup35 в процессе замедления роста клеток, вызванного полимерами Htt25Q-GFP (объяснение в тексте).

Важно отметить, что совместная продукция Sup35C с белком Sup35 дикого типа не приводила к улучшению роста клеток, которые продуцировали Htt25Q-GFP и 120QY-NA. Это указывает на то, что не только уменьшение растворимой формы белка Sup35 приводит к токсичности, но также вклад в токсический эффект вносят полимеры белка Sup35. Это соответствует результатам, полученным для мутантного гентингина Htt103Q-GFP, токсичность которого зависела не только от уменьшения растворимой формы белка Sup35, но также от появления полимеров белка Sup35. Амилоидные полимеры белка Sup35 увлекали в нерастворимую фракцию другой жизненно важный белок - фактор терминации трансляции

Sup45, который является функциональным партнером белка Sup35 (Kochneva-Pervukhova *et al.*, PLoS One, 2012). Действительно, как и в случае с мутантным гентинггином Htt103Q-GFP, полимеры белка Htt25Q-GFP вызывали истощение активного пула растворимых Sup35 и Sup45, хотя и в меньшей степени (Рис. 9).

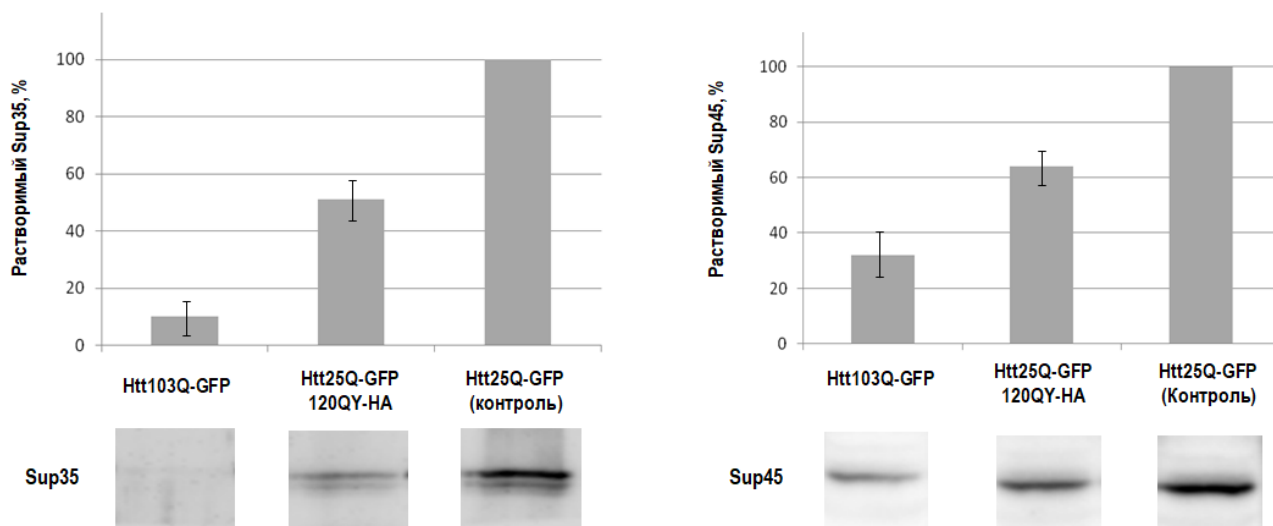


Рисунок 9. Анализ количества растворимых форм белков Sup35 и Sup45 в присутствии Htt103Q-GFP, агрегированной и растворимой формы белка Htt25Q-GFP. Дрожжевые клетки штамма 74-D694 [*psi*⁻][*PIN*⁺], несущие плазмиды, кодирующие белки Htt103-GFP, Htt25Q-GFP+120QY-НА или Htt25Q-GFP выращивали в селективной среде и индуцировали синтез рекомбинантных белков. Затем клетки лизировали, а лизаты фракционировали при помощи ультрацентрифугирования. После этого анализировали супернатанты при помощи полиакриламидного фореза и вестерн блоттинга с использованием поликлональных антител на NM-домены белка Sup35 и на белок Sup45. Количество белков Sup35 и Sup45 в клетках, продуцирующих белок Htt25Q-GFP, принимали за 100% и определяли их относительные количества в клетках продуцирующих Htt103Q-GFP или Htt25Q-GFP+120QY-НА. Количественный анализ проводили при помощи денситометрического метода с использованием программы ImageJ. Представлены усредненные данные для трех независимо-полученных трансформантов каждого типа.

Однако, в отличие от мутантного гентинггина, сверхпродукция Sup45 не снимала токсический эффект нормального гентинггина. Только одновременная сверхпродукция Sup35C и Sup45 в штамме с геном SUP35 дикого типа, продуцирующим Htt25Q-GFP вместе с 120QY-НА, приводила к частичному снятию токсического эффекта нормального гентинггина (Рис. 8).

3. Сверхпродукция прионного белка Rnq1 приводит к агрегации и токсичности белка Htt25Q-GFP в клетках с фенотипом [*PIN*⁺]

Как было отмечено выше, [*PIN*⁺] фенотип приводит к появлению остаточного количества полимеров Htt25Q-GFP, что не вызывает токсического эффекта. Неэффективная индукция полимеризации Htt25Q-GFP, в данном случае, может быть вызвана малым количеством

полимеров Rnq1 в $[PIN^+]$ клетках. Это подтверждается тем, что полимеры белка Pub1 - дрожжевого белка, имеющего Q/N-богатый домен, возникают в $[PIN^+]$ клетках только в случае повышенных уровней экспрессии как Rnq1, так и Pub1 (Uraikov *et al.*, Prion, 2010). Аналогичная ситуация наблюдается и для белка Htt25Q-GFP, который эффективно полимеризуется и вызывает токсичность в $[PIN^+]$ клетках на фоне сверхпродукции Rnq1. Как и в предыдущих случаях, здесь полимеризация Htt25Q-GFP сопровождается появлением полимеров белка Sup35 (Рис. 10).

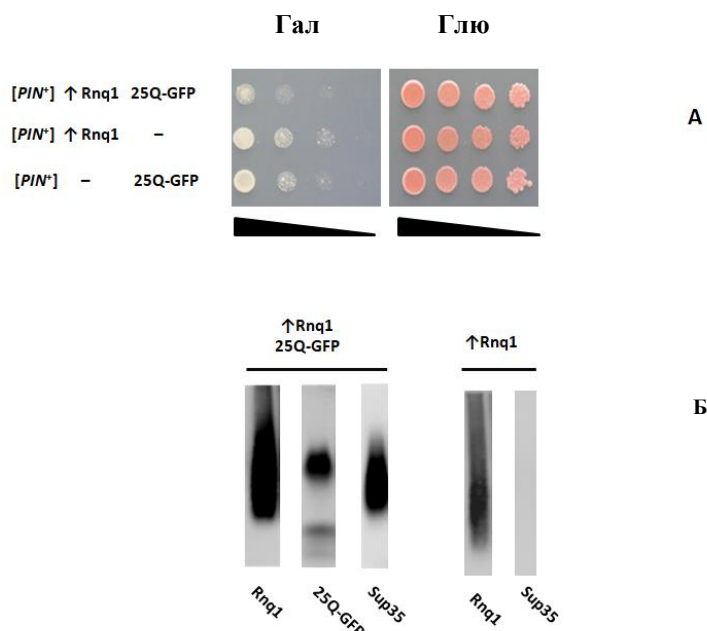


Рисунок 10. Белок Htt25Q-GFP агрегирует и вызывает токсичность в $[PIN^+]$ клетках на фоне сверхпродукции белка Rnq1. А) Рост клеток дрожжей штамма 74-D694 $[psi^-][PIN^+]$, сверхпродуцирующих один из белков Htt25Q-GFP, Rnq1 или оба сразу. Клетки выращивали на селективной среде и индуцировали синтез рекомбинантных белков на твердой среде с галактозой в соответствии с описанными методиками. Одновременная сверхпродукция двух белков Htt25Q-GFP и Rnq1 приводила к цитотоксичности. Б) Полученные выше трансформанты выращивали в селективной среде с глюкозой и индуцировали синтез белка Htt25Q-GFP в жидкой среде с галактозой. Далее производили лизис клеток и анализировали лизаты при помощи SDD-AGE и вестерн-блоттинга (применяли поликлональные антитела к GFP-, NM-Sup35-, Rnq1-эпитопам).

Интересно, что полимеры Sup35 не возникают в $[PIN^+]$ клетках, сверхпродуцирующих Rnq1, в отсутствие Htt25Q-GFP, что подтверждает тот факт, что полимеризация Sup35 зависит исключительно от Htt25Q-GFP.

Таким образом, не только амилоиды, образованные искусственными полиглютаминовыми белками, но и амилоиды собственных белков дрожжей (Rnq1) могут индуцировать амилоидную полимеризацию белка Htt25Q-GFP, и вызывать цитотоксичность. В результате перехода белка Htt25Q-GFP в амилоидное состояние происходит полимеризация жизненно важного белка, фактора терминации трансляции Sup35, что, как уже было показано, с неизбежностью ведет к истощению мономерных фракций белков Sup35 и Sup45. Это указывает на то, что токсический эффект, наблюдаемый в случае продукции белка Htt25Q-GFP в $[PIN^+]$ клетках на фоне

сверхпродукции белка Rnq1, прежде всего, связан с инактивацией факторов терминации трансляции Sup35 и Sup45.

4. Растворимый Htt25Q-GFP может проявлять токсичность в неоптимальных для роста условиях

Не только $[PIN^+]$ фенотип, но и $[PSI^+]$ вызывает токсичность мутантного гентингина Htt103Q-GFP [132]. Это побудило нас проверить способность $[PSI^+]$ -полимеров вызывать токсичность и полимеризацию нормального гентингина Htt25Q-GFP. Как и ожидалось, сверхпродукция Htt25Q-GFP на фоне фенотипа $[PSI^+]$ ингибировала рост клеток. Данный эффект исчезал в присутствии неагрегирующего Sup35C (Рис. 11).

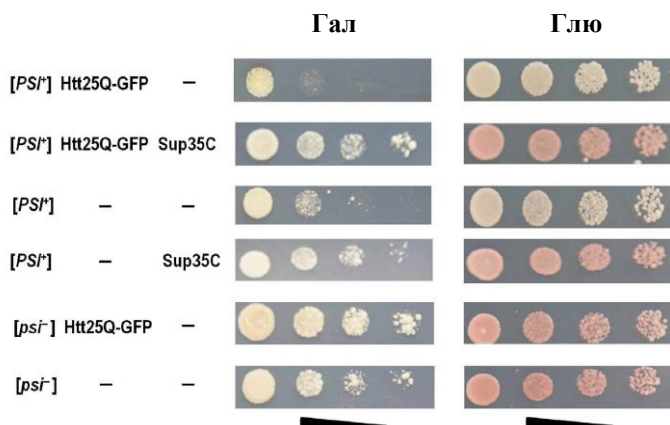
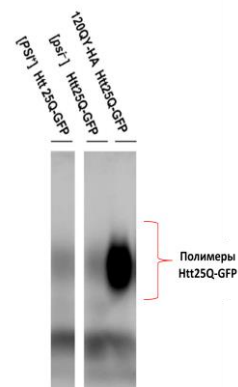


Рисунок 11. Продукция Htt25Q-GFP в $[PSI^+]$ клетках приводит к цитотоксичности. В клетки штамма дрожжей 74-D694 $[PSI^+][PIN^+]$ вводили одну из двух плазмид pQ25-GFP, кодирующую белок Htt25Q-GFP или pYes2 (пустой вектор). Затем в получившиеся трансформанты вводили либо центромерную плазмиду, кодирующую С-концевой домен белка Sup35, либо пустой вектор (-). В качестве контроля использовали производный от первого штамма штамм дрожжей 74-D694 $[psi^-][PIN^+]$, в одном случае несущий плазмиды pQ25-GFP и Yeplac181, в другом pYes2 и Yeplac181 (два пустых вектора). Полученные клетки выращивали в жидкой селективной среде с глюкозой, переносили на три часа в среду с раффинозой и высевали на чашки с галактозой и глюкозой (контроль нанесения одинакового количества клеток на чашки).

Однако Htt25Q-GFP не полимеризовался в $[PSI^+]$ клетках, несмотря на то, что этот белок образовывал амилоиды в $[PIN^+]$ клетках на фоне сверхпродукции Rnq1. Таким образом, наблюдаемая токсичность Htt25Q-GFP в $[PSI^+]$ клетках не связана с полимеризацией Htt25Q-GFP (Рис. 12).

Рисунок 12. Белок Htt25Q-GFP не образует ДСН-устойчивых полимеров в штаммах дрожжей 74-D694 $[PSI^+][PIN^+]$ и 74-D694 $[psi^-][PIN^+]$. Для исследования брали клетки дрожжей штамма 74-D694 $[PSI^+][PIN^+]$ и 74-D694 $[psi^-][PIN^+]$, содержащие плазмиду, кодирующую белок Htt25Q-GFP. В качестве позитивного контроля использовали клетки несущие плазмиду pYES2-120QY-2HA+Htt25-GFP. Клетки выращивали в селективной среде с глюкозой, производили индукцию синтеза рекомбинантных белков, лизис клеток, анализ полимеризации белка Htt25Q-GFP при помощи SDD-AGE и иммуноблотинга. (покраска антителами на GFP).



Чтобы объяснить причины замедления роста клеток, мы предположили, что нормальный гентингтин Htt25Q-GFP, не агрегируя сам, вызывает усиление агрегации белка Sup35 в составе прионных амилоидов. Однако это предположение не подтвердилось, так как экспрессия Htt25Q-GFP в $[PSI^+]$ клетках не уменьшала уровень растворимого Sup35 и не увеличивала количества его полимеров (Рис. 13).

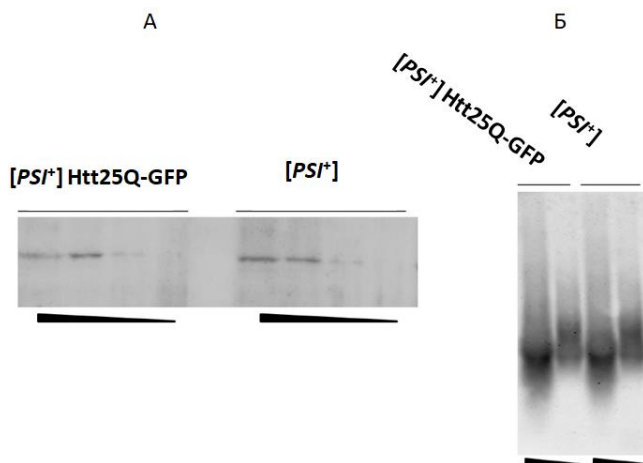


Рисунок 13. Продукция белка Htt25Q-GFP в $[PSI^+]$ клетках не влияет на количество белка Sup35, находящегося в растворимой и агрегированной форме. Лизаты клеток дрожжей 74-D694 $[PSI^+][PIN^+]$ с делецией гена PRB1, кодирующим протеиназу В (для избежания протеолитической деградации белка Sup35), продуцирующих белок Htt-25Q-GFP, или контрольных клеток были проанализированы с помощью электрофореза и иммуноблотинга. Индукцию синтеза Htt25Q-GFP проводили в соответствии с протоколом, описанном в разделе “Материалы и методы”. А) Анализ количества растворенной формы белка Sup35 проводили при помощи полиакриламидного фореа без кипячения. Использовали образцы без разведения, разведенные в 3 и в 9 раз. Б) Анализ количества агрегированной формы белка Sup35 проводили при помощи SDD-AGE. Использовали образцы без разведения и разведенные в 3 раза. Для покраски блотов использовали антитела на NM-домены белка Sup35.

Важно отметить, что на среде с галактозой $[PSI^+]$ клетки растут медленнее, чем $[psi^-]$ клетки, при этом именно среда с галактозой используется для индукции экспрессии Htt25Q-GFP (Рис. 22), и эффект замедления роста становится более выраженным при продукции в $[PSI^+]$ клетках белка Htt25Q-GFP. Принимая это во внимание, мы предположили, что растворимый Htt25Q-GFP ингибирует рост клеток только в условиях, неоптимальных для роста дрожжей. Гипотеза подтверждается тем, что токсичность Htt25Q-GFP также обнаруживается при росте клеток в присутствии некоторых агентов, ингибирующих рост дрожжей, таких как кофеин, додецил-сульфат натрия и Конго Красный (Рис. 14).

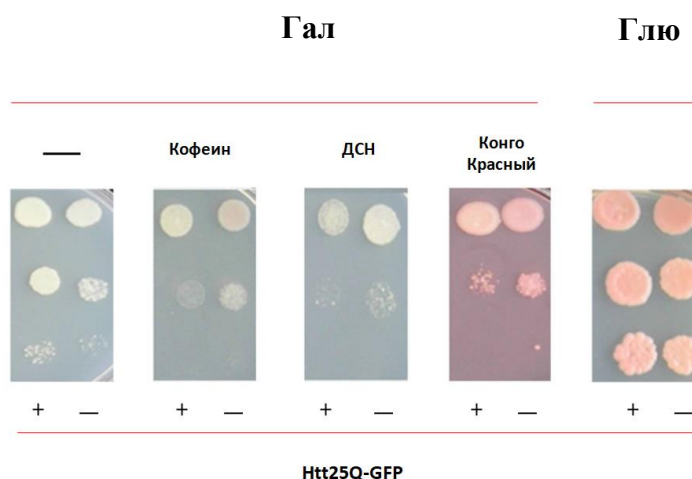


Рисунок 14. Растворимая форма белка Htt25Q-GFP может быть токсична в условиях, неоптимальных для роста клеток дрожжей. Дрожжевые клетки штамма 74-D694 [*psi*⁻][*PIN*⁺], содержащие плазмиду p25Q-GFP, кодирующую белок Htt25Q-GFP, или пустой вектор, выращивали на селективной среде с глюкозой и затем переносили на 3 часа на среду с раффинозой для дерепрессии галактозного промотора. Далее количество клеток выравнивали по оптической плотности и делали 3 последовательных разведения в 5, 25 и 125 раз. Полученные суспензии клеток наносили на чашки с 2% галактозой, 2% галактозой и 3 mM кофеином, 2% галактозой и 0.006% ДСН, 2% галактозой и Конго Красным (5 µg/ml) и с 2% глюкозой. Клетки, продуцирующие белок Htt25Q-GFP, хуже растут в условиях стресса, чем клетки, не синтезирующие данный белок.

Чтобы дополнительно подтвердить тот факт, что мономерная форма белка Htt25Q-GFP может быть токсична для клеток дрожжей, было решено исследовать лизаты клеток, выращенных в стрессовых условиях, на предмет наличия в них амилоидных полимеров белка Htt25Q-GFP. В условиях, неоптимальных для роста дрожжей (рост клеток в присутствии кофеина, ДСН, Конго Красного), при которых наблюдался замедленный рост в присутствии Htt25Q-GFP, данный белок практически не агрегировал (Рис. 15).

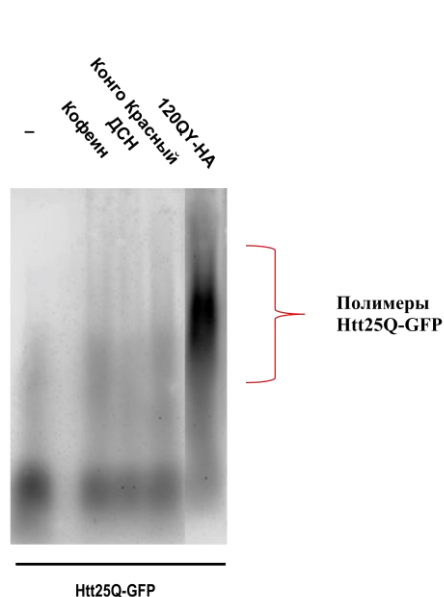


Рисунок 15. Белок Htt25Q-GFP не образует амилоидных полимеров при росте на среде с галактозой в присутствии ДСН, кофеина или Конго Красного. Дрожжевые клетки штамма дрожжей 74-D694 [*psi*⁻][*PIN*⁺], содержащие плазмиду p25Q-GFP, выращивали на селективной среде с глюкозой, затем проводили дерепрессию галактозного промотора в жидкой среде с раффинозой в течение 3-х часов. После этого переносили клетки в жидкую среду с галактозой и одним из трех компонентов (ДСН, кофеином или Конго Красным) для индукции синтеза белка Htt25Q-GFP в условиях стресса. Далее проводили анализ полимеризации белка Htt25Q-GFP при помощи SDD-AGE и иммуноблотинга (покраска поликлональными антителами на GFP). В качестве контроля использовали лизаты клеток, содержащие амилоидные полимеры белков Htt25Q-GFP и 120QY-НА.

Таким образом, полученные данные показывают, что растворимая форма белка Htt25Q-GFP может вызывать токсичность в дрожжевых клетках, однако неясно связана ли эта токсичность с наличием полиглутаминовой области, белком GFP или просто тем фактом, что некий белок продуцируется на высоком уровне. Ген, кодирующий белок Htt25Q-GFP находится под контролем сильного галактозного промотора, что ведет к значительному увеличению уровня растворимого белка в клетках дрожжей. Согласно литературным данным белок GFP может быть токсичен для клеток млекопитающих, в частности вызывая оксидативный стресс (Liu *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., 1999; Ganini *et al.*, Redox Biol., 2017). Поэтому можно предположить, что высокие уровни продукции GFP-меченых белков могут оказывать токсическое действие на дрожжевые клетки.

Механизмы токсичности гентингтина отличаются для разных штаммов

Мы охарактеризовали механизм токсичности амилоидов Htt25Q-GFP. Этот механизм токсичности с некоторыми особенностями также характерен для патологических амилоидов белка Htt103Q-GFP.

На сегодняшний день известно множество механизмов токсического воздействия амилоидов мутантного гентингтина на клетки дрожжей. Поскольку в основе некоторых из них лежат взаимодействия между амилоидогенными белками, было решено изучить взаимосвязь между такими механизмами.

Выбор именно мутантного гентингтина Htt103Q, а не белка Htt25Q с какой-либо затравкой (например, 120QY-NA), объясняется несколькими причинами: во-первых, сверхпродукция мутантного гентингтина Htt103Q имеет более выраженный фенотип, чем сверхпродукция белка Htt25Q в присутствии затравочных полимеров, во-вторых, моделирование болезни Гентингтона в дрожжах с использованием сверхпродукции белка Htt103Q удобнее, по сравнению с системой токсичности, основанной на полимеризации белка Htt25Q, так как последняя содержит большее число компонентов (в первой системе для каждой опытной точки используется одна плазмида, во второй две) и, в-третьих, количество литературных данных о токсичности мутантного гентингтина Htt103Q больше, чем для нормального гентингтина (токсичность Htt25Q впервые была показана в данной диссертационной работе).

5. Делеция *DEF1* в штамме BY4742 уменьшает количество детергент-устойчивых агрегатов Htt103Q и снимает токсичность, при этом не оказывая влияния на количество полимеризованного белка Sup35

Как уже было описано ранее, при сверхпродукции мутантный гентингтин с удлиненным полиглутаминовым доменом образует в клетках дрожжей токсичные амилоидные агрегаты. При этом токсичность мутантного гентингтина может модулироваться с помощью сверхэкспрессии или делеции различных генов. В нашей и других лабораториях было неоднократно продемонстрировано, что токсичность связанная с присутствием амилоидов гентингтина в штаммах 74-D694 и GT81 дрожжей *S. cerevisiae*, возникает вследствие истощения растворимых форм белков Sup35 и Sup45 (Kochneva-Pervukhova *et al.*, PLoS One, 2012; Zhao *et al.*, J. Biol. Chem., 2012; Gong *et al.*, PLoS Genet., 2012). Однако другими авторами было показано, что токсичность мутантного гентингтина также может зависеть и от других

белков: Def1, Yir003w, Ylr278c. Делеции соответствующих генов снимают токсический эффект HttQ103 в штамме BY4741 (Giorgini *et al.*, Nature genetics, 2005).

Чтобы изучить причину снятия токсического эффекта, связанного со сверхпродукцией белка Htt103Q в клетках дрожжей с делециями генов *DEF1*, *YIR003w*, *YLR278c*, необходимо было воспроизвести данный результат. Работая со штаммом BY4742, который отличается от штамма BY4741 только типом спаривания, мы смогли воспроизвести этот эффект только для делеции гена *DEF1* (Рис. 16).

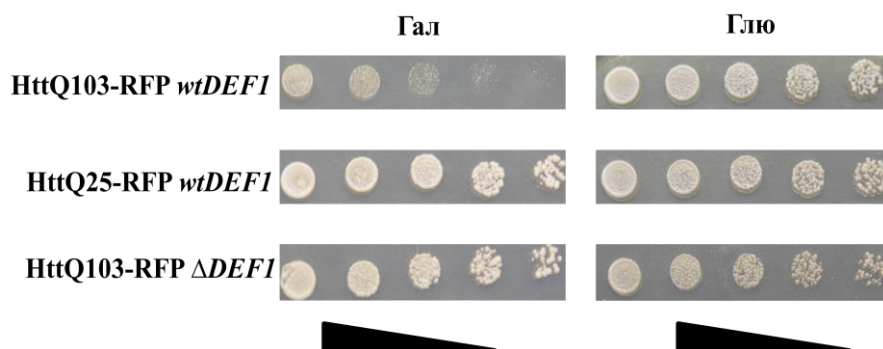


Рисунок 16. Делеция гена *DEF1* снимает токсичность, вызванную сверхпродукцией белка Htt103Q-RFP в штамме BY4742. Клетки штамма BY4742 дикого типа и с делецией гена *DEF1*, продуцирующие один из белков Htt103Q-RFP или Htt25Q-RFP выращивали в жидкой селективной среде и дерепрессировали галактозный промотор на среде с раффинозой. После этого выравнивали концентрацию клеток по оптической плотности ($OD_{600}=1$) и высевали их на чашку галактозой и глюкозой (производили 5 серийных пятикратных разведений клеточных суспензий).

По литературным данным известно, что белок Def1 коагрегирует с амилоидами гентингина (Duennwald *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 2006), и токсичность последнего в штамме 74-D694 зависит от перехода белка Sup35 в амилоидное состояние. Основываясь на этих литературных данных, а также учитывая результаты, полученные в ходе этой диссертационной работы, демонстрирующие, что белок Htt25Q является посредником в передаче амилоидной конформации от одних белков другим, мы выдвинули предположение, что снятие токсического эффекта мутантного гентингина HttQ103-RFP вследствие делеции гена *DEF1* в штамме BY4742 происходит в результате снижения способности амилоидов HttQ103-RFP инициировать полимеризацию белка Sup35. Сложные амилоидные агрегаты, состоящие из комплекса Def1+Htt103Q, могли бы более эффективно индуцировать полимеризацию белка Sup35, чем амилоидные агрегаты не имеющие в своем составе белка Def1. Мы предположили, что белок Def1 будет являться посредником в передаче амилоидной укладки от амилоидов белка Htt103Q белку Sup35.

Однако, оказалось, что делеция гена *DEF1* значительно уменьшает количество ДСН-устойчивых полимеров Htt103-RFP и не оказывает влияния на количество ДСН-устойчивой и растворимой фракций белка Sup35 (Рис. 17).

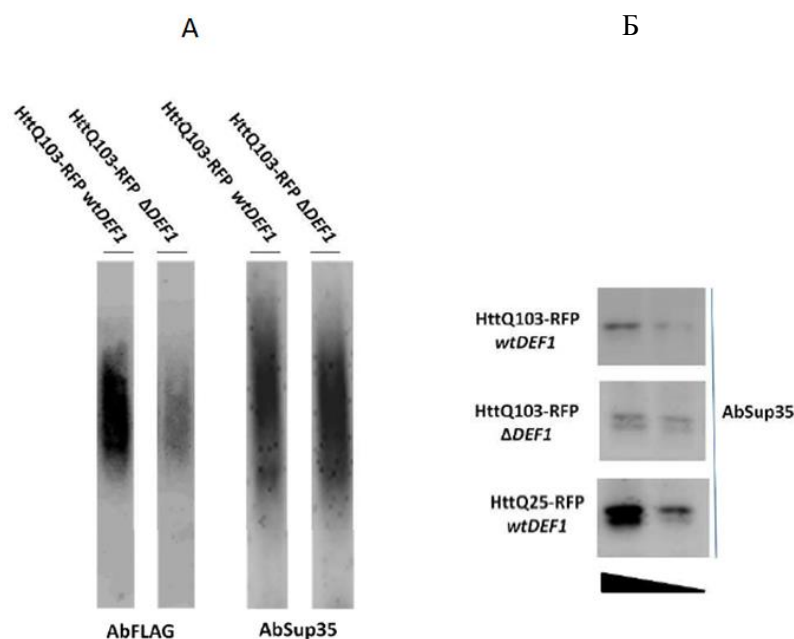


Рисунок 17. Делеция гена *DEF1* в штамме BY4742 приводит к уменьшению количества ДСН-устойчивых полимеров белка Htt103Q-RFP, при этом не влияя на количество полимеров белка Sup35. Использовали клетки штамма BY4742 дикого типа и с делецией гена *DEF1*, продуцирующие белок Htt103Q-RFP (Штамм BY4742 дикого типа, продуцирующий белок Htt25Q-RFP, использовали в качестве контроля). Клетки выращивали на селективной среде с глюкозой, дерепрессировали галактозный промотор в жидкой среде с раффинозой и индуцировали синтез Htt103Q-RFP в жидкой среде с галактозой. Затем клетки лизировали. А) Изучение амилоидной полимеризации белков Htt103Q-RFP и Sup35 проводили при помощи SDD-AGE и иммуноблоттинга (антитела на Flag-эпитоп и NM-домены Sup35). Б) Измерение количества растворимой формы белка Sup35 проводили с помощью полиакриламидного электрофореза и иммуноблоттинга (антитела на NM-домены белка Sup35). Лизаты клеток перед нанесением на полиакриламидный гель не кипятили, что позволяло увидеть только растворимую фракцию белка Sup35 (Kryndushkin *et al.*, J. Biol. Chem., 2013). Представлены лизаты, разведенные в 1 и 3 раза. Белок Sup35 бежит на фореze двумя полосами. Нижняя полоса представляет из себя форму этого белка, подвергнушуюся протеолизу (Paushkin *et al.*, EMBO J., 1996).

Уменьшение количества амилоидов HttQ103-RFP в клетках штамма дрожжей BY4742 Δ *DEF1* вызвано уменьшением общего количества белка HttQ103-RFP. Это было доказано с помощью регистрации интенсивности флуоресценции HttQ103-RFP в клетках штамма BY4742 дикого типа и клетках штамма BY4742 Δ *DEF1*. В последнем случае уровень флуоресценции был значительно ниже, чем в первом, что говорит о меньшем общем количестве белка HttQ103-RFP. Наиболее вероятно, что общий уровень HttQ103-RFP уменьшается в связи с ингибированием экспрессии гена, кодирующего данный белок, так как делеция гена *DEF1* также уменьшает общий уровень неагрегирующего белка HttQ25-RFP, экспрессия которого также находится под контролем галактозного промотора *GAL1* (Рис. 18).

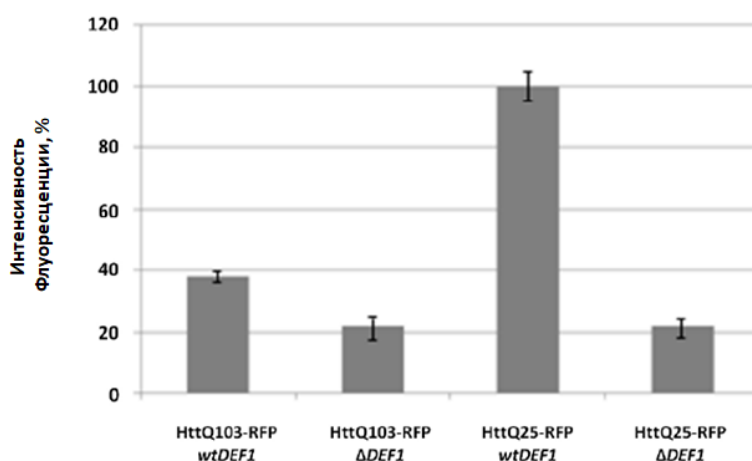


Рисунок 18. Делеция гена *DEF1* приводит к снижению общего количества белков Htt103Q-RFP и Htt25Q-RFP. В анализ брали клетки штамма дрожжей BY4742 дикого типа и с делецией гена *DEF1* и трансформировали в них плазмиды p103Q-RFP и p25Q-RFP, кодирующие соответствующие белки. Клетки выращивали в жидкой селективной среде с глюкозой, дерепрессировали галактозный промотор 12 часов на среде с раффинозой и индуцировали синтез рекомбинантных белков на среде с галактозой в течение 10 часов. Регистрацию флуоресценции проводили с помощью мультиплашечного ридера.

Все это свидетельствует о том, что сам по себе Def1 не принимает прямого участия в снижении уровня токсичности мутантного гентингтина, а также о том, что в штамме BY4742 белок Sup35 не принимает исключительного участия в модуляции токсичности мутантного гентингтина.

6. Делеция *DEF1* в штамме 74-D694 уменьшает количество детергент-устойчивых агрегатов белков Htt103Q и Sup35, но не приводит к снятию токсического эффекта

Делеция гена *DEF1* в штамме 74D-694 не снимала токсический эффект связанный с продукцией белка HttQ103-GFP, продукция которого имеет тот же фенотип, что показан для HttQ103-RFP. Однако, количества ДСН-устойчивых полимеров HttQ103-GFP и белка Sup35 уменьшались (Рис. 19). Данное противоречие объясняется тем, что делеция гена *DEF1* в штамме 74D-694 ингибирует рост клеток, так как клетки экспрессирующие нетоксичную версию гентингтина HttQ25-GFP и несущие делецию *DEF1*, растут медленнее, чем клетки дикого типа. Поэтому при продукции мутантного гентингтина Htt103Q-GFP в штамме 74D-694 $\Delta DEF1$ происходит сложение токсических эффектов: первого, связанного с делецией *DEF1* и второго, вызванного сверхпродукцией мутантного гентингтина Htt103Q-GFP (Рис. 32). Так как, согласно литературным данным, переход белка Sup35 в агрегированное состояние и истощение растворимых форм белков Sup35 и Sup45 не является единственным источником токсичности Htt103Q-GFP в штамме 74D-694, делеция гена *DEF1* в штамме 74D-694 может нивелировать многие из патологических эффектов мутантного гентингтина за счет снижения агрегации данного белка, но усиливать другие, для реализации которых не требуется большого числа агрегатов. Таким образом, несмотря на уменьшение количества полимеров белка Sup35, токсичность, вызванная сверхпродукцией белка Htt103-GFP на фоне делеции гена *DEF1*

сохраняется.

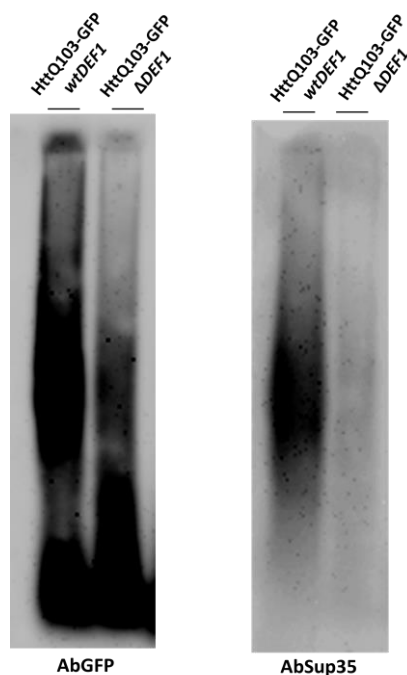


Рисунок 19. Делеция гена *DEF1* в штамме 74-D694 приводит к уменьшению количества полимеров белков HttQ103 и Sup35. Клетки дрожжей штамма 74-D694 дикого типа и с делецией гена *DEF1*, несущие плазмиду p103Q-GFP, выращивали так, как описано для рисунка 30. Затем клетки лизировали. Анализ полимеризации белков Htt103Q-GFP и Sup35 проводили с помощью SDD-AGE и иммуноблотинга. Покраску блотов производили с использованием антител к GFP-тэгу и NM-доменам белка Sup35.

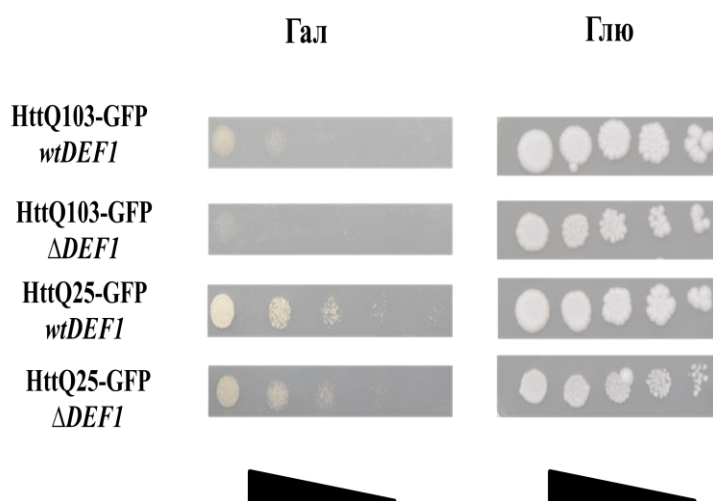


Рисунок 20. Делеция гена *DEF1* в штамме 74-D694 токсична для клеток дрожжей. Клетки штамма дрожжей 74-D694 дикого типа и с делецией гена *DEF1*, несущие плазмиды p103Q-GFP и p25Q-GFP, выращивали на селективной среде с глюкозой, переносили на селективную среду с раффинозой на 12 часов. Затем концентрацию клеток выравнивали до оптической плотности равной 0,5 при длине волны 600 нм и высевали клетки на чашки с галактозой и глюкозой. Предварительно делали 5 последовательных пятикратных разведений.

7. Истощение растворимой формы белков Sup35 и Sup45 не является причиной токсичности мутантного гентингина у штамма BY4742

У штамма 74-D694 токсичность HttQ103-GFP вызвана не только амилоидной агрегацией фактора терминации трансляции Sup35 и снижением уровня его растворимой формы, но и снижением количества растворимой формы его функционального партнера - белка Sup45, который включается в состав амилоидных полимеров Sup35. Это было доказано с помощью экспрессии неагрегирующей версии белка Sup35, лишенной амилоидогенного N-домена (Sup35C), вместо полноразмерного геномного Sup35, а также путем сверхпродукции белка Sup45. Эти белки снижают токсичность благодаря тому, что замена полноразмерного варианта белка Sup35 на его неполимеризующую форму Sup35C, лишенную NM-доменов, препятствует переходу белка в нерастворимую фракцию, вследствие чего сохраняется его нормальная функция, что ведет к нормальному росту клеток дрожжей. Экспрессия

дополнительной копии гена *SUP45* в клетках, продуцирующий мутантный гентингтин, в свою очередь компенсирует недостаток растворимого Sup45, что также ведет к частичному снятию токсичности. Таким образом, оба варианта эксперимента, приводили к снятию токсического эффекта белка HttQ103-GFP в штамме 74D-694 (Kochneva-Pervukhova *et al.*, PLoS One, 2012). Однако, как было описано выше, делеция гена *DEF1* в штамме BY4742 приводила к снятию токсичности мутантного гентингтина, не уменьшая количества амилоидных полимеров белка Sup35 и не влияя на уровень растворимого белка Sup35. Данное наблюдение говорит о том, что механизмы токсичности мутантного гентингтина различаются для разных штаммов. Чтобы дополнительно подтвердить наше предположение, мы одновременно сверхпродуцировали Sup35C и Sup45 в штамме BY4742, в котором экспрессировался мутантный гентингтин HttQ103-RFP. Оказалось, что сверхпродукция этих белков в штамме BY4742 не приводит к снятию токсичности HttQ103-RFP, в отличие от штамма 74-D694 (Рис. 21).

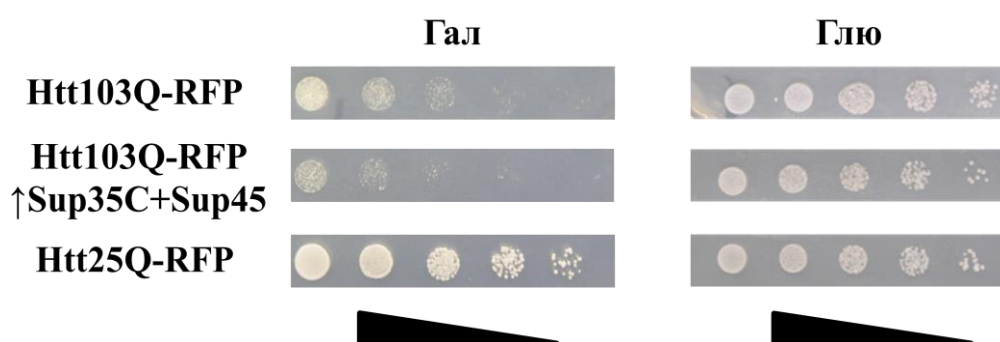


Рисунок 21. Одновременная сверхпродукция С-домена белка Sup35 и белка Sup45 не приводит к снятию токсичности, вызванной сверхэкспрессией гена мутантного гентингтина в штамме BY4742. Клетки дрожжей штамма BY4742, продуцирующие белок Htt103Q-RFP, трансформировали либо плазмидой, одновременно кодирующей последовательности С-домена белка Sup35 и белка Sup45, либо пустым вектором. Клетки штамма дрожжей BY4742, продуцирующие белок Htt25Q-RFP, использовали в качестве контроля. Индукцию синтеза рекомбинантных белков проводили в соответствии с описанной методикой. Нанесение клеток на твердую среду производили также, как описано для рисунка 20.

Эффект посредника в амилоидной кополимеризации и полимеризационные каскады

Данные, полученные в нашей работе, позволяют по-новому взглянуть на явление взаимозависимого возникновения амилоидов.

Переход белка Htt25Q-GFP в амилоидное состояние является необходимым для эффективной полимеризации белка Sup35 и некоторых других белков на матрицах амилоидов Htt25Q-GFP. В данном случае можно говорить о том, что белок Htt25Q-GFP играет роль посредника в передаче амилоидной конформации белку Sup35, так как сами по себе искусственные глутамин-богатые белки или амилоиды белка Rnq1 не вызывают токсического эффекта и не являются эффективными индукторами амилоидной полимеризации жизненно важного белка Sup35.

Только белки 85Q-NA и 131Q-NA индуцируют переход небольшого количества белка Sup35 в амилоидное состояние, и это не приводит к цитотоксичности. Токсический эффект и эффективная полимеризация Sup35 возникают только в присутствии Htt25Q-GFP. Полимеры белков Htt25Q-GFP и Sup35 имеют одинаковый размер, что является дополнительным

подтверждением того, что белок Htt25Q-GFP необходим для формирования конгломератов, содержащих большое количество полимеров белка Sup35.

Важно отметить, что возникновение амилоидов других белков может происходить на амилоидной матрице, состоящей из одного белка, что можно назвать параллельным возникновением, либо этот процесс может быть последовательным и многостадийным. В этом случае процесс образования амилоидов будет иметь вид полимеризационного каскада, представляющего собой сеть взаимозависимого возникновения амилоидов, в котором каждая последующая стадия появления амилоида строго зависит от наличия предыдущей.

В нашей работе мы доказали существование таких полимеризационных каскадов. Так, предсуществующие амилоиды polyQ/QX белков или прионные полимеры белка Rnq1 могут индуцировать полимеризацию белка Htt25Q-GFP, полимеры которого в свою очередь являются матрицами для возникновения амилоидных полимеров белка Sup35.

Мы предполагаем, что эффект посредника в передаче амилоидной конформации, показанный для белка Htt25Q-GFP, может быть широко распространен в природе, поскольку белки с доменами, предрасполагающими к агрегации, широко представлены в протеомах эукариотических организмов (Schaefer *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 2012).

Причины токсичности мутантного гентингтина различаются для разных штаммов дрожжей

Ранее в нашей и двух других лабораториях были независимо получены результаты, показывающие, что токсичность мутантного гентингтина Htt103Q в штамме 74D-694 связана с агрегацией фактора терминации трансляции Sup35, а также с истощением растворимой формы фактора терминации трансляции Sup45 в результате его включения в амилоидные агрегаты белка Sup35 (Kochneva-Pervukhova *et al.*, *PLoS One*, 2012; Zhao *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 2012; Gong H., *et al.*, *PLoS Genet.*, 2012). Важно отметить, что эти результаты были получены для штамма 74D-694, который является производным штамма GT81. Напротив, в данной работе мы показали, что даже несмотря на то, что полимеры мутантного гентингтина индуцируют переход белка Sup35 в амилоидное состояние в штамме BY4742, это не вызывает ингибирования роста клеток. Причиной, по которой эти два штамма могут по-разному реагировать на сверхпродукцию мутантного гентингтина и истощение активного пула мономерной формы Sup35, может быть различие в количестве растворимого Sup35, необходимого для жизни, а также разница в активности этого белка. То есть в штамме BY4742 могут присутствовать генетические модификации, которые способны компенсировать недостаток транскрипционных факторов или повышать их активность. По своему происхождению штаммы 74D-694 и GT81 отличаются от всех других штаммов, на которых проводились исследования токсических эффектов мутантного гентингтина Htt103Q. Большинство штаммов, используемых в данных исследованиях, являлись производными штамма S288C, а штамм 74D-694 был получен при помощи скрещивания штамма S288C и штамма из Петергофской коллекции, являющегося производным независимого дрожжевого изолята (Drozdova *et al.*, *PLoS One* 2016). Таким образом, так как в штамме BY4742 переход белка Sup35 в полимерное состояние в результате кополимеризации с амилоидами мутантного гентингтина не приводит к замедлению роста клеток, токсический эффект мутантного гентингтина может объясняться множеством других патологических процессов, возникающих вследствие сверхпродукции Htt103Q.

Все эти процессы могут присутствовать и в штамме 74D-694, так как истощение мономерных форм трансляционных факторов Sup35 и Sup45 не является единственным

источником токсичности мутантного гентингтина в этом штамме (Kochneva-Pervukhova *et al.*, PLoS One, 2012).

Штаммы 74D-694 и BY4742, используемые в данной работе имели фенотип [*PIN*⁺], то есть белок Rnq1 находился в прионной форме. Этот фенотип значительно усиливает полимеризацию и токсичность Htt103Q (Kochneva-Pervukhova *et al.*, PLoS One, 2012). Однако мы продемонстрировали, что полимеризация Htt103Q также зависит от белка Def1, который кополимеризуется с амилоидами Htt103Q в обоих штаммах: BY4742 и 74D-694 (Nizhnikov *et al.*, PLoS One, 2014). Стоит отметить, что в отличие от штамма 74D-694, делеция гена *DEF1* в штамме BY4742 уменьшала уровень ДСН-устойчивых полимеров Htt103Q, при этом, не влияя на количество ДСН-устойчивых полимеров белка Sup35. Таким образом, можно сделать вывод о том, что полимеры Htt103Q в штамме BY4742 с делецией гена *DEF1* обеспечивают более эффективную удельную полимеризацию Sup35, чем в штамме BY4742 дикого типа. Данный феномен может служить примером амилоидной интерференции, то есть конкуренции двух разных Q/N-богатых белков: Def1 и Sup35 за амилоидную матрицу полимеров Htt103Q.

Данные по причинам токсичности мутантного гентингтина в дрожжах трудно объединить, так как неясно, основан ли токсический эффект HttQ103 на единственном существующем механизме с разными вторичными проявлениями или же существуют несколько независимых патологических эффектов. Последнее могло бы означать, что разные дрожжевые штаммы могли бы по-разному реагировать на различные патологические эффекты мутантного гентингтина.

Полученные данные говорят о штаммовой специфичности механизмов токсичности мутантного гентингтина в дрожжевой модели и могут объяснить различия в чувствительности отдельных клеточных популяций к агрегации гентингтина при болезни Гентингтона.

Выводы:

1. Непатогенная форма гентингтина человека (Htt25Q-GFP) в присутствии амилоидов искусственных полиглутаминовых белков 120QY-НА, 76QY-НА, 131Q-НА, 101QT-НА и прионогенного белка Rnq1 при условии его сверхпродукции может образовывать амилоидные полимеры и вызывать токсичность в клетках дрожжей.
2. Токсичность амилоидных полимеров белка Htt25Q-GFP для клеток дрожжей связана с инактивацией жизненно важного фактора терминации трансляции Sup35 (eRF3) в результате его перехода в амилоидную форму, а также с уменьшением количества растворимой формы фактора терминации трансляции Sup45 (eRF1) вследствие его вовлечения в амилоидные агрегаты Sup35.
3. Обнаружена последовательная трехстадийная передача амилоидной укладки от одних амилоидов другим. Амилоиды искусственных полиглутаминовых белков, а также прионогенного белка Rnq1 при его сверхпродукции, инициируют переход белка Sup35 в амилоидное состояние, но не напрямую, а лишь через посредничество белка Htt25Q-GFP.
4. Показана асимметричная передача амилоидной укладки. Амилоидные полимеры белка Htt25Q-GFP индуцируют полимеризацию белка Sup35, однако наличие амилоидных полимеров белка Sup35 не приводит к образованию амилоидов белком Htt25Q-GFP.
5. Предложен механизм, объясняющий роль немутантных аллелей в патогенезе полиглутаминовых заболеваний. При отсутствии мутантной аллели гентингтина белковый

продукт немутантной аллели гена может быть посредником в передаче амилоидной укладки от каких-либо предсуществующих амилоидов полиглутаминовых или глутамин-богатых белков другим амилоидогенным белкам, приводя к нарушению их нормальных функций в клетке.

6. Причины токсичности сверхпродукции белка Htt103Q различаются для штаммов дрожжей 74-D694 и BY4742. В штамме 74-D694, в отличие от штамма BY4742, токсичность белка Htt103Q связана с инактивацией растворимых форм белков Sup35 и Sup45, в то время как в штамме BY4742 токсический эффект белка Htt103 связан с наличием гена Def1. Делеция гена *DEF1* замедляет рост клеток дрожжей штамма 74-D694, но не штамма BY4742.

Список публикаций по теме диссертации

Статьи в рецензируемых журналах:

1. Alexandrov A.I., Polyanskaya A.B., **Serpionov G.V.**, Ter-Avanesyan M.D., Kushnirov V.V. The effects of amino acid composition of glutamine-rich domains on amyloid formation and fragmentation. // **PLoS One**. 2012. Т. 7. №10. e46458.
2. **Serpionov G.V.**, Alexandrov A.I., Ter-Avanesyan M.D. A protein polymerization cascade mediates toxicity of non-pathological human huntingtin in yeast. // **Scientific reports**. 2015.5:18407.
3. Alexandrov A.I., **Serpionov G.V.**, Kushnirov V.V., Ter-Avanesyan M.D. Wild type huntingtin toxicity in yeast: implications for the role of amyloid cross-seeding in polyQ diseases. // **Prion**. 2016. Т. 10. №. 3. С. 221-227.
4. **Serpionov G.V.**, Alexandrov A.I., Ter-Avanesyan M.D. Distinct mechanisms of mutant huntingtin toxicity in different yeast strains. // **FEMS Yeast Research**. 2017. Т. 1. pii: fow 102.

Тезисы докладов на научных конференциях:

1. **Серпионов Г. В.**, Дергалёв А. А., Нижников А. А., Александров А. И. Взаимозависимость возникновения амилоидов: биологическое значение и роль в патогенезе заболеваний. // Конференция Ломоносов, Москва, Россия, 8-13 апреля, 2013. Материалы конференции. Секция Биология. С. 53 (устный доклад).
2. Alexandrov A., **Serpionov G.**, Dergalev A., Mitkevich O., Kochneva-Pervukhova N., Nizhnikov A., Galkin A.P. Interdependence of amyloid formation in yeast: significance for amyloid pathology. // 38th FEBS conference, Saint-Petersburg, Russia, July 6-11, 2013. Abstract book - p. 428 (постерный доклад).
3. Alexandrov A., **Serpionov G.**, Mitkevich O., Ter-Avanesyan M. Polyglutamine toxicity in yeast. // 26th International Conference on Yeast Genetics and Molecular Biology. 29 August - 3 September, 2013, Frankfurt/Main, Germany. Yeast, v.30, Supplement 1, p.S198 (постерный доклад).
4. **Serpionov G.**, Alexandrov A., Ter-Avanesyan M. A protein polymerization cascade mediates the toxicity of seeded amyloids of non-pathogenic huntingtin in yeast. // Prion. 2015. International Research Congress May 26-29, S74, p.120 (устный и постерный доклад).