

**Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
«Федеральный исследовательский центр  
«Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук»  
ФИЦ Биотехнологии РАН  
Институт биохимии имени А.Н. Баха**

*На правах рукописи*

**СЕРПИОНОВ ГЕНРИХ ВЛАДИМИРОВИЧ**

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

03.01.04 Биохимия

**Диссертация на соискание ученой степени**

**кандидата биологических наук**

Научный руководитель:

кандидат биологических наук  
Александров А. И.

Москва 2019

# Оглавление

<b>Список сокращений</b> .....	5
<b>Введение</b> .....	6
<b>Глава 1. Обзор литературы</b> .....	11
1.1. Амилоиды.....	11
1.2. Прионы. Прионные болезни.....	13
1.3. Прионы дрожжей.....	15
1.3.1 Прионы [ <i>PSI</i> <sup>+</sup> ] и [ <i>PIN</i> <sup>+</sup> ].....	20
1.4. Штаммовое разнообразие прионов.....	23
1.5. Фрагментация дрожжевых прионов .....	25
1.6. Амилоидозы .....	27
1.6.1. Нейродегенеративные локализованные амилоидозы не полиглутаминовой природы.....	29
1.6.2. Полиглутаминовые заболевания.....	32
1.7. Дрожжевая модель болезни Гентингтона .....	34
1.8. Взаимодействия между глутамин-богатыми белками. Кросс-сидинг.....	35
1.9. Детоксификация полимеров полиглутаминовых белков в результате белок-белковых взаимодействий.....	39
<b>Глава 2. Материалы и методы</b> .....	42
2.1. Культивирование клеток <i>S. cerevisiae</i> .....	42
2.2. Культивирование клеток <i>E. coli</i> .....	42
2.3. Выделение ДНК из <i>E. coli</i> .....	43
2.4. Выделение ДНК из дрожжей <i>S. cerevisiae</i> .....	43
2.5. Штаммы <i>S. Cerevisiae</i> .....	44
2.6. Трансформация плазмид в <i>S. cerevisiae</i> и <i>E. coli</i> .....	44
2.7. Конструирование плазмид и молекулярное клонирование.....	46
2.8. Приготовление и фракционирование дрожжевых лизатов .....	52
2.9. Исследование количеств растворимых форм белков при помощи ультрацентрифугирования.....	52

2.10. Белковый гель-электрофорез, иммуноблотинг.....	52
2.11. Спот тест для оценки жизнеспособности клеток дрожжей продуцирующих рекомбинантные белки .....	54
2.12. Измерение уровня интенсивности флуоресценции.....	54
<b>Глава 3. Результаты .....</b>	<b>56</b>
3.1. Продукция некоторых искусственных глутамин-богатых белков вместе с белком Htt25Q-GFP токсична для клеток дрожжей <i>S. cerevisiae</i> .....	56
3.2. Токсичность полимерной формы нормального гентингина Htt25Q-GFP не всегда зависит от наличия амилоидов Rnq1 .....	66
3.3. Делеция гена <i>HSP104</i> в штамме 74D-694 снимает токсический эффект, связанный с совместной продукцией белка Htt25Q-GFP с искусственными полиQ-белками .....	69
3.4. Сравнение размеров полимеров полиQ/QX белков, нормального гентингина Htt25Q-GFP и белка Sup35.....	73
3.5. Белок 25Q-RFP может переходить в агрегированное состояние и вызывать токсичность в присутствии амилоидов белка 120QY-НА.....	75
3.6. Агрегаты Htt25Q-RFP обнаруживаются с помощью флуоресцентной корреляционной спектроскопии (работа выполнена совместно с Ю.Н. Антоненко).....	76
3.7. Токсичность Htt25Q связана с истощением растворимых форм белков Sup35 и Sup45.....	79
3.8. Сверхпродукция прионного белка Rnq1 приводит к агрегации и токсичности белка Htt25Q-GFP в клетках с фенотипом [ <i>PIN</i> <sup>+</sup> ].....	86
3.9. Растворимый Htt25Q-GFP может проявлять токсичность в неоптимальных для роста условиях .....	90
3.10. Полимеры мутантного и нормального гентингина по-разному индуцируют полимеризацию глутамин богатых белков .....	96
<b>Механизмы токсичности гентингина отличаются для разных штаммов .....</b>	<b>100</b>
3.11. Делеция <i>DEF1</i> в штамме BY4742 уменьшает количество детергент-устойчивых агрегатов Htt103Q и снимает токсичность, при этом не оказывая влияния на количество полимеризованного белка Sup35 .....	100
3.12. Делеция <i>DEF1</i> в штамме 74-D694 уменьшает количество детергент-устойчивых агрегатов белков Htt103Q и Sup35, но не приводит к снятию токсического эффекта .....	105

3.13. Истощение растворимой формы белков Sup35 и Sup45 не является причиной токсичности мутантного гентингина у штамма BY4742 .....	107
<b>Глава 4. Обсуждение</b> .....	109
4.1. Белок Htt25Q-GFP может агрегировать и приводить к замедлению роста клеток дрожжей в присутствии амилоидов других белков .....	109
4.2. Эффект посредника в амилоидной кополимеризации и полимеризационные каскады .....	111
4.3. Молекулярные основы токсичности белка Htt25Q-GFP .....	114
4.4. Роль немутантных аллелей в патогенезе полиглутаминовых заболеваний. Взаимодействие между амилоидозами .....	115
4.5. Причины токсичности мутантного гентингина различаются для разных штаммов дрожжей.....	119
<b>Заключение</b> .....	122
<b>Благодарности</b> .....	123
<b>Список литературы</b> .....	124

## Список сокращений

GFP- зеленый флуоресцирующий белок (green fluorescent protein)

RFP- красный флуоресцирующий белок (red fluorescent protein)

АТ – антитела

ГуГх(GuHCl) – гидрохлорид гуанидина

Рис. – рисунок

ПААГ- полиакриламидный гель

ДСН-додecil сульфат натрия

SDD-AGE - агарозный форе́з в полуденатурирующих условиях (semi-denaturing detergent agarose gel electrophoresis)

PrP<sup>C</sup>- нормальная форма белка PrP

PrP<sup>Sc</sup>-патологическая форма белка PrP

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

nQX (например 120QY) – белок, имеющий N-концевой полиглутаминовый домен со вставками аминокислотных остатков X, приводящихся в однобуквенном коде. Число n, стоящее перед QX обозначает число остатков в этом домене.

PMSF – фенилметилсульфонил фторид, ингибитор сериновых протеаз

ТАЕ – буфер трис-ацетат-ЭДТА

TBS – трис-солевой буфер

Гал – галактоза

Глю – глюкоза

Htt103Q – белковый продукт первого экзона гена гентингина с полиглутаминовой областью, имеющей длину 103 аминокислотных остатка

Htt25Q - белковый продукт первого экзона гена гентингина с полиглутаминовой областью, имеющей длину 25 аминокислотных остатков

# Введение

## Актуальность проблемы

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  $\beta$ -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 гентингина 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 гентингина [1], 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.

## Цель исследования

Целью данной работы явилось изучение способности нормального гентингтина человека - белка 25Q-GFP к переходу в амилоидное состояние и его токсичности для клеток дрожжей, а также сравнение механизмов токсичности мутантного гентингтина человека, белка 103Q у двух разных штаммов дрожжей ВУ4742 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 гентингтина человека 103Q в штамме ВУ4742 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. Продемонстрировано, что в основе токсичности мутантного гентингтина 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 классические и современные 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.

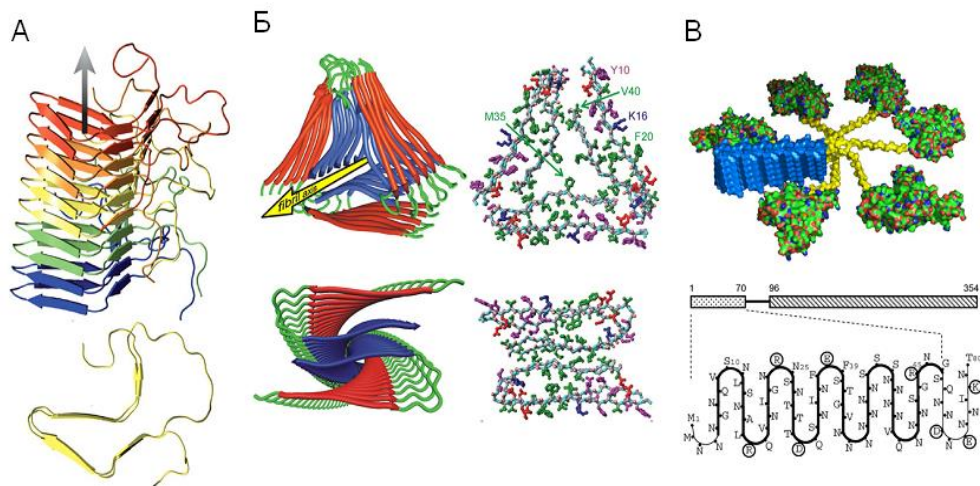
## **Объем и структура диссертации**

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.

# Глава 1. Обзор литературы

## 1.1. Амилоиды

Амилоиды - это фибриллярные белковые агрегаты, состоящие из белков, которые в норме растворимы. Амилоидогенные белки в растворимой форме обычно имеют слабоструктурированные или нестабильные участки и приобретение белком амилоидной конформации энергетически выгодно [2]. В результате автокаталитической нековалентной полимеризации молекулы амилоидогенного белка образуют иную структуру, обладающую высокой прочностью. Прочность этой структуры обусловлена образованием межмолекулярных  $\beta$ -слоев. В амилоидной фибрилле  $\beta$ -тяжи, формирующие  $\beta$ -слой, располагаются перпендикулярно оси фибриллы, а водородные связи, соединяющие молекулы белка, параллельно ее оси [3]. Такая организация амилоидной фибриллы носит название кросс- $\beta$ -структуры (Рис. 1). Амилоиды имеют ряд уникальных свойств, которые отличают их от других белковых агрегатов: они имеют повышенную устойчивость к действию протеаз и детергентов, в частности к обработке ДСН и саркозилем. Кроме того, отличительной особенностью амилоидных фибрилл является их способность связывать специфические красители. Например, они связываются с красителями Конго красным и тиофлавином Т [4]. Тиофлавин связывается с амилоидами более специфично, чем Конго красный, поскольку последний также может связывать белки, не находящиеся в амилоидной форме, например, цитратсинтазу, переменный домен легкой цепи иммуноглобулина, инсулин и ряд других [4, 5]. Несмотря на сходство формы, амилоидные фибриллы отличаются от актиновых филаментов и микротрубочек способностью к самопроизвольной полимеризации, то есть без участия молекул АТФ и ГТФ, как в живой клетке, так и *in vitro*.



**Рисунок 1. Различные варианты амилоидной структуры.** (А) Het-S *Podospora anserina*, мономеры уложены в  $\beta$ -спираль [6], (Б)  $A\beta(1-40)$  человека [7], (В) Ure 2 дрожжей, предполагаемая суперскладчатая  $\beta$ -структура [8].

Амилоиды были выявлены, как причина группы болезней человека, но также они могут быть неотъемлемой составляющей некоторых важных биологических механизмов. “Полезные” амилоиды обнаружены у широкого круга организмов - от бактерий до млекопитающих.

Так, например, белки гидрофобины (SC3 и др.) - небольшие гидрофобные белки базидиального гриба *Schizophyllum commune* образуют функциональные амилоиды, которые позволяют гифам гриба уменьшать поверхностное натяжение воды. Молекулы гидрофобина SC3 секретируются гифами *Schizophyllum commune* в водную среду и располагаются на границе раздела водной и воздушной фаз, где происходит объединение нескольких молекул белка с образованием амилоидной структуры. Это приводит к существенному снижению поверхностного натяжения поверхности воды, что позволяет гифам гриба преодолевать границу раздела фаз для формирования репродуктивных структур (находящихся в воздушной среде) [9].

Белки чаплины ChpA, ChpB и другие выполняют сходную функцию у актинобактерий *Streptomyces coelicolor*. Чаплины располагаются на поверхности спор и воздушных гиф *S. coelicolor* и образуют фибриллы, обогащенные  $\beta$ -слоями. Это придает гифам гидрофобные свойства, позволяя преодолевать границу раздела фаз, а также предотвращая склеивание гиф в воздушной среде [10, 11].

Другим примером жизненно важной функции амилоидов могут служить функциональные амилоиды хориона шелкопряда. Хорион - главный компонент оболочки яйца, защищающий

ооцит и формирующийся зародыш от неблагоприятных условий окружающей среды. На 95% своей сухой массы хорион состоит из белков, и некоторые из них, принадлежащие к А-классу белков хориона (сА белок), образуют амилоидную структуру [12].

Другим примером функциональных амилоидов может служить семейство РНК-связывающих белков, которые участвуют в процессах регуляции памяти. Первый из этих белков - АрСРЕВ (СРЕВ), глутамин/аспарагин-богатый белок, принимающий участие в формировании долговременной памяти у моллюска *Aplysia californica*. В основе долговременной памяти лежит синаптическая пластичность - способность синапсов к функциональным и морфологическим перестройкам, что в свою очередь обусловлено активацией трансляции ряда мРНК. Белок СРЕВ является трансляционным регулятором, стимулирующим полиаденилирование цитоплазматических мРНК, что активирует их трансляцию. При гетерологичной экспрессии данного белка в дрожжах *S. cerevisiae* было продемонстрировано, что именно агрегированная форма этого белка участвует в активации трансляции мРНК [13].

Другой представитель семейства белков СРЕВ, белок Orb2 организма *Drosophila melanogaster*, образует амилоидо-подобные олигомеры, которые располагаются в области синаптической мембраны. Было продемонстрировано, что точечные мутации в амилоидогенном домене белка Orb2, снижающие олигомеризацию Orb2, ухудшали долговременную память у *Drosophila melanogaster*. Делеция гена СРЕВ-1 у мышей также приводила к аналогичному эффекту [14]. Образование амилоидов также может служить причиной патологии, вызывая амилоидные, или конформационные заболевания человека и животных. Известно около 50 таких заболеваний: болезни Альцгеймера, Паркинсона, Гентингтона, Крейцфельда-Якоба, и др.

Существует ряд признаков, по которым можно классифицировать амилоидные болезни. Выделяют системные (поражается несколько тканей и органов) и локализованные (органоспецифические) амилоидные болезни, первичные (накопление амилоидов приводит к заболеванию) и вторичные (возникновение амилоидов связано с другим заболеванием) амилоидозы, неинфекционные и инфекционные, или прионные амилоидозы.

## **1.2. Прионы. Прионные болезни**

Согласно классическому определению, данному Стенли Прузинером в 1982 году, прионы это - инфекционные агенты, состоящие исключительно из белка (англ. prion – proteinaceous infectious particle). Прионы можно определить и как самовоспроизводящиеся белковые изоформы, способные, подобно нуклеиновым кислотам, “кодировать” информацию, которая

заклучена в пространственной структуре белка. Прионы являются причиной ряда неизлечимых нейродегенеративных заболеваний человека и животных.

Прионные заболевания, также известные как инфекционные спонгиозные энцефалопатии, относятся к конформационным заболеваниям и связаны с неправильным сворачиванием белка PrP<sup>C</sup> и переходом его в амилоидную инфекционную форму PrP<sup>Sc</sup>. Они могут возникать спонтанно или в результате инфекции [15]. К прионным болезням относятся бычья губчатая энцефалопатия, или коровье бешенство, скрэпи овец, болезни Крейтцфельдта-Якоба и Герстмана-Штраусслера-Шейнкера, семейная фатальная бессонница и куру. В отличие от остальных инфекционных заболеваний, вызываемых вирусами и патогенными микроорганизмами, причиной прионных болезней является попадание в организм или спонтанное возникновение в организме особой прионной формы белка PrP. Таким образом, инфекционный агент, вызывающий прионное заболевание, не содержит нуклеиновой кислоты и состоит исключительно из белка. Вследствие этого, прионы отличаются повышенной устойчивостью к инактивирующим воздействиям, таким как автоклавирование (121°C, 20 мин) и обработка ультрафиолетовым излучением, а также обработка формальдегидом. Обработка 70% этанолом, эффективным против бактерий и вирусов, также не оказывает дезинфицирующего воздействия на прионы. Для инактивации прионных частиц разработано несколько методов: автоклавирование в жестких условиях, обработка щелочью (1 Н NaOH, 20°C, 1 час), ДСН (30%, 100°C, 10 мин), или гипохлоридом натрия (2%, 20°C, 1 мин) [16].

Ортологи гена PRNP белка PrP обнаружены у большого числа видов животных [15]. PrP<sup>C</sup> - это гликозилированный белок, состоящий из 209 аминокислотных остатков. После синтеза в цитоплазме PrP транспортируется к плазматической мембране клетки через ЭПР и комплекс Гольджи. В нервных клетках белок PrP сконцентрирован в участках плазматической мембраны, обогащенных липидами (кавеолино-подобные домены), встраиваясь в плазматическую мембрану с помощью гликозилфосфатидилинозитольного якоря. Однако некоторая часть белка выходит во внеклеточное пространство [15, 17, 18]. В исследованиях с использованием различных генетических линий мышей было продемонстрировано, что делеция PrP не оказывает существенного влияния на поведение и физиологические процессы [19, 20, 21]. Однако изучение поведения этого белка в различных экспериментальных модельных системах позволило выявить ряд возможных функций PrP<sup>C</sup>. Белок PrP<sup>C</sup> принимает участие в активации лимфоцитов [22], синаптической пластичности [23], нейропротекции [24].

PrP<sup>C</sup> связывает медь, и поэтому участвует в процессах метаболизма меди [25]. Вероятно, белок PrP<sup>C</sup> принимает участие в дифференциации и пролиферации стволовых нервных клеток [26], а также в процессах обновления гематопозитических стволовых клеток [27].

Причины патогенеза, связанные с конформационным переходом PrP<sup>C</sup> → PrP<sup>Sc</sup> до сих пор не вполне ясны. В результате прионного перехода нормальной формы белка PrP<sup>C</sup> в патологическую PrP<sup>Sc</sup>, вызванного прионной инфекцией, мутациями в гене *PRNP* или другими неизвестными причинами, происходит накопление амилоидов PrP<sup>Sc</sup> в нервных клетках головного мозга [28]. Однако остается неясным, как именно наличие патологической формы PrP<sup>Sc</sup> связано с нейродегенеративными процессами, такими как нейротоксичность, клеточный стресс и клеточная смерть. Результаты, полученные в ряде исследований, позволяют предполагать, что PrP<sup>Sc</sup> может напрямую вызывать токсические эффекты в нервных клетках или опосредованно через клетки глии. В последнем случае патологическая форма белка PrP может запускать каскады реакций, ведущих к апоптозу нейронов [29, 30]. В то же время, утрата нормальной функции PrP в результате его амилоидизации может приводить к нарушению передачи различных сигналов [31, 32] и в итоге вызывать слабый токсический эффект, который вносит свой вклад в процессы патогенеза, связанные с накоплением PrP<sup>Sc</sup>.

### 1.3. Прионы дрожжей

Фактор [*PSI*<sup>+</sup>] был обнаружен Брайаном Коксом в 1965 году. Согласно его наблюдениям, [*PSI*<sup>+</sup>] был доминантен и имел не-менделевский тип наследования. Наличие этого фактора в клетке проявлялось в супрессии нонсенс мутаций [33].

Исследуя метаболизм азота у дрожжей, Франсуа Лакру в 1971 описал еще один не-менделевски наследуемый детерминант [*URE3*]. Исследования основывались на том, что в присутствии ионов аммония клетки дрожжей теряют способность метаболизировать уреидосукцинат. Однако наличие мутаций в гене *Ure2* или наличие детерминанта [*URE3*] восстанавливают эту способность [34].

В 1994 году Рид Викнер предположил, что открытые ранее неменделевски-наследуемые элементы [*URE3*] и [*PSI*<sup>+</sup>], представляют собой прионные формы белков *Ure2* и *Sup35*, соответственно. Эта революционная гипотеза позволила объяснить, почему фенотипы [*URE3*] и [*PSI*<sup>+</sup>] сходны по фенотипическому проявлению с "мутациями потери функции" в генах *URE2* или *SUP35*. Им были сформулированы генетические критерии, обуславливающие природу прионов дрожжей [*URE3*] и [*PSI*<sup>+</sup>], а именно: [*URE3*] и [*PSI*<sup>+</sup>] наследуются с цитоплазмой, наследование [*URE3*] и [*PSI*<sup>+</sup>] требует наличия прионных доменов белков *Ure2* и *Sup35*, потеря фенотипов [*URE3*] и [*PSI*<sup>+</sup>] обратима (прионогенный белок может самопроизвольно переходить в прионную форму), временная сверхпродукция белков *Ure2* или *Sup35* индуцирует *de novo* возникновение прионов [*URE3*] и [*PSI*<sup>+</sup>] [35].

В дальнейшем было открыто еще 8 дрожжевых прионов, в частности детерминант [*Prn<sup>+</sup>*], участвующий в возникновении прионов и амилоидов других белков, о котором будет сказано ниже (Таблица 1) [111].



Таблица 1. Прионы дрожжей и гриба *Podospora anserina*

Белок	Организм-хозяин	Нормальная функция	Прион	Прионный фенотип	Ссылка
Sup35	<i>S. cerevisiae</i>	Фактор терминации трансляции	[ <i>PSI</i> <sup>+</sup> ]	Супрессия нонсенс мутаций	[36]
Rnq1	<i>S. cerevisiae</i>	Функция неизвестна	[ <i>PIN</i> <sup>+</sup> ]	Инициация агрегации других амилоидогенных белков	[37]
Ure2	<i>S. cerevisiae</i>	Репрессор катаболизма азота	[ <i>URE3</i> ]	Рост на средах с альтернативными источниками азота	[35]
Mot3	<i>S. cerevisiae</i>	Транскрипционный фактор	[ <i>MOT3</i> <sup>+</sup> ]	Транскрипционная дерепрессия генов анаэробного метаболизма	[38]
Mod5	<i>S. cerevisiae</i>	тРНК изопентенилизомераза	[ <i>MOD</i> <sup>+</sup> ]	Чувствительность к 5-фтор урацилу, устойчивость к противогрибковым препаратам	[39]
Cyc8	<i>S. cerevisiae</i>	Транскрипционный репрессор	[ <i>OCT</i> <sup>+</sup> ]	Транскрипционная дерепрессия многих генов	[40]
Swi1	<i>S. cerevisiae</i>	Фактор ремоделирования хроматина	[ <i>SWI</i> <sup>+</sup> ]	Неспособность метаболизировать некоторые простые сахара	[41]
HET-S	<i>Podospora anserina</i>	Контроль несовместимости гетерокариона	[ <i>HET-s</i> ]	Программированная гибель несовместимых штаммов	[42]
Rnq1+ Swi1	<i>S. cerevisiae</i>	Неизвестна	[ <i>NSI</i> <sup>+</sup> ]	Трансляционная супрессия	[43]
Pma, Std1	<i>S. cerevisiae</i>	Pma1 – протонная помпа; Std1 – неизвестна	[ <i>GAR</i> <sup>+</sup> ]	Потребление глицерола в присутствии глюкозамина	[44]
[ $\beta$ ]	<i>S. cerevisiae</i>	Вакуолярная протеиназа	Prb1	Деградация белков	[45]

На сегодняшний день можно предполагать два основных механизма возникновения фенотипов, связанных с амилоидной агрегацией белков, в частности прионогенных белков дрожжей. Фенотип может возникать либо в результате уменьшения исходной функции белка в результате его перехода в амилоидное состояние, либо в результате приобретения амилоидом новой функции. Большинство прионных фенотипов в дрожжевых клетках возникает в результате потери функции соответствующим белком.

Такой механизм реализуется в случаях дрожжевых прионогенных белков Ure2, Swi1, Cys8, Mot3, Sfp1. Фенотипы, возникающие при переходе данных белков в амилоидное состояние, сходны с фенотипами, возникающими при делеции соответствующих генов. Кроме того, в работе Pezza на примере белка Sup35 показано, что мономерный белок, входящий в состав амилоидной фибриллы, способен сохранять свою нормальную функцию даже в составе амилоида. Таким образом, происходит лишь частичная потеря функции мономерного белка [46].

Большинство прионов имеет амилоидную структуру, однако встречаются неамилоидные наследуемые белковые конформации. Так, например, Ярош с соавторами продемонстрировали, что временная сверхпродукция ряда белков приводила к появлению наследуемых фенотипов, многие из которых могли иметь адаптивное значение. В частности, сверхпродукция Psp1 улучшала рост клеток в условиях низкого pH (pH 4) и осмотического стресса, сверхпродукция Bud2 приводила к улучшенному росту в присутствии 5% этанола. Всего было обнаружено около 9 белков, сверхпродукция которых увеличивала скорость роста дрожжевых клеток в условиях стресса и 1 белок, сверхпродукция которого вызывала цитостатический эффект. Все обнаруженные фенотипы наследовались с цитоплазмой, и были обусловлены прионной неамилоидной конформацией соответствующих белков [47]. Механизм такого неамилоидного наследования пока неясен.

Еще один необычный прионный детерминант [ $GAR^+$ ], не имеющий амилоидной структуры, был описан Braun с соавторами. Он представляет собой олигомерный комплекс, состоящий из двух белков: Std1-белка участвующего в сигналинге, связанном с присутствием глюкозы в среде, и белка Pma1 H<sup>+</sup>-АТФ-азы Р-типа. Обнаружение [ $GAR^+$ ] произошло благодаря исследованиям Vall с соавторами [48].

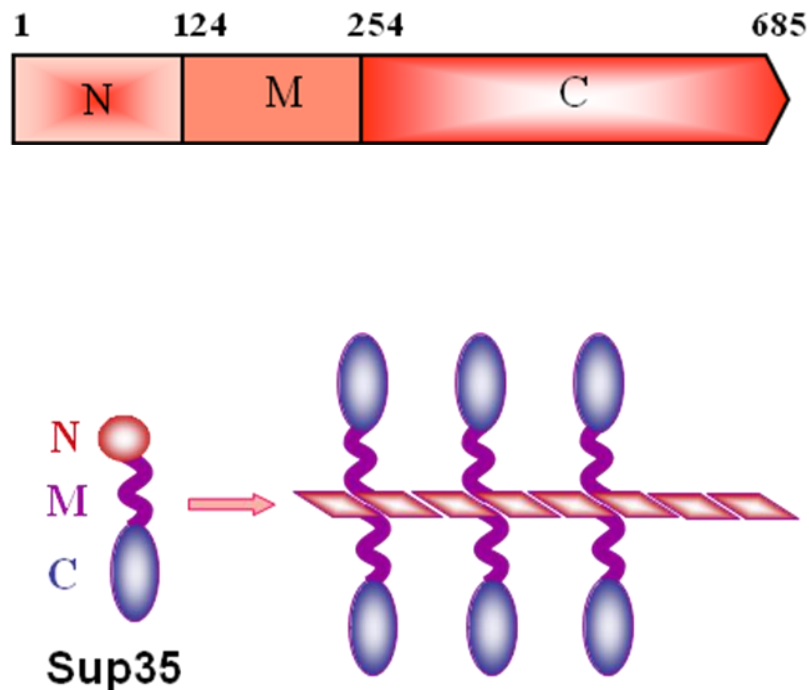
Исследования были основаны на том, что дрожжевые клетки *S. cerevisiae* не растут на среде с глицеролом в присутствии глюкозы. Если глюкоза содержится в питательной среде, происходит репрессия метаболических путей, необходимых для усвоения альтернативных источников углерода, в частности глицерола. Сходным действием обладает неметаболизируемый аналог глюкозы - D-(+)-глюкозамин. В присутствии последнего клетки теряют способность расти на среде с глицеролом.

Были обнаружены мутанты, у которых спонтанно возникала способность усваивать глицерол, из среды, содержащей глюкозамин. Braun показала, что данный фенотип имеет менделевский тип наследования, не связан с митохондриальной или плазмидной ДНК и передается с цитоплазмой. Впоследствии было выявлено, что данный фенотип обусловлен наличием приона [*GAR*<sup>+</sup>] [44].

Рид Викнер описал прион  $\beta$ , который представляет собой форму протеазы В, участвующую в собственной активации. Прион  $\beta$  является инфекционным, обратимо излечимым, и его возникновение *de novo* индуцируется при его сверхпродукции [45].

### 1.3.1 Прионы [*PSI*<sup>+</sup>] и [*PIN*<sup>+</sup>]

[*PSI*<sup>+</sup>] является наиболее исследованным дрожжевым прионом. Он возникает в результате перехода белка Sup35 (фактор терминации трансляции eRF3) в прионное состояние. Sup35 – жизненно-важный белок, принимающий участие в терминации трансляции, где он стимулирует гидролиз пептидил-тРНК в Р-сайте рибосомы. Он имеет трехдоменную структуру, представленную на рисунке (Рис. 2).



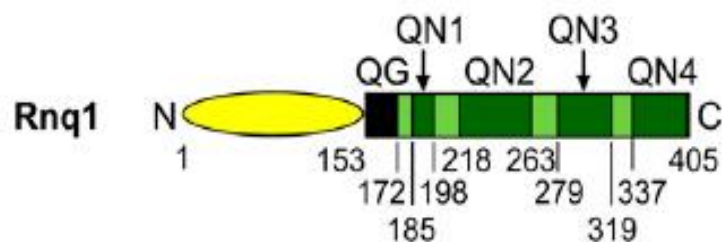
**Рисунок 2.** Доменная структура белка Sup35.

N-концевой домен Sup35 обогащен остатками аспарагина и глутамина. Этот домен неструктурирован, и он необходим для поддержания прионного состояния Sup35 [49]. M-домен находится между N-доменом и функциональным C-доменом. Его функция неизвестна, возможно, он является пространственным разделителем (спейсером) N и C доменов. Также в начале M домена находится сайт связывания с шапероном Hsp104, важный для фрагментации приона [50]. C-концевой домен является ГТФ-азой, подобной фактору элонгации трансляции EF-1A. Следует отметить, что белок Sup35 осуществляет процесс терминации трансляции вместе со своим функциональным партнером - белком Sup45 (eRF1), который распознает нонсенс кодоны [51].

Для фенотипической детекции приона [ $PSI^+$ ] обычно используют систему, основанную на нонсенс мутациях в генах  $ADE1$  или  $ADE2$ . Гены  $ADE1$  и  $ADE2$  кодируют АИР-карбоксилазу и САИКАР-карбоксилазу [52] соответственно - ферменты, участвующие в биосинтезе аденина. Мутации в этих генах приводят к образованию преждевременного стоп-кодона, в результате чего прекращается синтез аденина, и происходит накопление красного пигмента - промежуточного метаболита. Клетки, несущие такие мутации, неспособны расти на среде без аденина.

На фоне адениновых мутаций [ $PSI^+$ ] клетки дрожжей образуют колонии белого цвета, а [ $psi^-$ ] – красного. Это объясняется тем, что при переходе в прионное состояние функциональная активность белка Sup35 существенно падает, что снижает его функцию в терминации трансляции. Данный эффект сходен с мутациями “потери функции” в гене  $SUP35$ , поскольку в дрожжевых клетках, имеющих [ $PSI^+$ ]-детерминант, значительная часть белка Sup35 находится в агрегированном состоянии и не может эффективно выполнять свою функцию. В результате этого рибосома с некоторой вероятностью не завершает синтез полипептидной цепи на преждевременном стоп кодоне, что позволяет произвести полную трансляцию мутантных генов биосинтеза аденина. Поэтому клетки, имеющие [ $PSI^+$ ], белого цвета и могут расти на среде без аденина. В свою очередь, клетки дрожжей с фенотипом [ $psi^-$ ] - красного цвета и не способны расти на среде без аденина [33].

Необходимым условием возникновения [ $PSI^+$ ] *de novo* является присутствие эпигенетического элемента, названного [ $PIN^+$ ] ( $[PSI^+]$ -inducibility) [53]. Детерминант [ $PIN^+$ ], или [ $RNQ1^+$ ] обусловлен наличием прионных полимеров белка Rnq1. Данный белок содержит С-концевой прионный домен, который, как и в случае белка Sup35, обогащен остатками глутамина и аспарагина. Внутри этого домена находятся четыре отдельные глутамин/аспарагин-богатые области [54] (Рис. 3).



**Рисунок 3.** Доменная структура и строение прионогенного домена белка Rnq1.

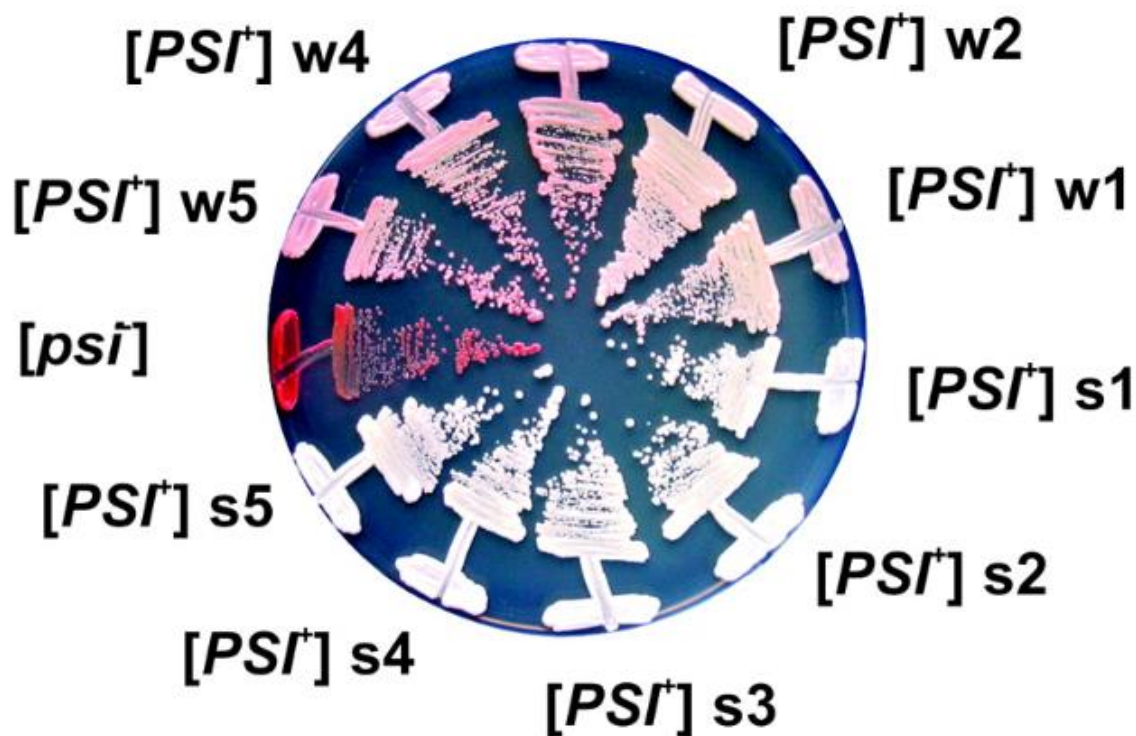
Функция белка Rnq1 неизвестна, однако его прионная форма - детерминант [*PIN*<sup>+</sup>] облегчает прионобразование в клетках дрожжей. Способностью облегчать возникновение [*PST*<sup>+</sup>] обладают также фибриллы [*URE3*], и, вероятно, другие прионы [37]. Процесс, при котором амилоидные полимеры одного белка могут индуцировать прионобразование или амилоидную полимеризацию другого белка, носит название перекрестного затравления амилоидной полимеризации, или кросс-сидинга. В литературе также используется термин - гетерологичное затравление амилоидной полимеризации. Можно предполагать, что эффективность затравления определяется степенью соответствия полимерной матрицы и мономерного субстрата. Этим объясняется сравнительно небольшая частота возникновения [*PST*<sup>+</sup>] в клетках [*PIN*<sup>+</sup>] ( $1/10^5$ - $1/10^4$  клеток) [53].

## 1.4. Штаммовое разнообразие прионов

На сегодняшний день известно, что агрегация одного и того же белка PrP может приводить к разным патологическим фенотипам: различиям в инкубационных периодах заболеваний, их клинических проявлениях, а также паттернах поражения мозга. Данные фенотипы в равной мере могут передаваться от клетки к клетке в процессе деления или в результате инфекции.

Наличие прионных вариантов было также показано для дрожжевого приона [ $PSI^+$ ] [55]. Прионное состояние Sup35 может иметь различную выраженность фенотипических проявлений (различия в цвете дрожжевых колоний и в размере прионных фибрилл). Это связано с тем, что прионные фибриллы белка Sup35 могут с разной эффективностью катализировать переход мономерного белка Sup35 в полимерное состояние. Эффективность выше у так называемых сильных вариантов приона [ $PSI^+$ ], и ниже - у слабых. Это объясняется тем, что сильные варианты [ $PSI^+$ ] лучше фрагментируются шаперонами, о чем будет подробно написано ниже. В результате этого количество полимеров, а, следовательно, и свободных концов, у сильных вариантов больше, чем у слабых вариантов [ $PSI^+$ ]. Поэтому полимеризация Sup35 в клетках, несущих сильные варианты [ $PSI^+$ ], происходит с большей эффективностью, чем у слабых.

Переход большей части белка Sup35 в прионное состояние ведет к супрессии терминации трансляции, поэтому дрожжевые колонии, несущие нонсенс мутации в генах, ответственных за биосинтез аденина имеют белый цвет колоний и отличаются высокой скоростью роста на среде без аденина. И, наоборот, слабые варианты [ $PSI^+$ ] характеризуются большим, по сравнению с сильными вариантами, количеством растворимой формы белка Sup35, что ведет к снижению супрессии терминации трансляции, вследствие чего колонии имеют розовый цвет и гораздо медленнее растут на среде без аденина (Рисунок) [56, 57] (Рис. 4).



**Рисунок 4.** Варианты дрожжевого приона  $[PSI^+]$ , S-сильные варианты, W-слабые [58].

Как уже было отмечено, прионные фибриллы разных по силе вариантов  $[PSI^+]$  фрагментируются с разной эффективностью. Различия во фрагментационных свойствах объясняется существованием различных укладок мономерного Sup35 в составе прионного полимера [59, 60]. Стоит отметить, что более высокая эффективность фрагментации у сильных вариантов вероятно связана с меньшим размером амилоидного кора: количество экспонированных незадействованных в образовании кросс- $\beta$  слоя аминокислот, в частности тирозинов, больше, что делает прионные фибриллы сильных вариантов более заметными для шаперонов. Другие авторы предполагают, что фрагментация сильных вариантов облегчена, поскольку они обладают меньшей механической прочностью [61].

Было показано, что при скрещивании дрожжевых клеток, содержащих разные варианты одного приона, в потомстве обнаруживается более сильный вариант. Это связано с тем, что сильные варианты реплицируются с большей скоростью по сравнению со слабыми вариантами [61, 62]. В работе Shorter было показано, что сильные варианты  $[PSI^+]$  могут спонтанно возникать в дрожжевых клетках, содержащих слабые варианты  $[PSI^+]$  [63].

Существуют также работы описывающие варианты других дрожжевых прионов  $[PIN^+]$  [62] и  $[URE3]$  [64].



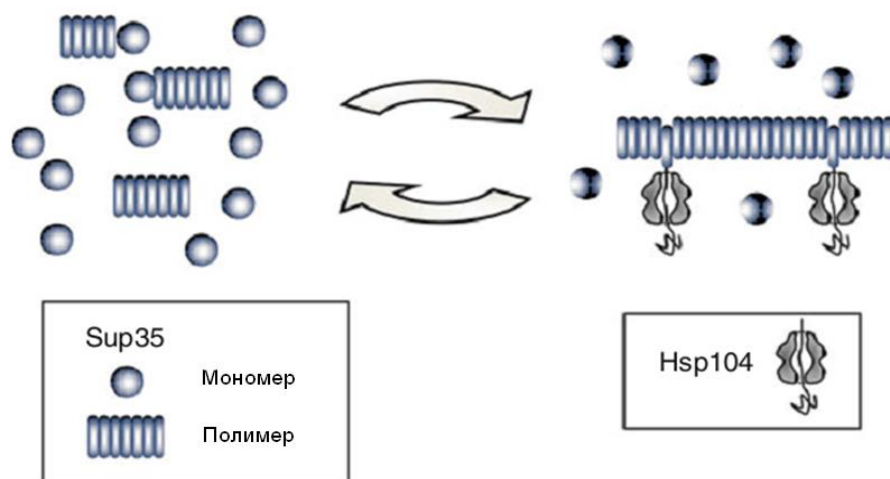
## 1.5. Фрагментация дрожжевых прионов

Основным свойством прионов, в частности прионов дрожжей, является их способность стабильно поддерживаться в делящихся клетках. Это означает, что количество прионных единиц в материнской и дочерних клетках должно быть сопоставимо, следовательно, количество прионных частиц должно увеличиваться в ходе клеточного цикла. Для размножения, или репликации дрожжевых прионов необходимы шапероны, среди которых ключевую роль играет шаперон Hsp104.

Дрожжевой шаперон Hsp104 представляет собой гексамерную двойную АТФ-азу класса ААА, принадлежащую к семейству белков Hsp100/ClpВ. Белки этого семейства обнаружены у растений, бактерий и грибов, но не выявлены у животных.

Белки Hsp100/ClpВ способны связывать неправильно свернутые полипептидные цепи [65] и основной их функцией в клетке является растворение белковых агрегатов, в частности, образованных в результате стресса, до мономерных единиц с использованием энергии АТФ [66].

В 1998 Кушников и Тер-Аванесян предложили, а в 2003 Крындушкин с соавторами экспериментально доказали, что шаперон Hsp104 требуется для поддержания большинства дрожжевых прионов, в частности приона [*PSI*<sup>+</sup>] [67, 68].



**Рисунок 5. Репликация приона [*PSI*<sup>+</sup>].** Полимеры удлиняются путем автокаталитической полимеризации, увеличение числа полимеров происходит за счет их фрагментации шапероном Hsp104 [68].

Прионные частицы большинства дрожжевых прионов представляют собой амилоидные фибриллы. Шаперон Hsp104 фрагментирует прионные частицы, извлекая из них отдельные молекулы белка, путем протягивания этих молекул через свою центральную пору [69].

В результате фрагментации прионных фибрилл с помощью шаперона Hsp104 происходит увеличение их количества, что ведет к появлению дополнительных концов для полимеризации мономерной формы белка. Очевидно, что рост прионных полимеров происходит за счет присоединения мономерных молекул к концам фибриллы. Таким образом, эффективность перехода молекул мономера в прионное состояние будет пропорциональна общему количеству свободных концов полимерного вещества.

Увеличение количества прионных частиц в результате фрагментации и дальнейшей эффективной полимеризации увеличивает вероятность попадания приона в дочерние клетки при делении, позволяя ему стабильно наследоваться.

Можно предположить, что шаперон Hsp104 также способен разбирать крупные агрегаты на более мелкие или на отдельные фибриллы, что, в свою очередь, также облегчает их попадание в дочерние клетки при делении.

Инактивация гена *HSP104*, а также ингибирование этого шаперона с помощью гидрохлорида гуанидина (GuHCl) приводят к потере прионов дрожжей. Это происходит из-за того, что полимеры перестают фрагментироваться, поэтому их число остается постоянным, и при увеличении числа клеток это приводит к тому, что доля клеток с полимерами падает. Кроме того, крупные полимеры малоподвижны в клетке, и поэтому будут оставаться в материнских клетках, которые рано или поздно перестают делиться и умирают.

Эффективность фрагментации зависит от аминокислотного состава прион-образующего домена. В работах [70, 110] была изучена фрагментация полимеров химерных полиглутаминовых белков polyQ-МС, которые состояли из МС-домена белка Sup35 и полиглутаминового тракта с вкраплениями изучаемых аминокислотных остатков в каждом пятом положении. Было показано, что полимеры, состоящие из белков со вставкой ароматических аминокислот, в частности тирозина и триптофана, хорошо фрагментируются шапероном Hsp104. В тоже время известно, что вставка глицина, аргинина, глутаминовой кислоты, пролина и лейцина в каждое пятое положение полиглутаминового тракта амилоидообразующего белка препятствует его переходу в агрегированное состояние.

Понимание процессов лежащих в основе увеличения количества прионных и амилоидных частиц имеет большое значение, так как существует множество болезней, связанных с неправильным сворачиванием белков – конформационных болезней.

## 1.6. Амилоидозы

В настоящее время известно более 50 заболеваний, связанных с неправильным сворачиванием белков, что во многих случаях приводит к возникновению амилоидных агрегатов этих белков [2, 71, 72]. Заболевания, сопровождающиеся образованием амилоидных фибрилл, или амилоидов, называют амилоидозами.

Амилоидозы условно можно разделить на две группы: локализованные в одной ткани и системные, возникающие в одной ткани, но затем распространяющиеся в другие ткани и органы. Стоит отметить, что все классификации амилоидных заболеваний весьма условны, и в настоящее время не имеют строго очерченных границ.

К локализованным амилоидозам, поражающим только одну ткань можно отнести некоторые нейродегенеративные заболевания человека (например, болезни Альцгеймера, Паркинсона, Гентингтона) [73, 74].

Существует исторически сложившаяся классификация системных амилоидозов, которая разделяет все системные амилоидные болезни на первичные, вторичные, и прочие (например, наследственные), не относящиеся к первым двум группам. Первичные амилоидозы – это группа конформационных заболеваний, возникновение которых не связано с каким-либо другим сопутствующим заболеванием. К этой группе заболеваний относятся амилоидозы, возникающие в результате агрегации легкой или тяжелой цепи иммуноглобулинов: AL-, АН-амилоидозы (AL, АН-амилоидогенные белки). Наиболее изученным заболеванием этого типа является AL-амилоидоз. Данное заболевание является одним из самых распространенных системных амилоидозов, регистрируемых в развитых странах. Средний возраст пациентов, у которых находят данное заболевание, - 65 лет. Клинические проявления AL-амилоидоза разнообразны, так как при нем поражаются различные органы и ткани, однако наиболее часто встречаются патологии почек и сердца. Наиболее распространенными начальными симптомами являются астения и одышка, но ввиду того, что данные симптомы неспецифичны, постановка диагноза может быть затруднена.

Поражение почек регистрируется почти у 70 процентов заболевших и характеризуется тяжелой протеинурией, нефротоксическим синдромом и общим нарушением функции почек. Сердечные патологии, вызванные AL-амилоидозом, встречаются у 50 процентов больных. Самой серьезной из них является рестриктивная кардиомиопатия, характеризующаяся выраженным снижением растяжимости мышцы сердца [75, 76].

Несмотря на то, что AL-амилоидоз относят к первичным амилоидозам, было показано, что агрегация легких цепей иммуноглобулина может быть сопряжена с множественной миеломой [77].

Вторичные амилоидозы возникают в ответ на хроническую инфекцию или воспалительный процесс, например, в результате ревматоидного артрита, семейной средиземноморской лихорадки, остеомиелита или гранулематозного илеита. Одним из наиболее изученных вторичных амилоидных заболеваний является АА-амилоидоз. Данное заболевание связано с переходом в амилоидное состояние сывороточного белка SAA, вовлекаемого в амилоидные агрегаты и образующего так называемый амилоид А. Показано, что амилоид А формируется за счет N-концевого участка белка SAA [78, 79]. Белок SAA является сывороточным аполилопротеином, относящимся к “белкам острой фазы”. Белки, относящиеся к этой группе, продуцируются в ответ на различные воспалительные процессы. Белок SAA синтезируется гепатоцитами, и этот процесс запускается при помощи следующих веществ: цитокины участвующие в противовоспалительных реакциях, такие как интерлейкин-1 (IL1), IL-6 и фактор некроза опухоли (TNF) альфа [80].

Наиболее ранним и самым частым клиническим проявлением АА-амилоидоза является протеинурия, ведущая к нефротическому синдрому и почечной недостаточности. В дальнейшем могут поражаться печень, селезенка и желудок.

Еще одну группу амилоидозов составляют так называемые наследственные амилоидозы, возникающие в результате мутаций в различных генах, обуславливающих аминокислотные замены в соответствующих белках. Данные аминокислотные замены приводят к тому, что белок приобретает способность к амилоидной агрегации. К амилоидным заболеваниям этого типа относятся патологии, связанные с точечными мутациями в белках: лизоциме, являющимся антибактериальным ферментом и транстиретине – гомотетрамерном белке, обеспечивающим транспорт тироксина и ретинола [78], а также целая группа полиглутаминовых амилоидозов, о которой будет сказано ниже.

### 1.6.1. Нейродегенеративные локализованные амилоидозы не полиглутаминовой природы

К данной группе заболеваний относятся патологии центральной нервной системы связанные с образованием амилоидных агрегатов.

Одним из таких заболеваний является амиотрофический латеральный склероз. Это неизлечимое конформационное заболевание, характеризующееся быстрым прогрессированием общей слабости организма и мышечным истощением, что приводит к параличу и смерти вследствие дыхательной недостаточности в течение от 1 до 5 лет от начала болезни [81, 82].

Амиотрофический латеральный склероз возникает в результате гибели моторных нейронов в головном и спинном мозге, а также клеток глиии вследствие патологических процессов, связанных с переходом в агрегированное состояние ряда белков.

Главным компонентом амилоидных агрегатов, которые образуются в процессе развития данной болезни, является белок TDP-43. TDP-43 является ДНК-, РНК-связывающим белком, имеющим С-концевой амилоидогенный домен, обогащенный остатками глицина [83, 84]. TDP-43 локализуется в ядре, где принимает участие в регуляции сплайсинга и стабилизации молекул мРНК [85, 86]. В дегенерирующих нейронах и глиальных клетках у больных амиотрофическим латеральным склерозом этот белок не обнаруживается в ядре, но в больших количествах обнаруживается в цитоплазме, образуя крупные агрегаты. В данный момент установлено около 30 мутаций в гене *TARDBP*, которые встречаются у пациентов со спорадическими и наследственными формами амиотрофического латерального склероза [85].

Другим компонентом цитоплазматических амилоидных агрегатов является белок FUS. Мутации в гене, кодирующем данный белок, обнаружены у пациентов, страдающих как спорадической, так и наследственной формой амиотрофического латерального склероза. Как и TDP-43, FUS является ДНК-, РНК-связывающим ядерным белком, который принимает участие в репарации ДНК, транскрипции, альтернативном сплайсинге, а также транспорте РНК из ядра в цитоплазму, поэтому инактивация этого белка в результате его вовлечения в амилоидные агрегаты может быть токсична для нейронов [87].

Было показано, что точечные мутации в гене, кодирующем белок FUS, приводят к его накоплению в цитоплазме. Интересно, что амилоидные агрегаты TDP-43 не содержат в своем составе белка FUS, а агрегаты белка FUS не содержат белка TDP-43 [88].

Наиболее известными и изученными амилоидозами, которые можно отнести к локализованным нейродегенеративным амилоидозам, являются болезни Альцгеймера и Паркинсона.

Болезнь Альцгеймера имеет наследственную и спорадическую этиологию, характеризуется постепенным и малозаметным началом в преклонном возрасте, неуклонным прогрессирующим расстройством памяти и высших корковых функций головного мозга вплоть до полного распада интеллекта и психической деятельности [89]. При использовании микроскопических методов для изучения нервных тканей людей, больных Альцгеймером, выявлялись два вида скопления белков: амилоидные бляшки и нейрофибриллярные клубочки. Электронная микроскопия позволила выявить отдельные филаменты в составе бляшек и нейрофибриллярных клубочков. Впоследствии была показана амилоидная структура этих филаментов.

При более детальном изучении было обнаружено, что амилоидные бляшки преимущественно состоят из амилоида  $\beta$ , а нейрофибриллярные клубочки из белка tau. Амилоид  $\beta$  имеет в своем составе от 40 до 42 аминокислот и возникает путем протеолитического расщепления белка предшественника APP (Amyloid Precursor Protein), трансмембранного белка с неизвестной функцией.

N-конец  $\beta$  амилоида находится во внеклеточном пространстве, остальная же его часть располагается в клеточной мембране. А $\beta$  пептид образуется в результате процессинга APP при помощи  $\beta$ - и  $\gamma$ -секретаз с N- и C- конца соответственно, секретазы  $\alpha$  расщепляет А $\beta$  пептид между 16 и 17 аминокислотными остатками, тем самым препятствуя образованию амилоидогенного белка. N-концевая последовательность А $\beta$  пептида с 1 по 17 аминокислоту неупорядочена и не принимает непосредственного участия в образовании амилоидной структуры, аминокислоты с 18 по 40 или 42 участвуют в формировании двух параллельных  $\beta$  слоев в составе амилоидной фибриллы [90].

Мутации в генах *PSEN1* и *PSEN2* являются наиболее частой причиной наследственной болезни Альцгеймера [91, 92]. Белки, кодируемые данными генами входят в протеазный комплекс, который участвует в расщеплении APP по  $\gamma$ -секретазному сайту. Их функция заключается в ингибировании активности  $\gamma$ -секретазы. В результате мутаций уменьшается способность данных белков выполнять свою функцию, что в конечном счете приводит к увеличению количества пептида А $\beta$  [93, 94, 95].

Отложения белка tau выявляются также и при других заболеваниях, таких как супрануклеарный паралич, кортикобазальная дегенерация, болезнь Пика, болезнь Паркинсона [96]. При этом гиперфосфорилирование белка tau является общим свойством всех этих заболеваний и, вероятно, необходимо для токсического эффекта. На данный момент получено большое количество данных о сайтах фосфорилирования tau, найдены возможные протеинкиназы и фосфатазы участвующие в этом процессе, разрабатываются стратегии, направленные на снижение фосфорилирования этого белка [97].

Болезнь Паркинсона - это медленно прогрессирующее нейродегенеративное заболевание, занимающее второе место по распространенности после болезни Альцгеймера.

Болезнь была впервые описана доктором Джеймсом Паркинсоном в 1817 году как «дрожащий паралич». В развитых странах данное заболевание регистрируют у 1% процента пациентов старше 60 лет. Данное заболевание характеризуется различными нарушениями моторных и других функций головного мозга. Нарушение моторных функций, прежде всего, связано с гибелью дофаминергических нейронов стриатума (полосатого тела) и черного тела, регулирующих мышечный тонус, в связи с чем возникают такие симптомы, как тремор, брадикинезия и ригидность мышц. Гибель нейронов в других отделах мозга приводит к нарушениям сна, депрессии, а также нарушениям когнитивных функций [98]. Данное заболевание имеет спорадическую и наследственную этиологию [2].

На сегодняшний день установлено несколько генов, мутации в которых повышают риск развития болезни Паркинсона. Эти мутации характеризуются аутосомно-доминантным (SNCA, LRRK2) [99, 100] или аутосомно-рецессивным (PRKN, PINK1) [101, 102] типом наследования, в тоже время наследование данной мутации может быть сцеплено с X-хромосомой (TAF1) [103].

Основным патологическим признаком болезни Паркинсона является наличие так называемых телец Леви – внутриклеточных агрегатов, состоящих из белков, липидов и других компонентов. Данные цитоплазматические образования регистрируются и при других нейродегенеративных заболеваниях [104, 105]. В свою очередь, основным компонентом телец Леви являются фибриллярные агрегаты белка  $\alpha$ -синуклеина. Точечные мутации в гене SNCA, кодирующим белок  $\alpha$ -синуклеин, а также дупликация данного гена или увеличение копийности гена более чем в два раза сопряжены с образованием телец Леви и развитием болезни Паркинсона.

Различными группами исследователей было показано, что развитию болезни Паркинсона могут способствовать некоторые факторы окружающей среды. Например, было показано, что симптомы болезни возникают в ответ на отравление нейротоксическим веществом - 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридином [106, 107]. Серьезная травма головы также может послужить причиной развития болезни Паркинсона [108].

### 1.6.2. Полиглутаминовые заболевания

Существует целый класс нейродегенеративных амилоидных заболеваний, который сопровождается агрегацией белков с полиглутаминовыми трактами. В настоящее время известно 9 таких заболеваний: спиноцеребральные атаксии типов 1, 2, 6, 7, 17, болезнь Мачадо-Йозефа, болезнь Гентингтона, спинобульбулярная мышечная атрофия, дентаторубро-паллидо-люисова атрофия [109, 110].

**Таблица 2. Полиглутаминовые болезни**

<b>Болезнь</b>	<b>Белок</b>
Болезнь Гентингтона	Гентингтин
Спинобульбулярная мышечная атрофия	Андрогенный рецептор
Дентаторубро-паллидо-люисова атрофия	Атрофин-1
Спиномозжечковая атаксия 1	Атаксин-1
Спиномозжечковая атаксия 2	Атаксин-2
Спиномозжечковая атаксия 3 Болезнь Мачадо-Йозефа	Атаксин-3
Спиномозжечковая атаксия 6	Альфа 1А-субъединица потенциал-зависимого кальциевого канала
Спиномозжечковая атаксия 7	Атаксин-7
Спиномозжечковая атаксия 17	ТАТА-связывающий белок

Данные заболевания обладают рядом общих свойств [111]:

- 1) Аутомно-доминантный тип наследования (за исключением спинобульбулярной мышечной атрофии; ген ответственный за патогенез локализован в X-хромосоме).
- 2) Уменьшение возраста начала заболевания и увеличение скорости его прогрессирования в ряду поколений, особенно в том случае, если мутантная аллель получена от отца.
- 3) Тесная корреляция между длиной полиглутаминовой области и степенью проявления симптомов заболевания.
- 4) В основном регистрируются у людей среднего возраста.
- 5) Все полиглутаминовые амилоидозы поражают нервную систему, то есть являются локализованными амилоидозами.



Наиболее изученной из этих полиглутаминовых болезней является болезнь Гентингтона. Болезнь Гентингтона сопровождается агрегацией белка гентингина, который имеет полиглутаминовый домен. Увеличение длины этого домена сверх определенного порогового значения, происходящее в результате мутаций, которые увеличивают количество триплетов CAG в первом экзоне гена гентингина, является причиной развития заболевания. Симптомы болезни Гентингтона не обнаруживаются у людей, у которых количество CAG триплетов в первом экзоне гена гентингина меньше 35, в то время как удлинение полиглутаминовой области увеличивает вероятность возникновения и тяжесть болезни Гентингтона [112, 113, 114]. Мутантный гентингин с удлиненной N-концевой полиглутаминовой последовательностью склонен к агрегации и образует нерастворимые гранулярные или фибриллярные белковые агрегаты в чувствительных нейронах, главным образом в их ядрах, но также и в цитоплазме [115, 116].

Продукция мутантных форм белка гентингина вызывает множество патологических эффектов, в частности: ухудшение транскрипции и угнетение убиквитин-протеасомной системы, нарушение деятельности митохондрий и кальциевого гомеостаза, ухудшение аксонального транспорта, мутагенность [117]. Однако, несмотря на обширные исследования, механизмы, ответственные за вышеупомянутые повреждения клетки при болезни Гентингтона, все еще остаются непонятыми.

В настоящее время существует несколько гипотез о том, каким образом агрегаты мутантного гентингина могут приводить к токсическому эффекту. Согласно первой гипотезе, основным источником токсичности мутантного гентингина являются крупные агломераты этого белка – крупные белковые комплексы, в состав которых входят мономеры, олигомеры и полимеры гентингина. Дело в том, что агрегация гентингина может сопровождаться агрегацией ряда клеточных глутамин-богатых белков, в результате чего последние могут терять способность выполнять свои функции, что в результате может служить источником токсичности [110, 118, 119, 120]. Помимо этого образование крупных агрегатов мутантного гентингина может оказывать негативное влияние на внутриклеточный транспорт.

Согласно другой гипотезе, главную роль в патогенезе болезни Гентингтона играют отдельные полимеры и олигомеры мутантного гентингина [121]. Можно предполагать, что в крупных агломератах гентингина, в отличие от отдельных фибрилл, полимеры гентингина маскируют часть кополимеризующих поверхностей друг друга. Поэтому эффективность кополимеризации у отдельных фибрилл будет выше, чем у крупных агломератов гентингина.

Кроме того ряд исследователей полагают, что токсичность мутантного гентингина связана с потерей его функции [122, 123].

По литературным данным известно, что одна из главных функций гентингина – участие в транспорте BDNF (brain-derived neurotrophic factor) по микротрубочкам. BDNF – нейротрофический фактор, локализующийся в нейронах, который определяет стрессоустойчивость нервных клеток, а также важен для нормального протекания нейрогенеза. В гентингин-опосредованный транспорт BDNF вовлекаются также белки HAP1 (гентингин связывающий белок) и p150 (субъединица динактина). При агрегации Htt, мономерной формы этого белка не хватает для нормального транспорта BDNF, что может являться одной из причин патологии [124].

Чтобы понять причины токсичности гентингина на молекулярном и клеточном уровнях, были созданы экспериментальные модели, основанные на следующих организмах: мышах *Mus musculus* [125], мухах *Drosophila melanogaster* [126], червях *Caenorhabditis elegans* [127] и дрожжах *Saccharomyces cerevisiae* [128]. В данной диссертационной работе была использована именно дрожжевая модель, поэтому она будет рассмотрена нами подробно.

### **1.7. Дрожжевая модель болезни Гентингтона**

Дрожжи *S. cerevisiae* представляют собой простейший и удобный для генетических манипуляций эукариотический модельный организм, который часто используется для выявления молекулярных основ различных заболеваний человека, включая амилоидные заболевания и болезнь Гентингтона в частности. Как и у человека, агрегация и токсичность гентингина в дрожжах возрастает с увеличением длины полиглутаминового домена [129]. В большинстве случаев исследования с использованием дрожжевой модели болезни Гентингтона проводятся на клетках дрожжей, которые экспрессируют первый экзон гена гентингина человека (*IT15*), белковый продукт которого содержит на N-конце FLAG-эпитоп, за которым расположены первые 17 аминокислот первого экзона гена гентингина и полиглутаминовая последовательность длиной 103 аминокислотных остатка (Htt103Q), соединенная с зеленым флуоресцирующим белком (GFP). Для проявления сильного цитотоксического эффекта необходимы высокие уровни продукции данного белка в клетке, поэтому экспрессия Htt103Q находится под контролем сильного галактозного промотора (*GALI*). Данный белок агрегирует и сильно ингибирует рост дрожжей, таким образом имитируя токсический эффект в нейронах человека. Аналогичный белок, имеющий полиглутаминовую последовательность равную 25 аминокислотным остаткам, Htt25Q, обычно используют в качестве контроля, так как он не агрегирует и не приводит к токсичности. У дрожжей сверхпродукция Htt103Q приводит к формированию ДСН-устойчивых агрегатов, которые имеют амилоидную структуру, так как устойчивость к сильным ионным детерегентам является характерным признаком амилоидов, отличающим истинные амилоиды от аморфных белковых агрегатов [68]. Более того, агрегаты

Htt103 содержат универсальные амилоидные эпитопы для связывания ДНК аптамеров [130], что также подтверждает их амилоидную природу.

Было показано, что имеющий NLS-последовательность мутантный гентингтин изменяет транскрипцию некоторых генов и уменьшает жизнеспособность в дрожжевых клетках [129]. Экспрессируемый в цитоплазме мутантный гентингтин также токсичен, и его токсичность связана с его агрегацией, которая стимулируется предсуществующими прионными амилоидами [*PSI*<sup>+</sup>] или [*PIN*<sup>+</sup>], являющихся прионными формами двух глутамин/аспарагин (Q/N)-богатых белков [128, 131]. Таким образом, у дрожжей токсичность мутантного гентингина является результатом перекрестной полимеризации, процесса, о котором будет подробно сказано ниже и при котором полимеры одного белка являются матрицами для полимеризации других белков. Кроме того токсичность мутантного гентингина может модулироваться при помощи последовательностей, которые находятся слева и справа от полиглутаминового тракта - фланкирующих последовательностей [128, 132]. Агрегация мутантного гентингина в дрожжевых клетках изменяет эндоцитоз, триптофановый метаболизм, трансляцию, ход клеточного цикла, деградацию белков, ассоциированную с эндоплазматическим ретикулумом и функционирование митохондрий [110, 133, 134, 135, 136, 137]. Молекулярные основы этих клеточных дефектов являются в значительной степени неясными, однако в некоторых исследованиях было показано, что mHtt индуцирует полимеризацию клеточных белков, большинство из которых содержат Q/N-богатые области [138, 139, 140]. Среди прочих, агрегация жизненно важного белка Sup35 является основным источником токсичности mHtt в штамме 74D-694 [110, 141]. При этом снижается количество растворимой формы белка Sup35 и его функционального партнера – фактора терминации трансляции Sup45, который включается в состав агрегатов Sup35 [110, 141, 142]. Однако, результаты, полученные в других лабораториях, свидетельствуют о том, что существуют и другие причины токсичности мутантного гентингина, не имеющие явного отношения к агрегации белка Sup35.

## **1.8. Взаимодействия между глутамин-богатыми белками. Кросс-сидинг**

Согласно имеющимся литературным данным, одной из главных причин токсичности мутантного гентингина в клетках дрожжей является переход белка Sup35 в амилоидное состояние в результате его взаимодействия с амилоидами гентингина, а также включение в состав амилоидных агрегатов белка Sup45 [110]. Данный феномен может быть примером более масштабного явления, а именно, взаимодействия между глутамин-богатыми или полиглутаминовыми белками, которое ведет либо амилоидообразованию, либо к

возникновению агрегатов белка, необязательно обладающих амилоидной структурой. В рамках нашей работы мы рассмотрим оба этих варианта взаимодействия амилоидогенных белков.

Процесс индукции амилоидной полимеризации амилоидогенного белка при участии амилоидов другого белка носит название перекрестной полимеризации, или кросс-сидинга. Ярким примером кросс-сидинга являются взаимодействия между дрожжевыми прионами. Несколькими группами авторов было показано, что *de novo* образование прионных или амилоидных полимеров белка Sup35 зависит от наличия в клетках приона [*PIN*<sup>+</sup>] [53, 143]. Также в работе Сальниковой с соавторами было показано, что поддержание ненаследуемых амилоидов белка Sup35 на фоне его сверхпродукции в клетках дрожжей зависит от присутствия прионных полимеров [*PIN*<sup>+</sup>], что указывает на постоянное взаимодействие молекул белка Sup35 и полимеров [*PIN*<sup>+</sup>]. Кроме того, исследования, проведенные *in vitro*, показали, что амилоидные фибриллы, образованные прионным доменом белка Rnq1, ускоряют переход в амилоидное состояние белка Sup35, лишённого функционального С-домена, и наоборот [144, 145]. В работе Derkatch с соавторами было показано, что *de novo* возникновение прионных полимеров [*PIN*<sup>+</sup>] в свою очередь зависит от прионного детерминанта [*URE3*] [37].

Прионные полимеры также могут быть затравками для возникновения неприонных амилоидов. Например, полимеры [*PSI*<sup>+</sup>] могут инициировать образование detergent-устойчивых полимеров глутамин-богатого белка Pub1. Агрегаты Pub1 не обнаруживаются в присутствии ДСН, однако выявляются при использовании более слабого денатурирующего агента – саркозила. Стоит отметить, что прионные полимеры Rnq1 не индуцировали полимеризацию Pub1, что может объясняться их малым количеством в клетке по сравнению с количеством полимеров [*PSI*<sup>+</sup>]. Количество молекул белка Rnq1 в клетках дрожжей примерно в 10 раз меньше по сравнению с Sup35. Введение в клетку мультিকопийной плазмиды, кодирующей Rnq1, приводило к полимеризации Pub1 в отсутствие [*PSI*<sup>+</sup>] в клетках с фенотипом [*PIN*<sup>+</sup>] [138].

В работе к.б.н. Н. В. Кочневой 2012 года, было показано, что наличие [*PIN*<sup>+</sup>] фенотипа увеличивает количество амилоидных полимеров рекомбинантного белка Htt103Q-GFP примерно в три раза [118]. В работе к.б.н. А. М. Александрова 2008 года было обнаружено, что прионные амилоиды белка Rnq1 увеличивают эффективность перехода ряда искусственных полиглутаминовых белков в амилоидную форму [70].

Следует отметить, что в исследованиях, проведенных *in vitro*, было выявлено, что эффективность перекрестного затравления обратно зависима от количества структурных отличий между взаимодействующими белками [146, 147]. Данное обстоятельство позволяет объяснить низкую частоту возникновения полимеров [*PSI*<sup>+</sup>] в присутствии приона [*PIN*<sup>+</sup>].

Взаимодействие между амилоидогенными белками и амилоидными полимерами характерно не только для дрожжевых прионов, но и для большого количества других белков.

Согласно результатам, полученным в работе к.б.н. В. Н. Уракова (2010), а также данным, полученным к.б.н. А. И. Александровым (2012), амилоиды, искусственных полиглутаминовых белков polyQX-МС могут индуцировать амилоидную полимеризацию других полиглутаминовых и глутамин-богатых белков. Например, полимеры 70Q-Sup35МС и 76QY-Sup35МС могут вызывать амилоидную полимеризацию неполноразмерного белка NM-Sup35. Для достижения данного эффекта не требуется значительной сверхпродукции Sup35, как в случае затравления Sup35 с помощью прионных полимеров Rnq1 [110, 138, 143]. Следует отметить, что полимеры 70Q-Sup35МС гораздо лучше затравляют полимеризацию Sup35, чем полимеры 76QY-Sup35МС. Кроме того, амилоидные полимеры 70Q-Sup35МС способствовали переходу в амилоидное состояние двух эндогенных глутамин-богатых белков дрожжей-прионогенного Rnq1 и белка Pub1 [138].

Результаты, ранее полученные в нашей лаборатории, свидетельствуют о том, что амилоидные полимеры белка 85Q-GFP, в котором МС-домены белка Sup35 заменены на GFP, индуцируют амилоидную полимеризацию полиглутаминовых белков 81QP-GFP, 121QL-GFP, 91QR-GFP, 81QE-GFP, которые не агрегируют сами по себе [110].

Данные, полученные в работе Derkatch, говорят о том, что нетоксичные формы полиглутаминовых белков с разной длиной полиглутаминового (Q53, Q72, Q103) тракта могут способствовать возникновению фенотипа [*PSI*<sup>+</sup>], имитируя тем самым детерминант [*PIN*<sup>+</sup>] [144].

Все приведенные выше примеры подтверждают феномен взаимодействия полиглутаминовых и глутамин богатых белков в основном на примере искусственных полиглутаминовых белков или дрожжевых прионов, однако имеются литературные данные, свидетельствующие о том, что белок-белковые взаимодействия могут лежать в основе патогенеза различных конформационных заболеваний человека.

Так, например, показано, что белок TIA-1 включается в состав амилоидных агрегатов мутантного гентингина (Htt130Q) у трансгенных мышей линии R6/2. TIA-1 – РНК-связывающий белок млекопитающих, принимающий участие в образовании стресс гранул. Данный белок содержит С-концевой, прионоподобный глутамин-богатый домен, позволяющий ему агрегировать и взаимодействовать с другими полиглутаминовыми или глутамин-богатыми белками. В ходе изучения продукции TIA-1 в клетках нейробластомы вместе с мутантным гентингином Htt60Q, было показано, что именно глутамин-обогащенный домен TIA-1 ответственен за взаимодействие с гентингином. Процесс включения TIA-1 в агрегаты мутантного гентингина является специфичным - данное обстоятельство было выявлено при

изучении взаимодействия TIA-1 и агрегатов белка SOD1-супероксиддисмутаза. Белок TIA-1 не включался в состав амилоидных агрегатов, образованных белком SOD-1. В экспериментах проведенных *in vitro*, было показано, что совместная инкубация Htt42Q и TIA-1 приводила к образованию амилоидного вещества, что было подтверждено с помощью тиофлавина Т и Конго красного. При подробном изучении этого вещества методами атомно-силовой микроскопии и иммуноэлектронной микроскопии, было показано, что оно представляет собой агрегаты, составленные из гетерологичных амилоидных фибрилл, то есть фибрилл имеющих в своем составе как белок Htt42Q, так и белок TIA-1. Такие же результаты были получены при исследовании агрегированного вещества Htt62Q и TIA-1, выделенного из клеток нейробластомы.

В исследованиях проведенных *in vitro*, также было установлено, что фибриллы Htt42Q ускоряют переход TIA-1 в амилоидное состояние. Кроме того, амилоидизация TIA-1 в клетках нейробластомы в результате его взаимодействия с агрегатами мутантного гентингина снижает функциональную активность белка TIA-1 [148].

В исследованиях, проведенных Wear с соавторами, было показано, что в состав амилоидных агрегатов, образованных гентингином с удлиненным полиглутаминовым доменом, может включаться большое количество белков с неструктурированными доменами. Это было показано при помощи масс-спектрометрического анализа амилоидных агрегатов мутантного гентингина, выделенных из клеток дрожжей и млекопитающих [120]. Стоит отметить, что для большинства из этих белков остается неизвестным, образуют ли они амилоидную структуру при взаимодействии с агрегатами гентингина.

Похожие результаты были получены в нашей лаборатории при исследовании агрегатов Htt103Q в дрожжевых клетках. При помощи масс-спектрометрического анализа было показано, что белки Pub1, Bmh2, Rpn10, Def1, Sgt2 включаются в состав агрегатов Htt103Q. Нижниковым с соавторами также был выявлен ряд дрожжевых белков, которые вовлекаются в агрегаты образованные полимерами [*PSI*<sup>+</sup>], A $\beta$ -GFP и PrP-GFP [140].

В работе Duennwald были обнаружены и другие белки, взаимодействующие с агрегатами мутантного гентингина: Def1 (фактор деградации РНК полимеразы II), Yir003w, Ylr278c [149]. Важно, что делеции соответствующих генов приводят к снятию токсичности, вызванной продукцией Htt103Q-GFP [150].

## 1.9. Детоксификация полимеров полиглутаминовых белков в результате белок-белковых взаимодействий

Белок-белковые взаимодействия могут не только быть причиной токсических эффектов, связанных с продукцией полиглутаминовых белков, но могут и противодействовать этим токсическим эффектам. В то же время нарушение взаимодействий между амилодогенными белками может также влиять на токсический эффект патогенных белковых агрегатов [150].

В работе Fuentealba было показано, что сверхпродукция TDP-43, белка, участвующего в сплайсинге, препятствует агрегации некоторых полиглутаминовых белков. Это было показано для двух таких белков: HttQ72 – первого экзона гентингина (с длиной polyQ-тракта-72 аминокислотных остатка), и искусственного полиглутаминового белка 80Q-GFP. Причем в первом случае также наблюдалось некоторое снижение токсичности HttQ72 [151]. Т.е. в данном случае кополимеризация полиглутаминовых белков может снижать их токсичность и ослаблять их полимеризацию.

Интересно, что токсичность одного полиглутаминового белка может снижаться в результате внесения в клетку другого агрегирующего глутамин-богатого белка, как было показано на работах с мухами *Drosophila*. Оказалось, что при продукции в мухах патологического белка спиноцеребральной атаксии атаксина-3 и N-домена дрожжевого прионного белка Sup35, патологический эффект атаксина снимался. При этом Sup35 полимеризовался в клетках мух и его агрегаты колокализовались с агрегатами атаксина 3 [152]. Авторы объяснили исчезновение токсичности взаимодействием полимерной формы Sup35 с предшественниками агрегатов SCA-3, и возможным механизмом могло быть изменение свойств агрегата в результате кополимеризации данных белков. Но можно предложить и другое объяснение: включаясь в агрегаты, образованные атаксином-3, белок Sup35 может конкурировать с каким-либо другим функциональным глутамин-богатым белком X, вследствие чего уровень растворимой формы последнего изменялся бы в меньшей степени, и его функция в клетке сохранялась.

В исследованиях, проведенных Ayudavara с соавторами на червях *Caenorhabditis elegans*, было показано, что нокаут гена CRAM-1, гомолога человеческого гена НУРК, снижает агрегацию искусственного полиглутаминового белка Q40-YFP и Аβ-пептида, однако при этом жизнеспособность червей также снижается. Это можно объяснить, проанализировав, какую роль играет ген НУРК у человека. По литературным данным известно, что белковый продукт гена НУРК предотвращает агрегацию ряда функциональных белков в присутствии амилоидов α-синуклеина и/или гентингина. Показано, что амилоидные олигомеры НУРК или его гомолога CRAM-1 могут связываться с полиглутаминовыми доменами ряда белков, в частности мутантного гентингина, Аβ-пептида и α-синуклеина, за счет гидрофобных

взаимодействий, что увеличивает эффективность процесса агрегации последних. В ходе данного взаимодействия агрегаты патогенных амилоидов и НУРК организуются в крупные агломераты, находящиеся в “оболочке” из белка НУРК. Стоит заметить, что белок НУРК преимущественно взаимодействует с олигомерными формами патогенных амилоидов, считающихся наиболее токсичными. Таким образом, взаимодействие амилоидов, в частности мутантного гентингина, Аβ-пептида и α-синуклеина с НУРК приводит к тому, что площадь кополимеризующей поверхности патогенных амилоидов резко снижается за счет образования ими крупных агрегатов, кроме того, эти агрегаты окружены оболочкой из белка НУРК, которая препятствует взаимодействию с ними эндогенных белков клетки. Следовательно, при нокауте гомолога НУРК у червей *Caenorhabditis elegans* эффективность полимеризации мутантного гентингина и Аβ-пептида снижается, но за счет существования олигомерных форм, индуцирующих кополимеризацию функциональных белков, падает и жизнеспособность [153, 154].

Изучение супрессоров токсичности мутантного гентингина в дрожжах, позволило выявить 10 белков, сверхпродукция которых снижает токсичность Htt103. Большинство из них обладало глутамин-богатыми доменами, в частности белок Sup35. Более того, отдельно взятые амилоидогенные домены этих белков, а также амилоидогенные домены, в которых все аспарагины были заменены на глутамины супрессировали токсичность амилоидов Htt103Q. Показано, что эти супрессоры агрегировали вместе с белком Htt103, в результате чего токсичность агрегатов Htt103Q снижалась, и исчезали мелкие олигомерные формы белка Htt103Q [155].

Похожие результаты были получены другой группой исследователей. Leslie Ripaud с соавторами продемонстрировали, что повышенная экспрессия генов: *SIS1*, *SUC2*, *SOK1*, а также трех генов, кодирующих белковые продукты с глутамин-богатыми доменами *NAB3*, *MCM1* и *GTS1*, приводила к супрессии токсического эффекта мутантного гентингина Htt103. Подробное изучение влияния гена *GTS1* на агрегаты гентингина позволило установить, что сверхпродукция амилоидогенного домена белкового продукта данного гена влияет на физические свойства агрегатов Htt103. Было показано, что амилоидогенный домен белка Gts1 значительно снижает уровень ДСН-устойчивой фракции агрегатов Htt103Q [156].

Таким образом, на данный момент имеется множество данных о взаимодействии глутамин-богатых белков друг с другом, о том, что агрегаты одного амилоидогенного белка могут индуцировать переход в амилоидное или агрегированное состояние других белков. Данные процессы могут по-разному влиять на жизнеспособность клеток: в одних случаях переход в агрегированное состояние амилоидогенных белков может быть причиной



токсического эффекта, в других – образование агрегатов некоторых белков может приводить к уменьшению агрегации и снижению токсичности патогенных амилоидов.

В данной диссертационной работе нами были исследованы взаимодействия разных форм белка гентингина с полиглутаминовыми и глутамин-богатыми белками в клетках дрожжей и влияние этих взаимодействий на жизнеспособность клеток дрожжей.

## Глава 2. Материалы и методы

### 2.1. Культивирование клеток *S. cerevisiae*

Дрожжи *S. cerevisiae* выращивали при температуре 30°C на полной (YPD: 1% дрожжевого экстракта, 2% пептона, 2% глюкозы) или синтетической (YNB: 0.67% Yeast Nitrogen Base, 2% глюкозы) средах. В жидких средах культуры дрожжей выращивали до середины логарифмической фазы роста. В селективные среды добавляли стандартные количества необходимых для жизни дрожжей аминокислот и азотистых оснований согласно стандартным протоколам [157]. Для индукции синтеза белков Htt25Q-/103Q-GFP, Htt25Q-/103Q-RFP использовались жидкие или твердые синтетические среды, 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.

### 2.2. Культивирование клеток *E. coli*

Бактерии *E. coli* выращивали при температуре 37°C. Культивирование бактерий проводили с использованием твердой среды Agar Tryptose (Ferak Berlin, 2% агара) и жидкой среды 2xYT (1% дрожжевой экстракт (Диаэм), 1.6% триптон (Difco), 0.5% NaCl). Вышеназванные питательные среды смешивались с соответствующими антибиотиками [158]. В среды добавляли антибиотики: ампициллин, канамицин. Для всех процессов клонирования использовали штамм *E. coli* DH5 $\alpha$  (supE44  $\Delta$ lac U169 ( $\phi$ 80 lacZ $\Delta$ M15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1).

### 2.3. Выделение ДНК из *E. coli*

Ночную культуру *E. coli*, выращенную в 5мл среды 2YT, охлаждали на льду 30 мин, а затем осаждали центрифугированием при 2800 оборотов в минуту в течение 7 минут. Объем клеток равный 200 мкл ресуспендировали в 800 мкл воды milli-Q и переносили в 2 миллилитровые эппендорфы. Таким образом, суммарный объем суспензии составлял 1 мл. Клеточную суспензию переносили в центрифугу и осаждали клетки при 10000 оборотах в минуту в течение 1 минуты. Супернатант отбрасывали, осадок смешивали с 200 мкл TE-буфера и РНК-зой. Инкубировали полученную смесь в течение 5 минут. Дальнейшие операции проводили на льду. Добавляли 400 мкл р-ра В (1% SDS, 200mM NaOH). Раствор В добавляли резко, в хорошо ресуспендированный осадок. Смесь инкубировали 3 минуты, периодически аккуратно перемешивая рукой. Добавили 300 мкл р-ра С (3М ацетат К, pH=4,8). В течение 3 минут аккуратно перемешивали рукой до образования творожистой массы. Откручивали 8 минут при 13000 оборотах в минуту. Отбирали супернатант и добавили к нему 0,6 объема изопропанола. Перемешивали на вортексе. Инкубировали 15 минут при  $t = -20^{\circ}\text{C}$ . Центрифугировали 1 минуту при 13000 оборотах в минуту. Супернатант отбрасывали, осадок дважды промывали 300 мкл 70% этанола. Высушивали осадок 10 минут при  $t = 55^{\circ}\text{C}$ . Добавляли к осадку 40 мкл воды milli-Q.

### 2.4. Выделение ДНК из дрожжей *S. cerevisiae*

Использовали ночную культуру клеток *S. cerevisiae*. Клетки выращивали в объеме 1,5 мл в селективной среде. Полученную клеточную суспензию центрифугировали при 5000 оборотах в течение 5 минут. Осадок ресуспендировали в 100 мкл буфера STET (сахароза 8%, 50 mM Трис pH 8, 50 mM ЭДТА, 5% Тритон X-100), добавляли 200 мг 0,5 мм стеклянных бус, разбивали клетки с помощью вортекса в течение 5 минут. Добавляли еще 100 мкл буфера STET, быстро перемешивали с помощью вортекса и помещали в кипящую водяную баню на 3 минуты. Быстро охлаждали на льду. Осаждали в течение 10 минут при  $4^{\circ}\text{C}$  при 10000 оборотах в минуту. Переносили 100 мкл супернатанта в новый эппендорф, предварительно добавив в него 50 мкл 7,5 М ацетата аммония. Полученную смесь инкубировали 1 час при  $t = -20^{\circ}\text{C}$ . Центрифугировали 10 минут на 13000 оборотах в минуту при температуре  $4^{\circ}\text{C}$  (на данной стадии выпадают в осадок остаточная хромосомная ДНК, крупные молекулы РНК и другие возможные примеси, мешающие бактериальной трансформации). Отбирали 100 мкл супернатанта и смешивали его с 200 мкл охлажденного на льду этанола. Центрифугировали на максимальных оборотах. Супернатант отбрасывали. Дважды промывали 100 мкл 70% этанола.

Ресуспандировали осадок в 20 мкл воды milli-Q. Использовали 10 мкл полученной смеси для трансформации *E. coli*.

## 2.5. Штаммы *S. Cerevisiae*

В данной работе были использованы следующие штаммы: 74-D694 (*MATa ura3-52 leu2-3,112 trp1-289 his3-Δ 200 ade1-14*) [*PSI*<sup>+</sup>] [*PIN*<sup>+</sup>] и производный от этого штамма штамм 74-D694 [*PSI*<sup>+</sup>][*PIN*<sup>+</sup>] с делецией гена *PRB1*, кодирующий протеиназу В (делеция производилась с использованием делеционной кассеты, несущей ген *HIS3*), 74-D694 *MATa ura3-52 leu2-3,112 trp1-289 his3-Δ 200 ade1-14 [psi<sup>-</sup>][PIN<sup>+</sup>]* [159], 74-D694 *MATa ura3-52 leu2-3,112 trp1-289 his3-Δ 200 ade1-14 [psi<sup>-</sup>][pin<sup>-</sup>]*, полученный при помощи выращивания первого штамма на среде с гуанидил хлоридом (4 mM).

Ген *HSP104* в штамме 74-D694 *ΔHSP104 MATa ura3-52 leu2-3,112 trp1-289 his3-Δ 200 ade1-14 [psi<sup>-</sup>][pin<sup>-</sup>]* делетировали с использованием плазмиды pBC-HSP104::*HIS3*. Данную конструкцию разрезали по сайтам рестрикции *ApaI* и *BsrGI* и трансформировали в клетки дрожжей.

74-D694 *Δ S35*, получен из первого штамма делецией гена *SUP35*. Ген *SUP35* разрушали путем вставки гена *TRP1*.

Штамм 74-D694 [*PIN*<sup>+</sup>] с делецией гена *DEF1* был получен с использованием гистидиновой делеционной кассеты. Использовали ген *HIS3* из *S. kluyveri* (pFA6a-GFP (S65T)-His3MX, Addgene plasmid # 41598). Последовательность данного гена была получена путем ПЦР с использованием следующих праймеров:

```
5'-CTTACCAATTACCCCAAAAATCACCATCATAAAGTACGGTCCTGTTCCCTAGCA-  
3'                                     и                                     5'-  
CCATTTTCGTTTTTTATGTGGGAGGTTCTACTTCTCCCTTACGCCTCGTTCAGAATGAC  
AC-3'.
```

BY4741 (*MATA his3-D1 leu2-D0 lys2-D0 ura3-D0 [psi<sup>-</sup>][PIN<sup>+</sup>]*).

BY4742 (*MATa his3-D1 leu2-D0 lys2-D0 ura3-D0 [psi<sup>-</sup>][PIN<sup>+</sup>]*) (Invitrogen) и производный от этого штамма, штамм с делецией гена *DEF1* из коллекции Euroscarf.

Дрожжевая GFP-коллекция (Invitrogen).

W303 *MATa ade2-1 trp1-1 leu2-3,112 his3-11,15 ura3-52 can1-100 [psi<sup>-</sup>][PIN<sup>+</sup>]* [160].

## 2.6. Трансформация плазмид в *S. cerevisiae* и *E. coli*

Для трансформации *E. coli* использовали компетентные клетки, приготовленные по методу, описанному [161]. Аликвоту компетентных клеток размораживали на льду в течение 10

минут. 50 мкл компетентных клеток смешивали с 1 мкл разведенной плазмиды (50 нг/мкл). Приготовленную смесь инкубировали на льду в течение 30 мин. После инкубации клетки подвергали тепловому шоку в твердотельном термостате в течение 1 минуты (42°C). После теплового шока смешивали клетки с 300 мкл среды SOC (описана в протоколе по приготовлению компетентных клеток) и выдерживали 1 час при температуре 37°C. Высевали полученную суспензию на твердую среду (Agar Tryptose, 2 % агара) с антибиотиком.

Трансформацию дрожжей *S. cerevisiae* проводили в соответствии со стандартным протоколом с небольшими изменениями. Одну треть объема ночной культуры клеток дрожжей центрифугировали при 2000 оборотах в минуту на центрифуге (Eppendorf 5810).

Супернатант удаляли, к клеткам добавляли новую порцию среды и подращивали 4 часа. Клеточную суспензию осаждали при 2000 оборотах в минуту. Далее к клеткам добавляли 1 мл 0.1 М LiAc. Хорошо ресуспендированную смесь клеток разливали по необходимому количеству эппендорфов. Центрифугировали на микроцентрифуге (Eppendorf) при 6000 оборотах в минуту. Супернатант удаляли. К клеткам добавляли 16 мкл воды, 1 мкл плазмиды (10 нг/мкл), 25 мкл одноцепочечной ДНК (2 мг/мл, прокипяченная), 120 мкл 50% раствора полиэтиленгликоля (3500), 18 мкл 1 М LiAc. Полученную смесь тщательно перемешивали на вортексе и помещали в твердотельный термостат. Инкубировали клетки 50 минут при температуре 43°C. Далее смесь центрифугировали 30 сек при 9000 оборотах в минуту, промывали водой и высевали на селективную среду.

## 2.7. Конструирование плазмид и молекулярное клонирование

Нами был получен набор плазмид вида YEplac-181-QX-M-GFP. Мы использовали данные конструкции для того, чтобы изучить влияние белков PolyQ(QX)-GFP на токсичность белка Htt25Q-GFP.

Для конструирования этих плазмид применялся метод гомологичной рекомбинации в дрожжах. Смесь линейаризованного вектора и вставки с гомологичными концами трансформировали в дрожжи. В результате такой процедуры, в дрожжах с большой вероятностью происходит рекомбинация вставки в вектор по соответствующим гомологичным сайтам.

Плазмида YEplac181 – NMS35 – GFP [143] была обработана рестриктазами MluI и MlsI. Плазмиды pSBSE-QX-MS [70], кодирующие разные белки вида QX-MS, были обработаны рестриктазами PvuII и KspI. После рестрикции смешивали 2 плазмиды и вводили данную смесь в клетки дрожжей в соответствии со стандартным протоколом трансформации. После этого клоны дрожжей были проверены на предмет продукции белка, после чего плазмиды были выделены из дрожжей и их белок-кодирующие участки были просеквенированы.

Чтобы исследовать процесс кополимеризации Htt25Q-GFP и искусственных полиглутаминовых белков, необходимо было создать генетические конструкции, кодирующие полиглутаминовые белки с альтернативным биохимическим маркером.

Плазмиды YEplac181-QX-NA, кодирующие polyQX-2NA белки, были получены при помощи лигирования трех фрагментов. Первого - MluI-NarI фрагмента плазмиды pSBSE-QX, второго - NarI-BamHI фрагмента плазмиды YCp111-Sup35NM-2NA и третьего - BamHI-MluI фрагмента плазмиды YEplac-181-76QY-GFP.

Плазмида, кодирующая одновременно два белка 120QY-2NA и Htt25Q-GFP была также получена с помощью лигирования трех фрагментов. Первый фрагмент был получен в результате обработки плазмиды YEplac181-120QY-2NA рестриктазой PvuI, последующим добавлением фрагмента Кленова и дальнейшей обработкой рестриктазой MluI. Последовательность нуклеотидов, кодирующая белок Htt25Q-GFP была получена в результате обработки плазмиды p25Q-GFP рестриктазами AgeI и MluI. И третий фрагмент-вектор, был получен в результате обработки плазмиды pYES2 рестриктазами AgeI/PvuII.

Генетическая конструкция, кодирующая С-домен белка Sup35 (ген SUP35C) вместе с белком Sup45 была создана путем лигирования двух фрагментов. Первый фрагмент -вставка - был получен в результате обработки плазмиды pRS315-SUP35-C рестриктазами PvuII-XbaI, второй - вектор - обработкой плазмиды pRS315-SUP45 рестриктазами PvuII-XbaI.

**Таблица 3. Плазмиды, используемые в работе**

Плазмида	Описание	Источник
Yerlac181	Мультикопийная дрожжевая плазмида с лейциновым ауксотрофным маркером	[162]
pYES2-120QY-2HA+Htt25-GFP	Мультикопийная pYES2 плазмида с урацильным ауксатрофным маркером, кодирующая два белка. Первый-химерный белок, содержащий полиглутаминовый тракт со вставками тирозина, длиной 120 аминокислот и последовательности HA, второй-белок Htt25Q-GFP, находящийся под контролем галактозного промотора Gal1 и описанный ниже	Получена в данной диссертационной работе
p103Q-GFP	Мультикопийная pYES2 плазмида с урацильным ауксатрофным маркером, кодирующая химерный белок, состоящий из полиглутаминового тракта длиной 103 аминокислотных остатка и GFP. Экспрессия данного белка находится под контролем Gal1-промотора, активируемого при росте клеток на среде с галактозой	[128]

p25Q-GFP	Плазмида, аналогичная вышеописанной, отличающаяся от нее длиной полиглутаминового тракта, которая составляет здесь 25 аминокислотных остатков	[128]
p103Q-RFP	Плазмида, аналогичная p103Q-GFP, в которой ген GFP заменен на RFP	[134]
p25Q-RFP	Плазмида, аналогичная p25Q-GFP, в которой ген GFP заменен на RFP	[134]
YEplac-181-QX-M-GFP	Многокопийная дрожжевая плазмида, содержащая ген <i>LEU2</i> и кодирующая гибридный белок Sup35, N-домен которого заменен на последовательность полиQX (где X - Y, P, L, E, R), а C-домен, заменен на GFP	Получены в данной диссертационной работе
YEpl181-QX-2HA	Плазмида, идентичная вышеописанной YEplac-181-QX-M-GFP, в которой QX-область имеет различную длину и представляет из себя полиглутаминовый домен или полиглутаминовый домен со вставками некоторых	Получены в данной диссертационной работе



	<p>аминокислот (85Q, 76QY, 101QT, 131Q, 120QY или 91QV). При этом GFP заменен на HA-последовательность</p>	
<p>pRS315-SUP35-C+ SUP45</p>	<p>Центромерная дрожжевая плаزمиды, содержащая ген <i>LEU2</i>, сконструированная на основе вектора pRS315, одновременно кодирующая С-домен белка Sup35(Sup35C) и белок Sup45</p>	<p>Получена в данной диссертационной работе</p>
<p>pRS315-SUP35-C</p>	<p>Центромерная дрожжевая плазмиды, содержащая ген <i>LEU2</i>, кодирующая С-домен белка Sup35(Sup35C)</p>	<p>[163]</p>
<p>pRS315-SUP45</p>	<p>Центромерная дрожжевая плазмиды, содержащая ген <i>LEU2</i>, кодирующая белок Sup45</p>	<p>[164]</p>
<p>pALX1</p>	<p>Интегративная конструкция на основе лейцинового селективного маркера, для дизрупции гена PRB1 (<i>prb1::LEU2</i>)</p>	<p>[165]</p>

pYES2	Мультикопийная дрожжевая плазида с урацильным ауксотрофным маркером	Invitrogen
pRS315	Центромерная дрожжевая плазида, содержащая ген <i>LEU2</i>	[166]
YEplac181-RNQ1	Мультикопийная дрожжевая плазида, содержащая ген <i>LEU2</i> и кодирующая белок Rnq1	[138]
pSUP35::TRP1	Интегративная конструкция на основе триптофанового селективного маркера для дизрупции гена SUP35 ( <i>sup35::TRP1</i> )	[163]
pDEF1::HIS3	Интегративная конструкция на основе гистидинового селективного маркера для дизрупции гена DEF1 ( <i>def1::HIS3</i> )	Получена в данной диссертационной работе
YEplac181-NMS35-GFP	Мультикопийная дрожжевая плазида с лейциновым ауксотрофным маркером, кодирующая белок Sup35, в котором С-домен заменен на GFP	[143]

pSBSE-QX-МС	Мультикопийная плаزمида, содержащая селективный маркер <i>URA3</i> и кодирующая гибридный белок Sup35, N-домен которого заменен на последовательность полиQX	[70]
-------------	--	------

Плазмиды, полученные с помощью гомологичной рекомбинации в дрожжевых клетках, были выделены из дрожжей и амплифицированы в *E. coli*, затем снова выделены. Плазмиды, полученные методами молекулярного клонирования *in vitro*, также были амплифицированы в *E. coli* и выделены. Все плазмиды, полученные в данной работе были отсековенированы.

Рестриксию плазмидной ДНК, электрофорез фрагментов ДНК в агарозном геле и процедуру конструирования плазмид при помощи *E. coli* выполняли в соответствии со стандартными протоколами. Выделение плазмидной ДНК из клеток *E. coli* и *S. cerevisiae* проводили в соответствии с представленными протоколами. Секвенирование ДНК проводили в ЦКП "Геном".

Аминокислотные последовательности полиглутаминовых доменов, кодируемых плаزمидами p103Q-GFP(RFP), p25Q-GFP(RFP), соответственно, в однобуквенном коде:

1. MDYKDDDDK LATLEKLMKAFESLKS FQQ  
 QQQ  
 QQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQLP GGS I.
2. MDYKDDDDK LATLEKLMKAFESLKS FQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQLP G  
 GS I.

## **2.8. Приготовление и фракционирование дрожжевых лизатов**

Культуру клеток дрожжей выращивали до середины логарифмической фазы роста ( $OD_{600}=1,5$ ) при  $30^{\circ}\text{C}$  в жидкой селективной среде YNB или YPD. Суспензию клеток центрифугировали при 2000 оборотах в минуту в течение 4 минут. Добавляли к клеткам 800 мкл дистиллированной воды. Переносили клетки в двухкубовые эппендорфы. Центрифугировали при 10000 оборотах в минуту. Супернатант отбрасывали. Дальнейшие операции проводили на льду. Добавляли к клеткам три объема стеклянных бус (0,5 мм) и лизирующий буфер (30 mM Трис- $\text{HCl}$ , pH 7.4, 150 mM NaCl, 100 mM ингибитор протеаз PMSF (фенилметилсульфонилфторид), 2 mM DTT (дителиотреитол), 1 mM EDTA, коктейль из ингибиторов протеаз - Complete™ (Roche Applied Science)). Буфер для лизиса должен лишь слегка покрывать бусы. Разбивали клетки в течение 6 минут в холодной комнате на специальном приборе (Retsch MM 400). Осветляли полученную суспензию при 4000 оборотах в минуту в течение 4 минут. Осветление проводили в холодной комнате на настольной центрифуге Eppendorf. Полученный в ходе осаждения супернатант использовали для дальнейших экспериментов.

## **2.9. Исследование количеств растворимых форм белков при помощи ультрацентрифугирования**

Для сравнения количеств растворимых форм белков Sup35 и Sup45 в дрожжевых лизатах применяли метод ультрацентрифугирования. Дрожжевые лизаты центрифугировали при 100000 g на ультрацентрифуге Beckman Optima MAX-TL (около 50000 оборотов в минуту) в течение 1 часа при  $4^{\circ}\text{C}$ .

## **2.10. Белковый гель-электрофорез, иммуоблоттинг**

Для определения количества растворимых форм белков Sup35 и Sup45 использовали электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии ДСН в соответствии со стандартным протоколом [167], однако наносимые пробы не кипятили.

Чтобы сравнить количества белков HttQ25-GFP и 120QY-GFP, находящихся в агрегированной и растворимой формах, использовали электрофоретический метод, разработанный в нашей лаборатории [139, 168], с некоторыми модификациями.

Основной метод основан на том, что крупные амилоидные агрегаты распадаются под действием ДСН до одиночных амилоидных фибрилл при комнатной температуре [68], которые не входят в полиакриламидный гель (7,5%), застревая на старте. Таким образом, это позволяет разделять полимерную и мономерную формы белков.

Следовательно, если прокипятить гель в течение 5 минут, то застрявшие на старте амилоиды, деградируют до мономерных белков, которые легко войдут в гель. При этом можно будет оценить количество белка, находящегося в растворимой и агрегированной форме.

Для этого осветленные лизаты дрожжевых клеток, содержащие белки HttQ25-GFP и 120QY-GFP, смешивали в отношении 1:2 с лизирующим буфером. Затем добавляли четырехкратный буфер для нанесения. Полученную смесь вносили на полиакриламидный гель и запускали электрофорез. После того, как пробы входили в разделяющий гель, конструкцию для ПААГ электрофореза разбирали, в лунки вносили дополнительное количество разведенного буфера для нанесения (содержащего ДСН) и кипятили гель в течение 5 минут. За это время амилоидные полимеры распадались до мономеров, которые без труда входят в гель. Далее прибор для ПААГ-электрофореза вновь собирали и проводили электрофорез до конца.

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, как и предыдущий, 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).

Мембрану с адсорбированными на ней белками инкубировали на качалке в буфере TBS (0,4 % (2 г/ 500 мл)) в течение 1 часа. После этого мембрану переносили в ванночку с новой порцией того же буфера, добавляли первичные антитела: мышинные против HA-антигена (Sigma), Flag-эпитопа (ThermoFisher Scientific) или кроличьи против Sup35NM, Sup35C, GFP (Santa Cruz,) и инкубировали на качалке в течение двух часов. Далее два раза промывали мембрану раствором TBS с 0,08% Tween-20, и помещали в новую порцию буфера смешанного

со вторичными антителами против кроличьих (ThermoFisher Scientific) или мышинных (Sigma) антигенов. Инкубировали 1 час на качалке. Затем трижды промывали раствором TBS с 0,08% Tween-20 (по 15 минут), а после этого трижды промывали буфером TBS. Вторичные антитела связаны с пероксидазой хрена, что позволяет детектировать их с помощью хемоллюминесцентного субстрата. В качестве такого субстрата использовали ECL (Amersham BioScience). Детекцию проводили на приборе (Fusion SI Vilber Lourmat).

## **2.11. Спот тест для оценки жизнеспособности клеток дрожжей продуцирующих рекомбинантные белки**

В данной работе изучалось влияние амилоидов мутантного и нормального гентингина на рост дрожжевых клеток, а также модуляция токсических эффектов, связанных с увеличенной продукцией данных белков, при помощи ряда делеций. Чтобы оценить эффекты влияния продукции этих полиглутаминовых белков на рост клеток дрожжей *S.cerevisiae*, мы использовали спот тест. Гены мутантного и нормального гентингина находятся под контролем галактозного промотора, который репрессирован на среде с глюкозой, однако при переносе клеток на среду, содержащую галактозу, происходит активация галактозного промотора. Таким образом, можно увидеть, как синтез данных рекомбинантных белков влияет на жизнеспособность клетки. Такой спот тест был сделан для каждого из штаммов, используемых в данной диссертационной работе, и он явился одним из главных инструментов исследования.

Дрожжевые клетки выращивали в жидкой селективной среде с глюкозой до середины логарифмической фазы роста (YNB: 0.67% Yeast Nitrogen Base, 2% глюкозы) и переносили в жидкую среду (YNB: 0.67% Yeast Nitrogen Base) с 2% раффинозой в качестве единственного источника углерода (описано выше), где инкубировали в течение 4 часов. Далее измеряли оптическую плотность клеток ( $OD_{600}$ ) на спектрофотометре (Yanaco Spectrophotometer UO-2000) и выравнивали концентрацию клеток добавлением дополнительного объема среды (для каждой опытной точки). После этого отбирали 100 мкл клеточной суспензии и переносили в стерильную 96-луночную плашку. Клеточную суспензию разводили в 5, 25, 125 и 625 раз и раскапывали на чашки с твердой селективной средой: галактозой - опыт и глюкозой - контроль. Чашка с глюкозой использовалась для количественного контроля за нанесением одинакового числа клеток, так как на среде с глюкозой цитотоксический эффект полимеров гентингина не проявляется.

## **2.12. Измерение уровня интенсивности флуоресценции**

Дрожжевые клетки выращивали в жидкой среде, как описано выше. Полученные клеточные суспензии выравнивали по оптической плотности, доводя ее до 0,5 при длине волны

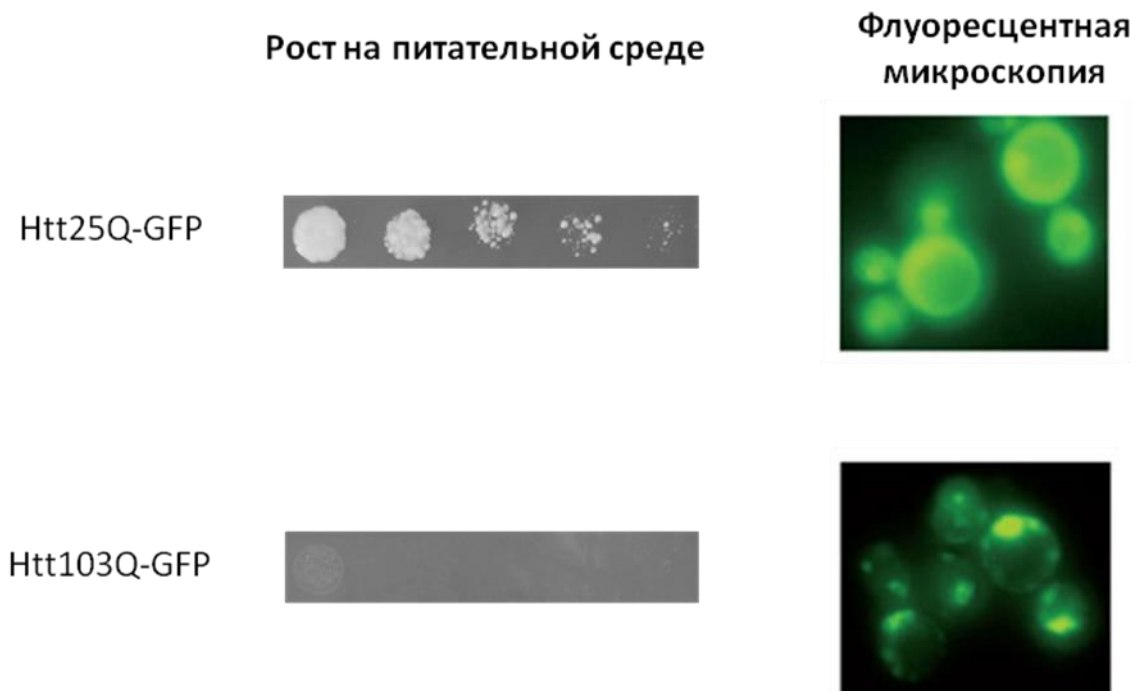
600. Измерение уровня флуоресценции RFP проводили при использовании мультиплашечного ридера (Multimode Plate Reader EnSpire (PerkinElmer)). Длина волны возбуждающего света – 555 нм. Регистрацию флуоресценции проводили при длине волны – 600 нм. Использовали три независимо полученных трансформанта для каждой исследуемой точки.

## Глава 3. Результаты

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

Белковый продукт первого экзона гена мутантного гентингтина с удлиненным полиглутаминовым трактом, содержащим 103 остатка глутамина (Htt103Q), соединенный с зеленым флуоресцирующим белком (GFP) часто используется для моделирования болезни Гентингтона в дрожжах *S. cerevisiae*, так как склонный к агрегации белок Htt103Q сильно замедляет рост клеток дрожжей, тем самым проявляя токсический эффект. В свою очередь 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 [169]. В данной работе эти результаты были воспроизведены и подтверждены (Рис. 6).





**Рисунок 6. Дрожжевая модель болезни Гентингтона.** Слева показан рост клеток дрожжей на твердой питательной среде с галактозой в присутствии мутантного (Htt103Q-GFP) и нормального (Htt25Q-GFP) Гентингтина. 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 [169].

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 [118].

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 [130]. 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 [170, 171, 172, 173, 174], можно предположить, что полимеры белков с длинными полиглутаминовыми областями могут являться матрицами для эффективной кополимеризации белка Htt25Q-GFP.

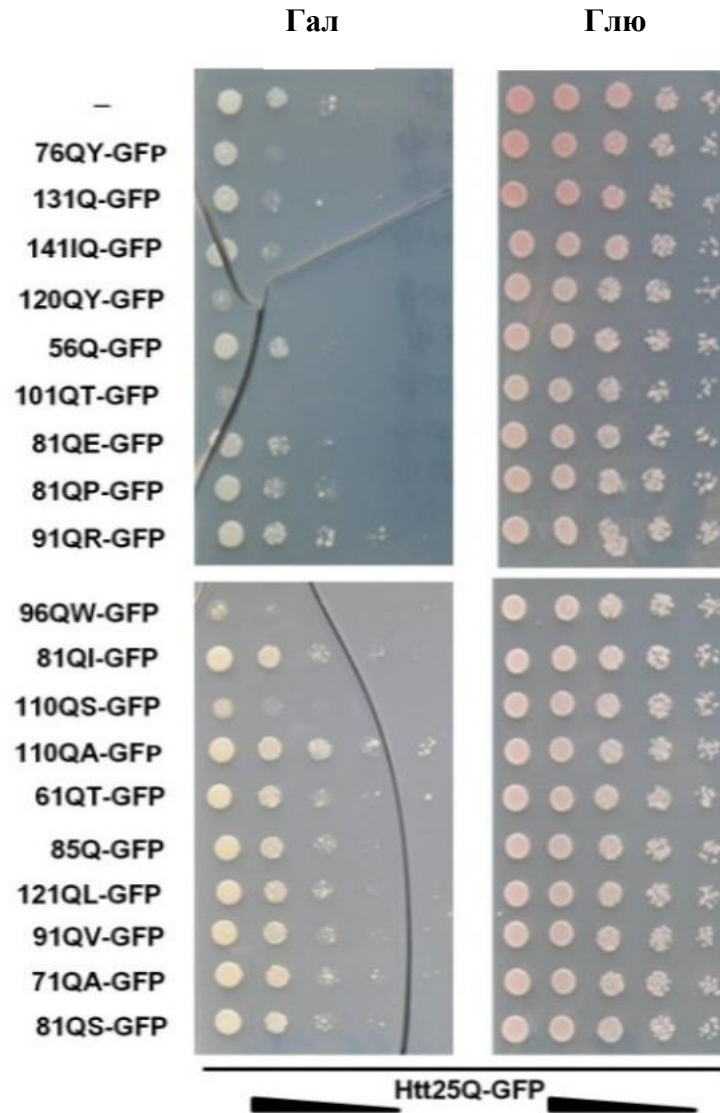
Ранее в нашей лаборатории был сконструирован набор плазмид, кодирующих белок Sup35, у которого N-концевой домен был заменен на полиглутаминовый домен со вставками всех других кодируемых аминокислотных остатков, кроме лизина и аспарагиновой кислоты. Таким образом, полученные белки состояли из MC-доменов Sup35 и полиглутаминового тракта, имеющего вид (QQQXQ)<sub>n</sub>, где n – число повторяющихся элементов, а X – это вставочная аминокислота (Рис. 7).



**Рисунок 7. Схематичное изображение искусственных полиглутаминовых белков.** Полиглутаминовая область вида (QQQXQ)<sub>n</sub>, где X-любая аминокислота, а n-количество тандемных повторов, соединенная с MC-доменами белка Sup35.

Было показано, что такие белки формируют нетоксичные ДСН-устойчивые полимеры в клетках дрожжей [70]. В данной работе мы модифицировали эти белки, заменив C-домен белка Sup35 на зеленый флуоресцентный белок, GFP, либо на два повтора последовательности гемагглютинина вируса гриппа (2HA). 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 (Рис. 8).

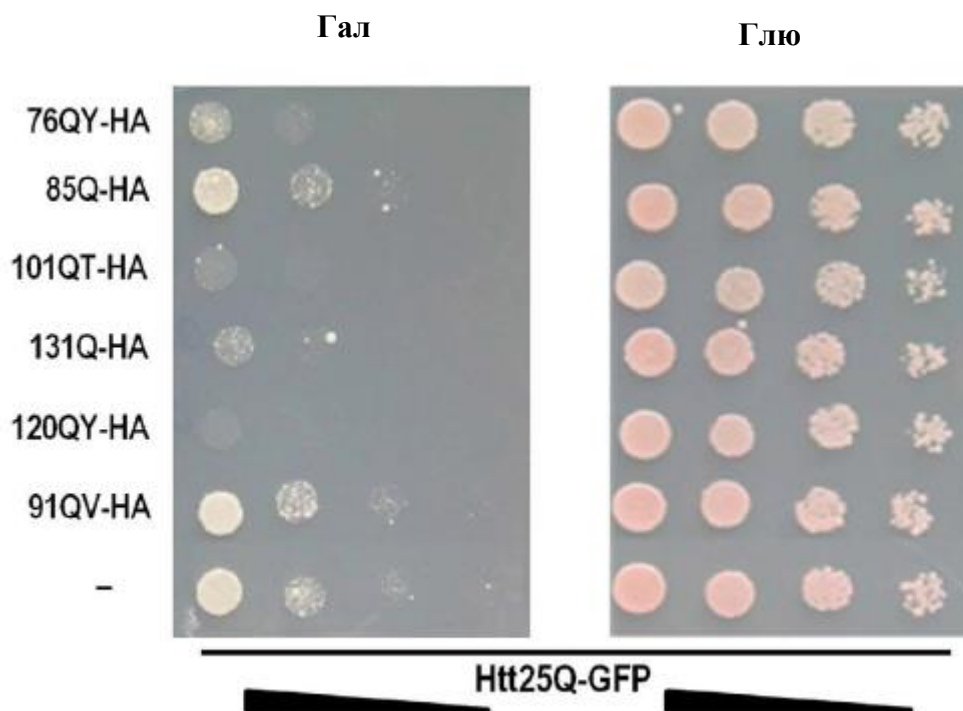


**Рисунок 8. Совместная продукция некоторых искусственных глутамин-богатых белков и белка Htt25Q-GFP приводит к токсичности.** Суспензии клеток  $[psi^+][PIN^+]$  штамма 74-D694, содержащих пару мультикоопийных плазмид: p25Q-GFP, кодирующую нормальный гентингтин Htt25Q-GFP и YEplac-181-QX-M-GFP, кодирующую один из полиглутаминовых белков полиQ/QX-GFP (-, пустой вектор) были нанесены на твердые среды с обозначенными источниками углерода. Синтез белка Htt25Q-GFP активируется на среде с галактозой (Gal). Перед тем, как нанести клетки дрожжей на чашки, содержащие глюкозу (Glc) или галактозу, клетки выращивали при 30<sup>0</sup>C в жидкой селективной среде YNB с глюкозой (без лейцина и урацила) в соответствии с протоколом, описанном в разделе “материалы и методы”. Затем клетки переносили в жидкую селективную среду YNB с раффинозой на 4 часа. После этого выравнивали концентрацию клеток по оптической плотности ( $OD_{600}=1$ ) и высевали их на чашку с галактозой. Производили 5 серийных пятикратных разведений клеточных суспензий. Для контроля за нанесением одинакового числа клеток использовали чашку с глюкозой, так как на среде с глюкозой цитотоксический эффект полимеров нормального гентингтина не

проявляется. Совместная продукция белка HttQ25-GFP с полиглутаминовыми белками 76QY-, 131Q-, 141Q-, 120QY-, 101QT-, 96QW- или 110QS-GFP вызывала замедление роста клеток.

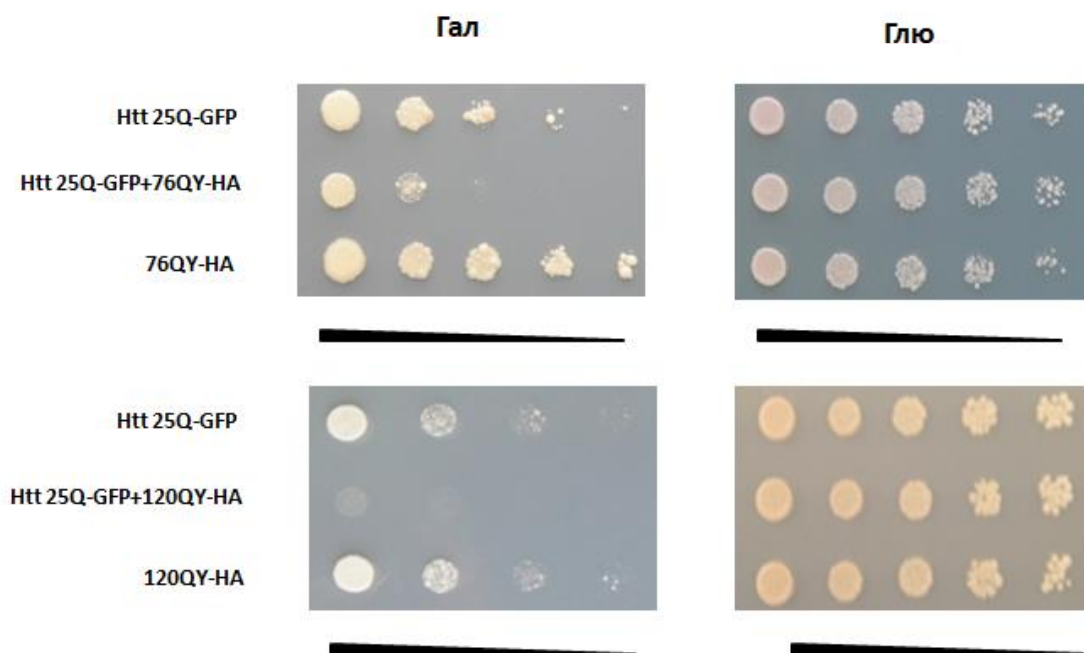
Таким образом, наблюдаемый токсический эффект указывал на возможность полимеризации белка Htt25Q-GFP на матрицах искусственных полиглутаминовых белков. Чтобы подтвердить данное предположение, необходимо было непосредственно визуализировать амилоидные полимеры нормального гентингина Htt25Q-GFP.

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 полиглутаминовых белков, для которых GFP был заменен на 2НА 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. 9).



**Рисунок 9. Совместная продукция нормального гентингина Htt25Q-GFP с полиQ/QX-НА белками приводит к токсичности.** Клетки [*psi*][*PIN*<sup>+</sup>] штамма 74-D694, несущие пару мультикопийных плазмид: p25Q-GFP, кодирующую нормальный гентингин Htt25Q-GFP и YEp181-QX-2HA, кодирующую один из полиглутаминовых белков полиQ/QX-НА (-, пустой вектор), выращивали в жидкой селективной среде YNB с глюкозой, как описано в разделе “Материалы и методы”. После этого клетки 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. Показали, что совместная продукция белка HttQ25-GFP вместе с одним из полиглутаминовых белков 76QY-, 131Q-, 120QY-, 101QT-НА вызывала замедление роста клеток.

Наблюдаемый токсический эффект связан именно с продукцией белка Htt25Q-GFP в присутствии амилоидов искусственных полиглутаминовых белков, так как независимая продукция искусственных полиглутаминовых белков не приводит к замедлению роста клеток (Рис 10).

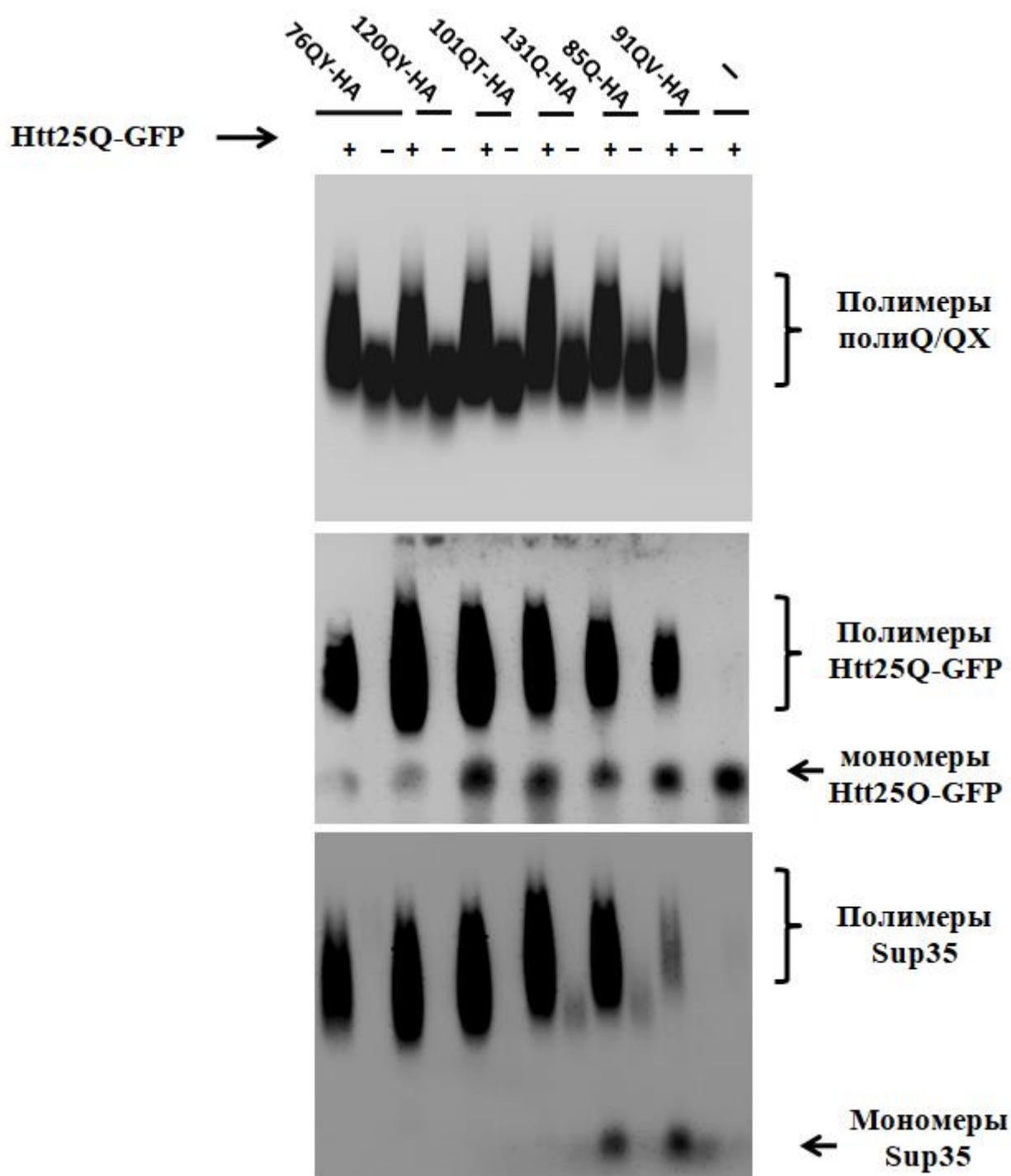


**Рисунок 10. Независимая продукция белков 76QY-НА и 120QY-НА на средах, содержащих в качестве источника углерода галактозу или глюкозу, не приводит к токсичности.** Клетки  $[psi][PIN^+]$  штамма 74-D694, несущие пару мультикопийных плазмид: p25Q-GFP, кодирующую нормальный гентингтин Htt25Q-GFP и YEp181-QY76(120)-2НА, кодирующую один из полиглутаминовых белков полиQ/QX-НА (-, пустой вектор), а также клетки  $[psi][PIN^+]$  штамма 74-D694, содержащие плазмиды pYES2 и YEp181-QY76(120)-2НА выращивали в жидкой селективной среде YNB с глюкозой, как описано в разделе “Материалы и методы”. После этого клетки 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.

Затем мы исследовали лизаты клеток, продуцирующих полиQ/QX-НА белки вместе с белком Htt25Q-GFP, при помощи агарозного фореца 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. 11). Данное наблюдение позволило нам сделать предположение, что именно переход этого жизненно важного белка в полимерное состояние, играет основную роль в токсичности нормального гентингтина, по аналогии с механизмом

токсичности мутантного гентингина, продемонстрированного в работе к.б.н. Н. В. Кочневой с соавторами (2012) [118]. Доказательство данного предположения изложено ниже. Стоит также отметить, что в клетках, синтезирующих искусственные полиглутаминовые 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 [138]. По всей видимости, незначительное снижение количества растворимого Sup35 в этих случаях не влияет на рост клеток.





**Рисунок 11. Полимеризация искусственных полиглютаминовых белков вызывает агрегацию белка Htt25Q-GFP. Полимеры Htt25Q-GFP способствуют эффективной полимеризации белка Sup35.** В клетки штамма дрожжей 74-D694 [*psi*][*PIN*<sup>+</sup>] вводили одну из плазмид, кодирующих искусственные полиQ/QX белки (76QY-, 85Q-, 91QV, 131Q-, 120QY-, 101QT-НА), вместе с плазмидой, содержащей ген нормального гентингина 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.

### 3.2. Токсичность полимерной формы нормального гентингина Htt25Q-GFP не всегда зависит от наличия амилоидов Rnq1

В нашей лаборатории к.б.н. Н. В. Кочневой и к.б.н. А. И. Александровым в 2012 году было показано, что агрегация мутантного гентингина может быть токсична для клеток дрожжей даже в отсутствие прионных амилоидов белка Rnq1 ( $[pin^-]$ ) [118]. Мы решили узнать, будет ли совместная продукция полиQ/QX и нормального гентингина Htt25Q-GFP замедлять рост клеток дрожжей, имеющих фенотип  $[pin^-]$  (Рис. 12).

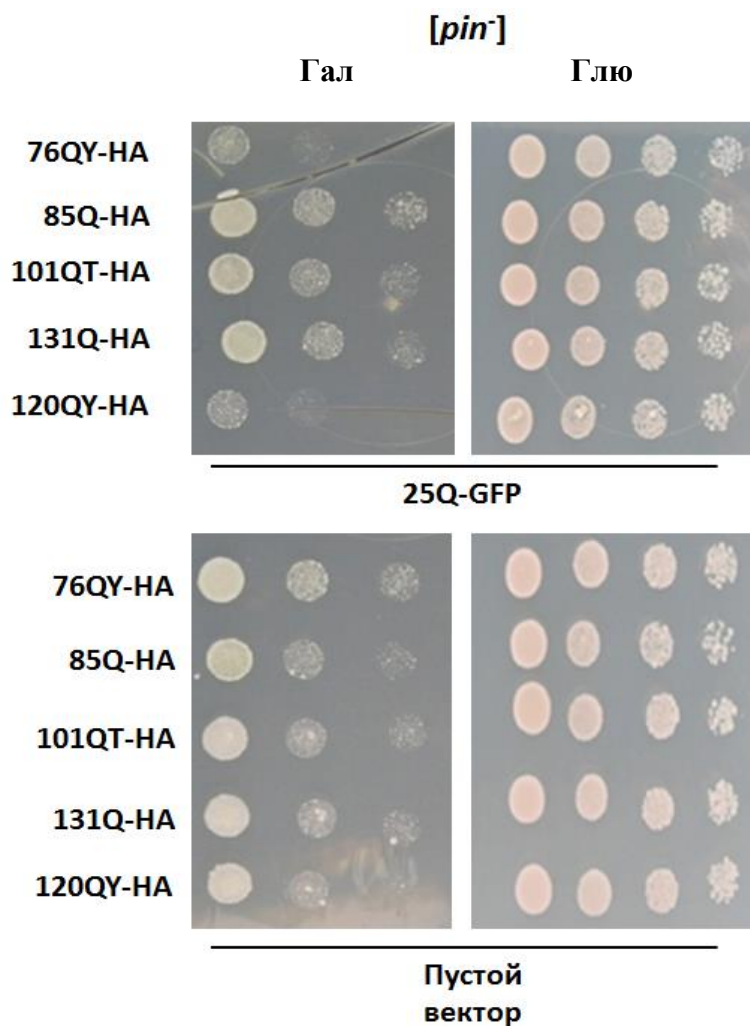


Рисунок 12. Совместная продукция нормального гентингина Htt25Q-GFP с 76QY-НА и 120QY-НА белками приводит к токсичности в клетках с фенотипом  $[pin^-]$ . Для эксперимента использовали штамм 74-D694  $[pin^-]$ . Синтез Htt25Q-GFP индуцировали согласно

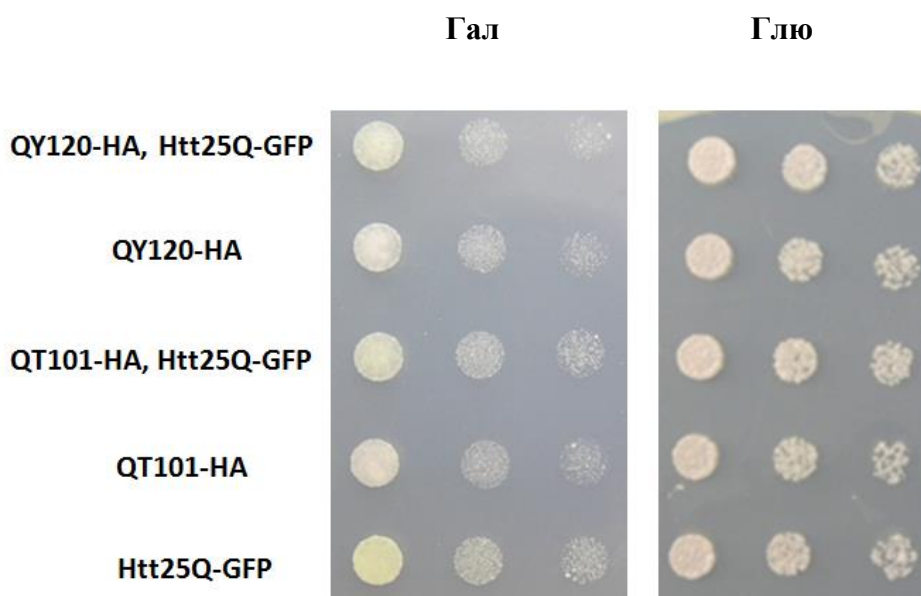
методике, описанной в разделе “материалы и методы”. Спот-тест для определения токсичности также проводили согласно представленному протоколу.

Было обнаружено, что продукция нормального гентингина Htt25Q-GFP вместе с белками 85Q-НА, 131Q-НА, 101QT-НА не приводит к токсическому эффекту в клетках имеющих фенотип [*pin*<sup>-</sup>]. Однако продукция белков 76QY-НА и 120QY-НА вместе с белком Htt25Q-GFP замедляет рост клеток дрожжей. По имеющимся литературным данным известно, что полимеры большинства искусственных полиглутаминовых белков хуже возникают *de novo* и менее эффективно полимеризуются в [*pin*<sup>-</sup>] клетках, поэтому общее количество полимеров уменьшается [70, 118, 138]. В результате этого уменьшается количество полимеров Htt25Q-GFP и вызываемые ими токсические эффекты. *De novo* возникновение и эффективность полимеризации белков 76QY-НА и 120QY-НА в меньшей степени зависят от наличия прионных амилоидов белка Rnq1, что может объяснять замедленный рост клеток при совместной продукции этих белков с Htt25Q-GFP на фоне в [*pin*<sup>-</sup>] [70].

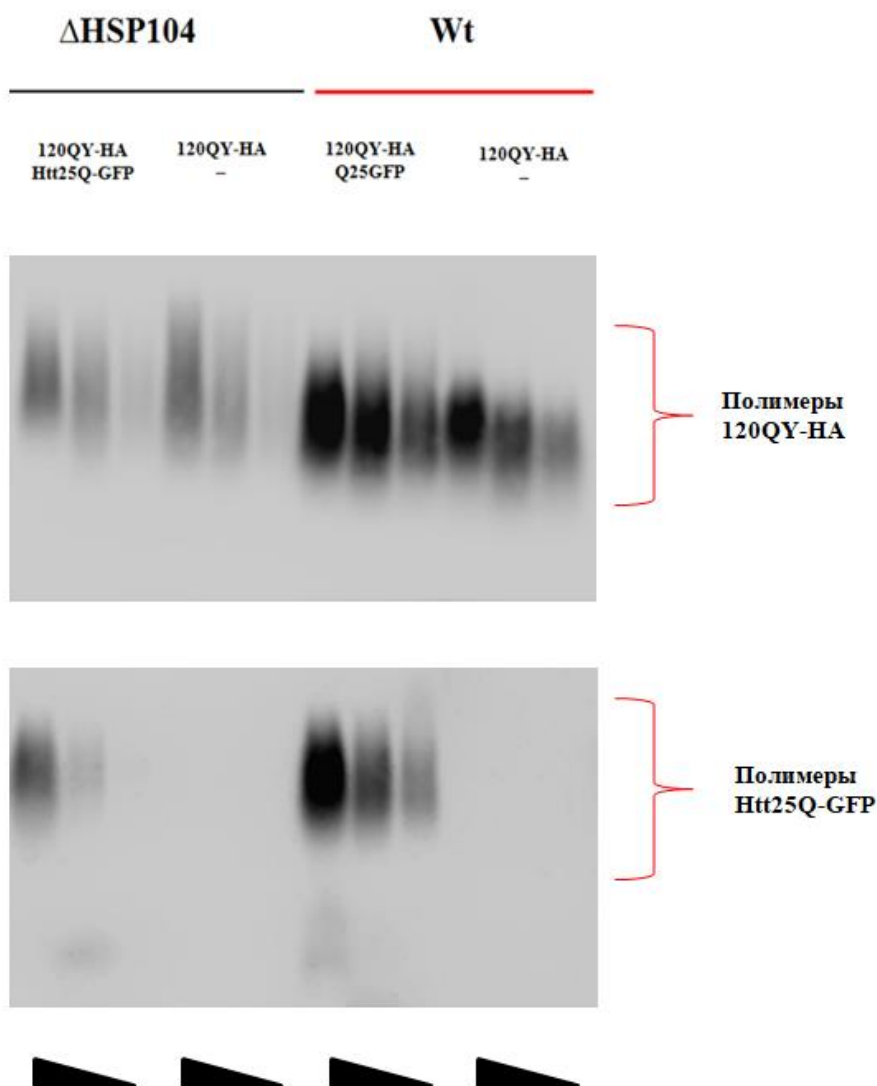
### **3.3. Делеция гена *HSP104* в штамме 74D-694 снимает токсический эффект, связанный с совместной продукцией белка Htt25Q-GFP с искусственными полиQ-белками**

В соответствии с данными опубликованными в работе к.б.н. И. М. Александрова (2008), делеция гена *HSP104* приводит к уменьшению количества полимеров искусственных полиQ-белков, существенно замедляет их *de novo* возникновение, а в некоторых случаях приводит к полной потере полимеризации [70]. Это связано с тем, что, во-первых, отсутствие шаперона Hsp104 приводит к элиминации [*PIN*<sup>+</sup>], во-вторых, существенно снижается эффективность фрагментации амилоидных полимеров. Это приводит к уменьшению количества свободных концов амилоидных полимеров, являющихся матрицами для индукции полимеризации. Существенное снижение фрагментации также приводит к уменьшению вероятности попадания полиQ/QX-белков в дочерние клетки. В результате всех этих процессов количество вещества, индуцирующего переход нормального гентингина в амилоидную форму, резко снижается, а, следовательно, и количество полимеризованного Htt25Q-GFP должно заметно снижаться, вызывая снятие токсических эффектов, связанных с амилоидами этого белка. Таким образом, учитывая литературные данные, мы ожидали снятия токсического эффекта, связанного с совместной продукцией полиQ/QX белков и белка Htt25Q-GFP в клетках, в которых делетирован ген *HSP104*, а также мы предполагали, что количество полимеризованного Htt25Q-GFP в этих клетках будет заметно снижено, по сравнению с клетками, несущими ген *HSP104*. Экспериментальные данные хорошо согласуются с нашими ожиданиями (Рис. 13, 14).

74D – 694  
ΔHSP104



**Рисунок 13.** Делеция *HSP104* предотвращает токсический эффект Htt25Q-GFP в присутствии полиQX-НА белков. Клетки дрожжей штамма 74-D694 с делеций гена *HSP104* продуцирующие полиQX белки совместно с белком Htt25Q-GFP (одиночная продукция полиQX белков или белка Htt25Q-GFP в качестве контроля) были выращены и нанесены на чашки глюкозой и галактозой в соответствии с методиками, представленными в разделе “материалы методы”. Продукция белка Htt25Q-GFP активировалась на среде с галактозой.



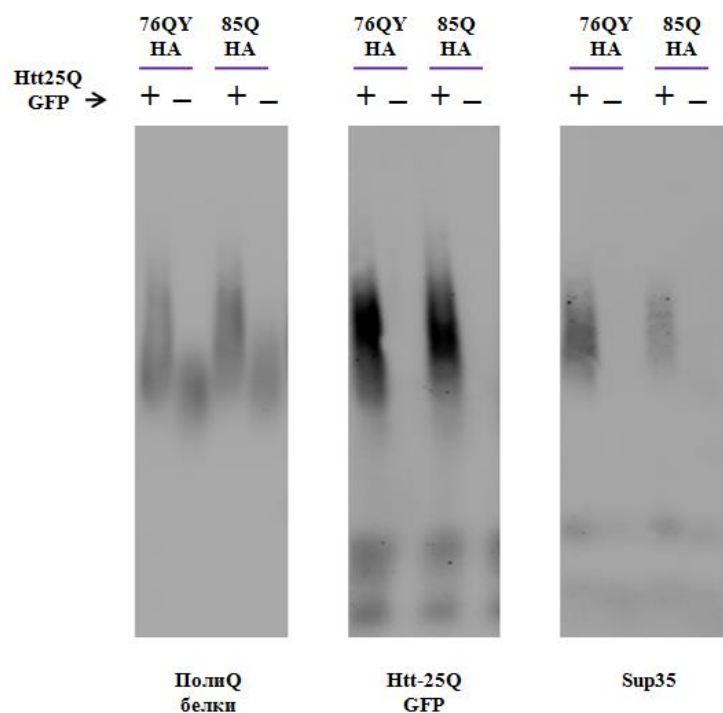
**Рисунок 14. Агрегация Htt25Q-GFP зависит от наличия шаперона Hsp104.** В клетки дрожжей штамма 74D-694 [*psi*][*PIN*<sup>+</sup>] и штамма 74D-694  $\Delta$ HSP 104 была трансформирована плазмида, кодирующая белок 120QY-HA, вместе с плазмидой, содержащей ген нормального гентингина Htt25Q-GFP (-, пустой вектор в качестве контроля). Индукцию синтеза белка Htt25Q-GFP, агарозный форец в полуденатурирующих условиях, а также иммуноблотинг проводили в соответствии со стандартными протоколами, описанными в разделе “Материалы и методы”. При покраске блотов использовали антитела на HA- и GFP-тэг.

Стоит отметить одно интересное наблюдение: согласно денситометрическому анализу, удельное количество амилоидов Htt25Q-GFP, приходящееся на единицу полимеров 120QY-NA в штамме 74D-694  $\Delta HSP104$  больше, чем в штамме 74D-694 дикого типа (1/1,5 и 1/0,6 соответственно) (Рис. 14). Как уже было отмечено выше и как можно увидеть на рисунке 14, размер полимеров 120QY-NA в штамме с делецией гена *HSP104* больше, чем у штамма дикого типа, при этом, по данным денситометрии, одинаковое количество (расчет по мономеру) разных по размеру полимеров 120QY-NA кополимеризуют разное количество белка Htt25Q-GFP. При одинаковом количестве полимеризованного 120QY-NA, рассчитанного на мономер этого белка, крупные полимеры 120QY-NA имеют меньшее количество свободных концов, чем более мелкие, поэтому следовало бы ожидать, что крупные полимеры 120QY-NA будут хуже индуцировать амилоидную полимеризацию нормального гентингина, однако наблюдается обратный эффект. Можно предположить, что более эффективная полимеризация Htt25Q-GFP в присутствии крупных амилоидов белка 120QY-NA происходит в результате того, что белок Htt25Q-GFP полимеризуется не только на концах амилоидных фибрилл белка 120QY-NA, но и на их “боковых поверхностях”. С другой стороны наличие шаперона Hsp104, фрагментирующего амилоиды 120QY-NA, может препятствовать полимеризации белка Htt25Q-GFP.



### **3.4. Сравнение размеров полимеров полиQ/QX белков, нормального гентингина Htt25Q-GFP и белка Sup35**

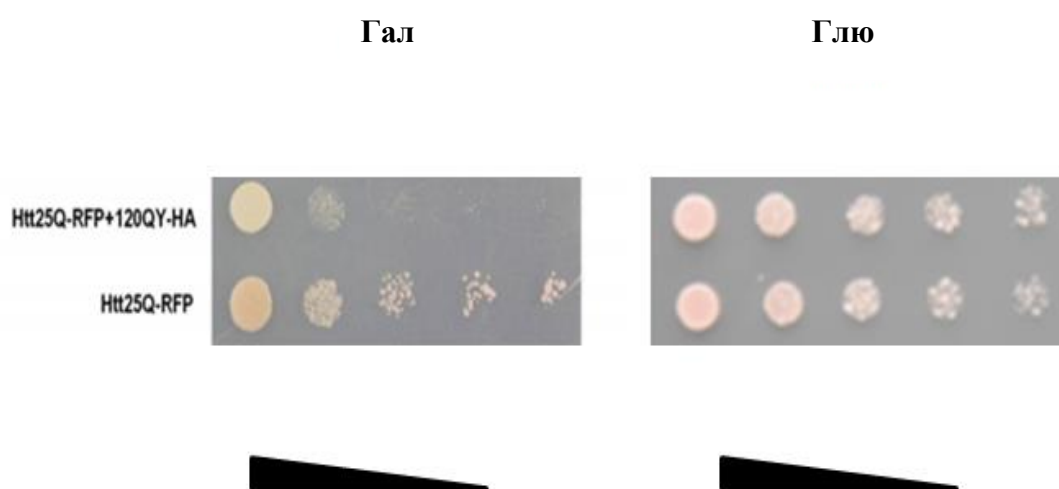
Как уже было показано выше, агрегация искусственных полиQ/QX белков вызывает полимеризацию белка Htt25Q-GFP, полимеры которого индуцируют полимеризацию жизненно важного белка Sup35. SDD-AGE лизатов клеток демонстрирует, что при продукции белка Htt25Q-GFP размер агрегатов полиQ/QX белков меняется, что свидетельствует о взаимодействии Htt25Q-GFP с полиQ/QX белками. Кроме того, размеры комплексов белков Htt25Q-GFP и полиQ/QX совпадают, что указывает на то, что это единые, совместные комплексы, содержащие ДСН-устойчивые агрегаты Htt25Q-GFP и полиQ/QX белков. Размер агрегатов белка Sup35 и агрегатов, образуемых белками Htt25Q-GFP, полиQ/QX, одинаков, что свидетельствует о том, что белок Sup35 взаимодействует с белками Htt25Q-GFP и полиQ/QX. (Рис. 15).



**Рисунок 15. Совместная агрегация белков Htt25Q-GFP, 76QY-HA(85Q-HA) и белка Sup35.** Клетки дрожжей штамма 74D-694 [*psi*][*PIN*<sup>+</sup>], продуцирующие Htt25Q-GFP и один из полиQ/QX белков (76QY-HA, 85Q-HA), были выращены в соответствии с методикой, представленной в разделе “Материалы и методы”. Индукция синтеза Htt25Q-GFP, SDD-AGE и иммуноблотинг проводили в соответствии со стандартными протоколами. Анализ размера полимеров проводили на одном фореze, для этого один и тот же образец наносили три раза для покраски тремя разными антителами: на HA-тэг, GFP и C-концевой домен белка Sup35. Размер амилоидных полимеров, образованных искусственными полиглутаминовыми белками 85Q-HA, 120QY-HA, размер полимеров нормального гентингина Htt25Q-GFP, и размер неприонных амилоидов белка Sup35 совпадают.

### 3.5. Белок 25Q-RFP может переходить в агрегированное состояние и вызывать токсичность в присутствии амилоидов белка 120QY-НА

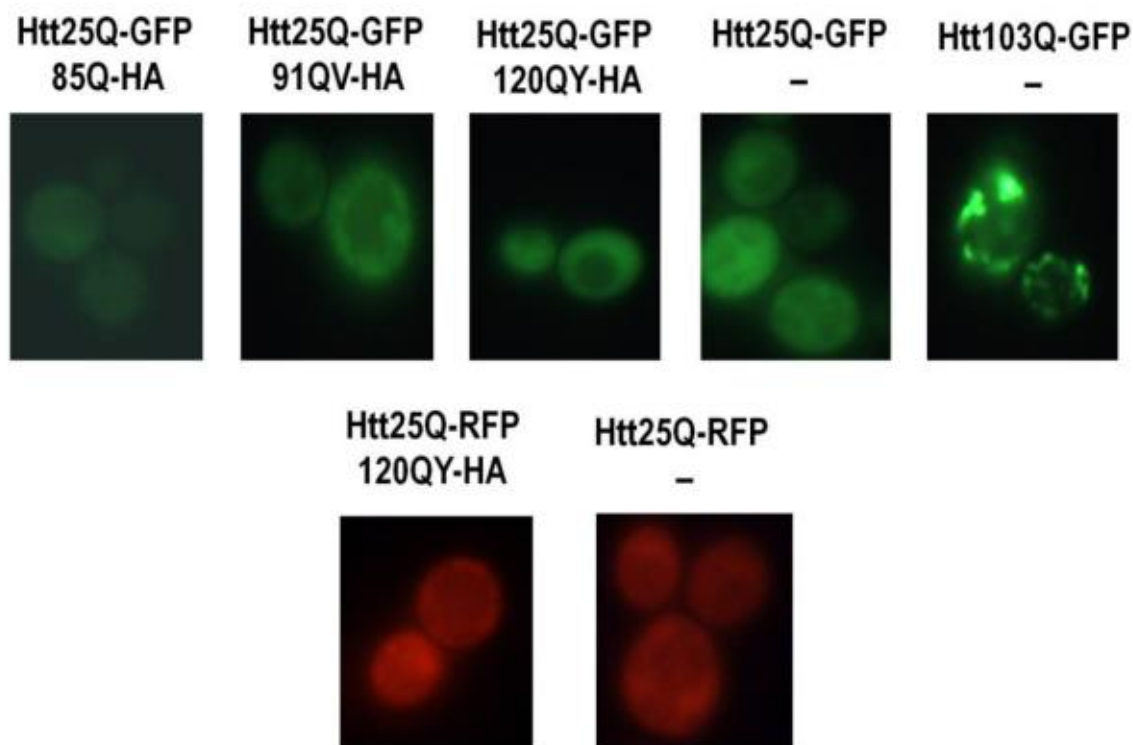
Было продемонстрировано, что продукция белка Htt25Q-RFP, в котором С-концевой участок представлен аминокислотной последовательность RFP вместо GFP, в присутствии амилоидов 120QY-НА токсична для дрожжевых клеток (Рис. 16) Стоит также отметить, что, как и его аналог - Htt25Q-GFP, белок Htt25Q-RFP образует ДСН-устойчивые агрегаты в присутствии полимеров белка 120QY-НА (данные представлены ниже). Таким образом, токсичность и способность к кополимеризации с амилоидами других белков нормального гентингина - белка Htt25Q не зависит от природы его С-концевого домена.



**Рисунок 16. Замена GFP на RFP не влияет на токсичность агрегатов немутантного гентингина.** Штамм 74-D694 [*psi*][*PIN*<sup>+</sup>] трансформировали двумя плазмидами, кодирующими белок Htt25Q-RFP и белок 120QY-НА (для контроля использовали Htt25Q-RFP и пустой вектор). Полученные клетки высевали на среду с галактозой и глюкозой в соответствии с методикой, описанной в разделе “Материалы и методы”.

### **3.6. Агрегаты Htt25Q-RFP обнаруживаются с помощью флуоресцентной корреляционной спектроскопии (работа выполнена совместно с Ю.Н. Антоненко)**

Известно, что белок Htt103Q-GFP образует микроскопически-детектируемые флуоресцентные агрегаты в клетках дрожжей с фенотипом [*PIN*<sup>+</sup>]. В отличие от Htt103Q-GFP, белок Htt25Q-GFP такие агрегаты не образует. Интересно было выяснить, будет ли происходить образование видимых флуоресцентных агрегатов при продукции белка Htt25Q-GFP(RFP) вместе с искусственными полиглутаминовыми белками. Анализ с использованием флуоресцентного микроскопа таких агрегатов не выявил (Рис. 17), однако было выдвинуто предположение, что эти агрегаты существуют, но не детектируются с помощью флуоресцентного микроскопа из-за своих мелких размеров.



**Рисунок 17. Белок Htt25Q-GFP(RFP) в отличие от Htt103Q-GFP не формирует видимых флуоресцентных агрегатов даже в присутствии искусственных белков.** Клетки штамма дрожжей 74-D694 [*psi*<sup>-</sup>][*PIN*<sup>+</sup>] трансформировали плазмидами, кодирующими белки Htt103Q-GFP или Htt25Q-GFP(RFP). Затем в клетки, несущие конструкции, кодирующие белок Htt25Q-GFP(RFP), вводилась плазмида, кодирующая один из полиQ-НА белков или Yерlac181 (пустой вектор). Индукция синтеза модельного гентингина проводили в соответствии с протоколом, описанном в разделе “Материалы и методы” с небольшими изменениями: клетки выращивали с добавлением двукратной порции аденина, чтобы избежать накопления красного пигмента, что характерно для *ade1*, *ade2* мутантов. Наблюдение за клетками производили при помощи флуоресцентного микроскопа (Zeiss Axioskop). Изображения были получены с использованием цифровой камеры (Olympus CCD).

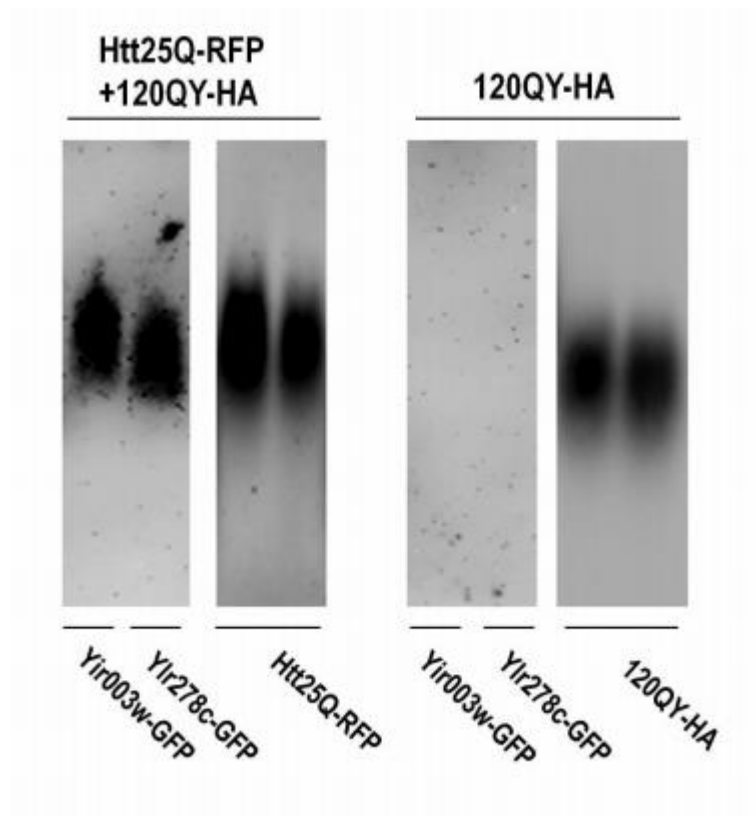
Чтобы проверить данное предположение мы использовали метод флуоресцентной корреляционной спектроскопии. Этот метод основан на регистрации флуктуаций флуоресценции дисперсных частиц или макромолекул в фиксированном микрообъеме. Коэффициент диффузии частиц обратно пропорционален характерному времени релаксации флуктуаций интенсивности флуоресценции. Это характерное время, в свою очередь, есть время затухания экспоненциальной временной корреляционной функции флуоресценции, которая измеряется с помощью цифрового коррелятора. Таким образом, чем больше размер частицы, тем медленнее происходит затухание данной временной функции.

Флуоресцентная корреляционная спектроскопия является удобным инструментом для определения диффузионных свойств флуоресцирующих молекул как в клетках, так и в клеточных лизатах [175, 176]. Такой метод использовался для определения размеров диффузных агрегатов Sup35-GFP в клетках [ $PSI^+$ ], в которых отсутствовали точечные агрегаты, видимые в флуоресцентный микроскоп [177]. С помощью данного метода нам удалось обнаружить замедленную диффузию белка Htt25Q-RFP в присутствии 120QY-НА, что подтверждает наличие агрегатов. Обнаруженные скорости диффузии указывают на малый размер агрегатов. Кроме того, измеренная яркость частиц Htt25Q-RFP, в среднем была вчетверо меньше чем, яркость частиц HttQ25-RFP в присутствии 120QY-НА. Это указывает на то, что агрегаты Htt25Q-GFP+120QY-НА содержат в среднем 4 мономера.

### **3.7. Токсичность Htt25Q связана с истощением растворимых форм белков Sup35 и Sup45**

У дрожжей важным источником токсичности мутантного гентингина Htt103Q-GFP 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 [118, 141, 142]. Таким образом, можно было предполагать, что аналогичный механизм лежит и в основе токсического эффекта агрегатов Htt25Q-GFP, о чем также свидетельствовали результаты, полученные при изучении полимеризации белков Htt25Q-GFP и Sup35 при помощи агарозного форе́за. Электрофорез в полуденатурирующих условиях показал, что сами по себе полимеры белков полиQ/QX-НА не способны эффективно индуцировать полимеризацию Sup35 (Рис. 11). 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) [138]. Напротив, совместная продукция ряда искусственных полиQ белков совместно с белком Htt25Q-GFP, вызывающая появление амилоидов нормального гентингина, всегда приводила к появлению полимеров Sup35.

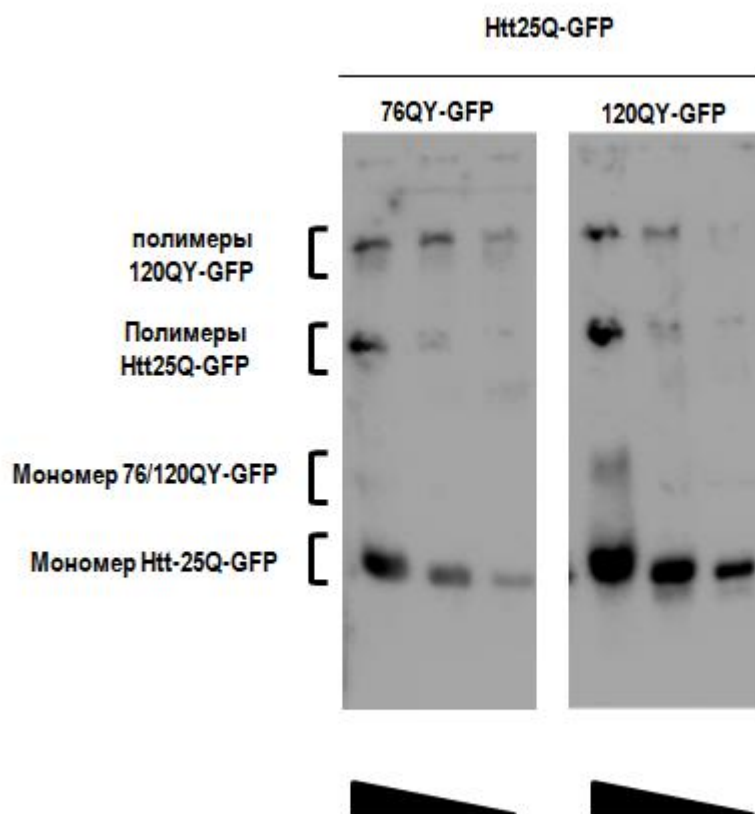
Примечательно, что помимо индукции полимеризации белка Sup35, полимеры гентингина дикого типа Htt25Q-RFP также приводили к появлению детергент-нерастворимых агрегатов некоторых других белков: Def1 (данные представлены ниже), Yir003w, Ylr278c. Важно, что данные белки колокализуются с агрегатами мутантного гентингина Htt103Q-GFP [149] и делеции соответствующих генов приводят к снятию токсичности, вызванной продукцией Htt103Q-GFP [150]. Как и в случае с белком Sup35, амилоидная полимеризация Yir003, Ylr278c, Def1 зависела от полимеров Htt25Q-RFP, но не от полимеров 120QY-НА (Рис. 18).



**Рисунок 18.** Совместная продукция белков Htt25Q-RFP и 120QY-HA приводит к переходу клеточных Q/N-богатых белков Yir003, Ylr278c в амилоидное состояние. В исследовании использовали клетки из дрожжевой GFP-коллекции, продуцирующие белки Yir003, Ylr278c, меченные GFP. В клетки трансформировали плазмиду, кодирующую белки Htt25Q-GFP и 120QY-HA, либо только 120QY-HA в качестве контроля. Индукцию синтеза Htt25Q-GFP, SDD-AGE фореиз и иммуноблотинг проводили в соответствии со стандартными методиками. Для покраски блотов использовали антитела на GFP, FLAG-эпитоп и HA тэг.



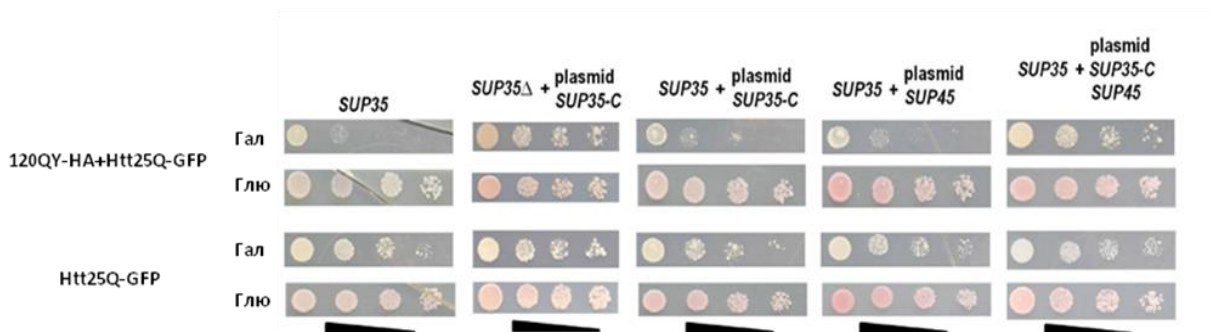
Мы предположили, что различия в кополимеризационных свойствах между амилоидами белка Htt25Q-GFP и амилоидами полиQ/QX-НА белков возникают вследствие существенной разницы в уровнях экспрессии нормального модельного гентингина и модельных полиQ белков. Уровень экспрессии Htt25Q-GFP гораздо выше, чем у 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. 19). 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 19. Сравнение количества мономеров Htt25Q-GFP и QY-белков в составе амилоидных полимеров.** Использовали дрожжевые клетки штамма 74D-694 [*psi*<sup>+</sup>] [*PIN*<sup>+</sup>], 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 иммуноблотинг 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. Количество 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.

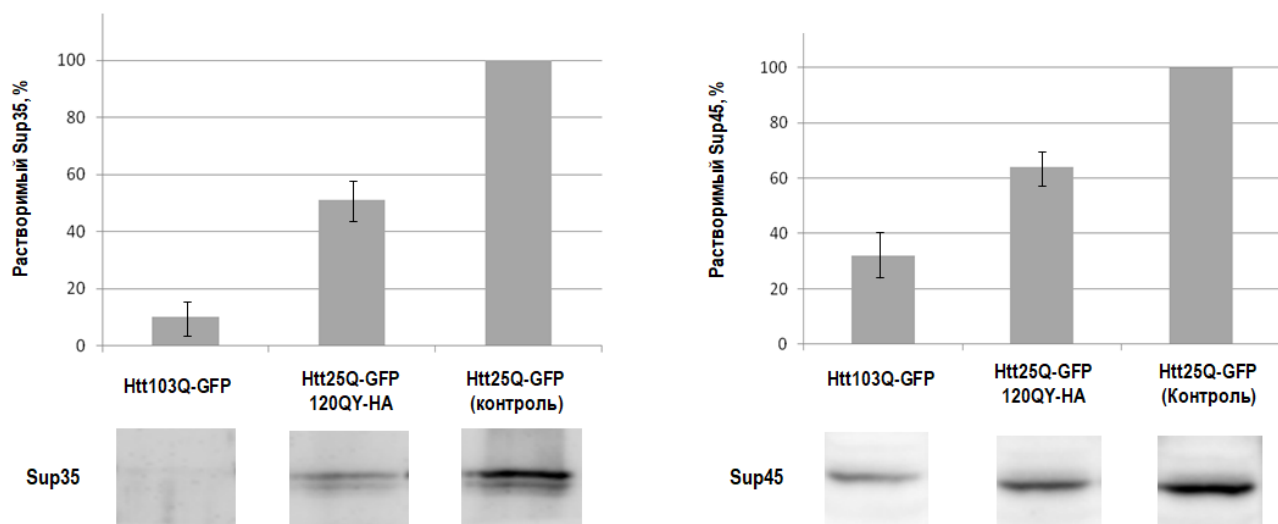
Таким образом, различия в эффективности кополимеризации амилоидами белков полиQ/QX и Htt25Q-GFP белка Sup35 остаются неясными. Возможно, различие в кополимеризационных свойствах этих белков связано с N-концевой последовательностью Htt25Q-GFP (FLAG-эпитоп вместе с 17 аминокислотами, кодирующие начало 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*<sup>-</sup>][*PIN*<sup>+</sup>] была продуцирована неагрегирующая форма белка Sup35, которая лишена NM доменов (Sup35C), вместо полноразмерного белка. Нами было показано, что замена полноразмерного белка Sup35 на его C-домен, приводит к снятию токсического эффекта полимеров HttQ25-GFP (Рис. 20).



**Рисунок 20. Токсичность полимеров Htt25Q-GFP связана с истощением жизненно важных факторов терминации Sup35 и Sup45.** Использовали дрожжевые клетки штамма 74-D694 [*psi*<sup>-</sup>][*PIN*<sup>+</sup>], содержащие плазмиду, кодирующую последовательности одновременно двух белков 120QY-НА и Htt25Q-GFP, или клетки, содержащие плазмиду, кодирующую белок Htt25Q-GFP. Также использовали клетки штамма 74-D694 [*psi*<sup>-</sup>][*PIN*<sup>+</sup>] с делецией гена *SUP35*, прикрытую автономной центромерной 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*+*120YQ-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*<sup>-</sup>][*PIN*<sup>+</sup>] дикого типа. Продукция белков Htt25Q-GFP и 120QY-НА в штамме 74-D694 [*psi*<sup>-</sup>][*PIN*<sup>+</sup>]  $\Delta$ *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 Sup35С с белком Sup35 дикого типа не приводила к улучшению роста клеток, которые продуцировали Htt25Q-GFP и 120QY-НА. 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 [118]. Действительно, как и в случае с мутантным гентингином Htt103Q-GFP, полимеры белка Htt25Q-GFP вызывали истощение активного пула растворимых Sup35 и Sup45, хотя и в меньшей степени (Рис. 21).



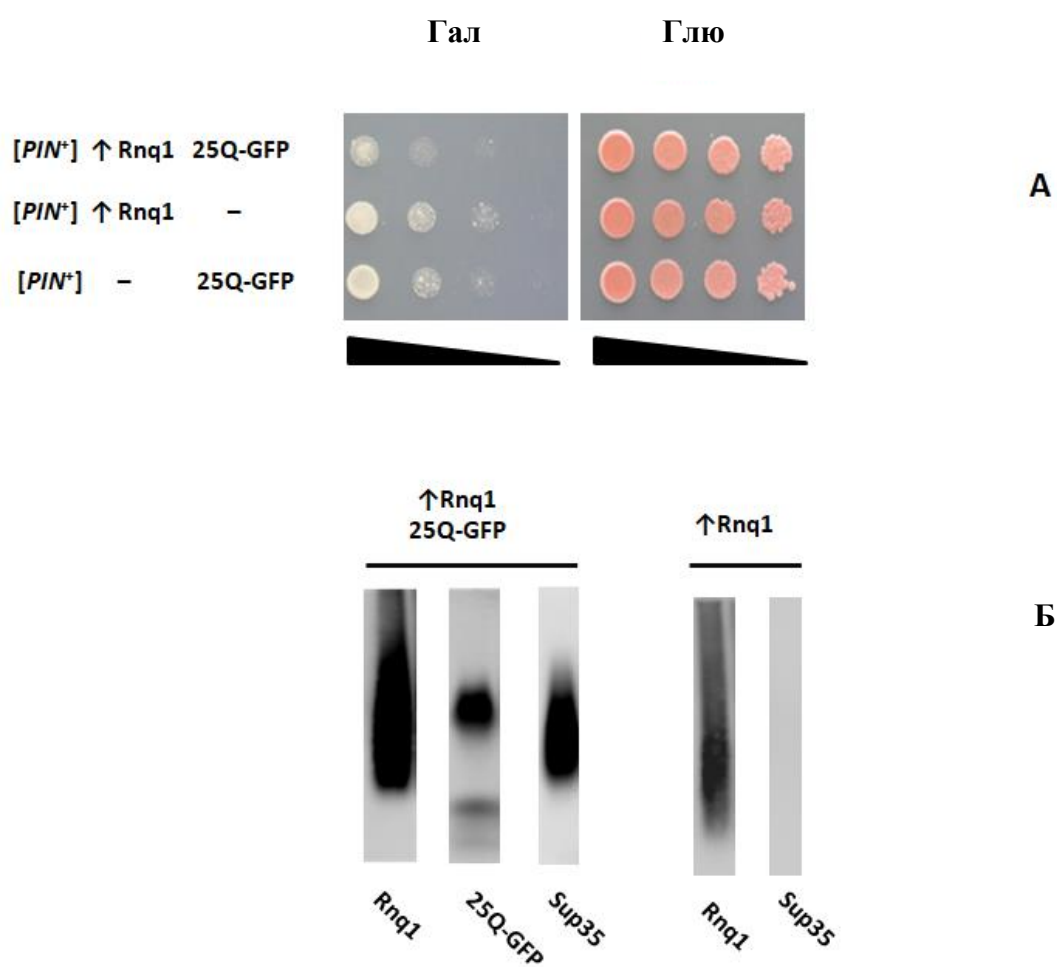
**Рисунок 21. Анализ количества растворимых форм белков Sup35 и Sup45 в присутствии Htt103Q-GFP, агрегированной и растворимой формы белка Htt25Q-GFP.** Дрожжевые клетки штамма 74-D694 [*psi*<sup>-</sup>][*PIN*<sup>+</sup>], несущие плазмиды, кодирующие белки Htt103-GFP, Htt25Q-GFP+120QY-HA или Htt25Q-GFP 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 фореаза 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-HA. 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 гентингина, сверхпродукция Sup45 не снимала токсический эффект нормального гентингина. Только одновременная сверхпродукция Sup35C и Sup45 в штамме с геном SUP35 дикого типа, продуцирующим Htt25Q-GFP вместе с 120QY-HA, приводила к частичному снятию токсического эффекта нормального гентингина (Рис. 20).

### **3.8. Сверхпродукция прионного белка Rnq1 приводит к агрегации и токсичности белка Htt25Q-GFP в клетках с фенотипом [*PIN*<sup>+</sup>]**

Как было отмечено выше, [*PIN*<sup>+</sup>] 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*<sup>+</sup>] клетках. Это подтверждается тем, что полимеры белка Pub1 - дрожжевого белка, имеющего Q/N-богатый домен, возникают в [*PIN*<sup>+</sup>] клетках только в случае

повышенных уровней экспрессии как Rnq1, так и Pub1 [138]. Аналогичная ситуация наблюдается и для белка Htt25Q-GFP, который эффективно полимеризуется и вызывает токсичность в [*PIN*<sup>+</sup>] клетках на фоне сверхпродукции Rnq1. Как и в предыдущих случаях, здесь полимеризация Htt25Q-GFP сопровождается появлением полимеров белка Sup35 (Рис. 22).



**Рисунок 22. Белок Htt25Q-GFP агрегирует и вызывает токсичность в [*PIN*<sup>+</sup>] клетках на фоне сверхпродукции белка Rnq1.** А) Рост клеток дрожжей штамма 74-D694 [*psi*<sup>-</sup>][*PIN*<sup>+</sup>], 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).

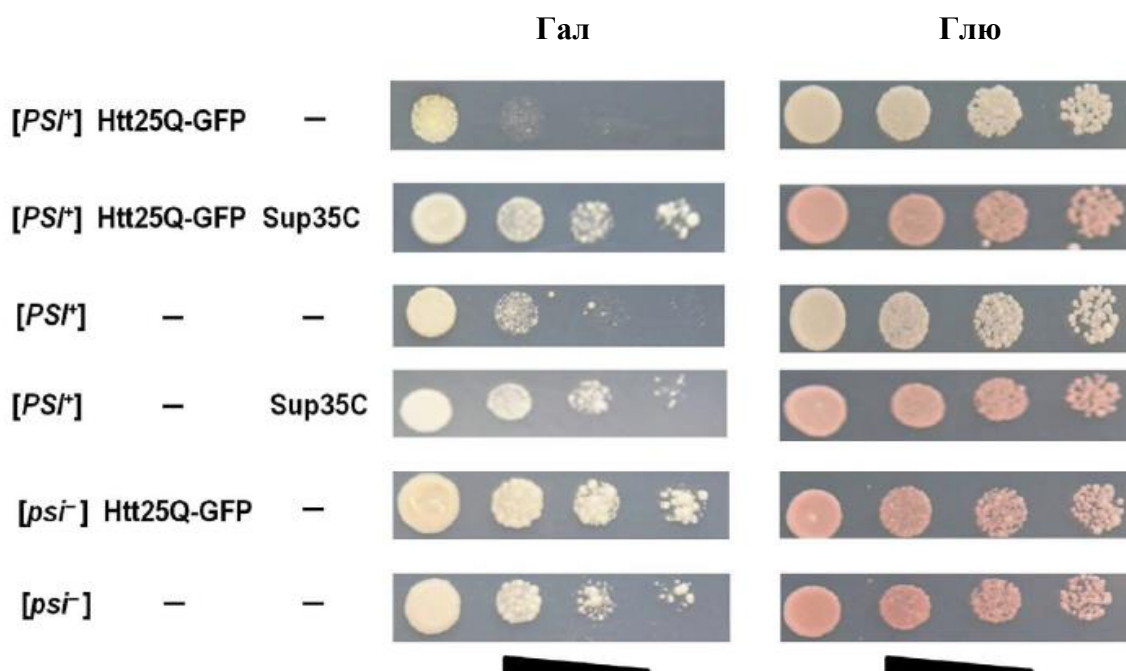


Интересно, что полимеры Sup35 не возникают в [*PIN*<sup>+</sup>] клетках, сверхпродуцирующих Rnq1, в отсутствие Htt25Q-GFP, что подтверждает тот факт, что полимеризация Sup35 зависит исключительно от Htt25Q-GFP.

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*<sup>+</sup>] клетках на фоне сверхпродукции белка Rnq1, прежде всего, связан с инактивацией факторов терминации трансляции Sup35 и Sup45.

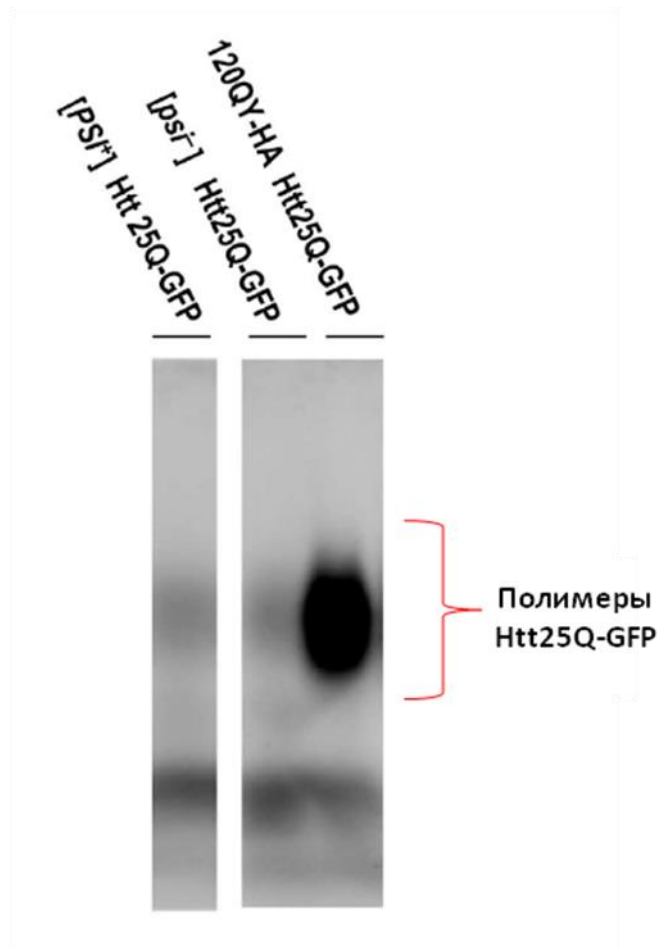
### 3.9. Растворимый Htt25Q-GFP может проявлять токсичность в неоптимальных для роста условиях

Не только  $[PIN^+]$  фенотип, но и  $[PSI^+]$  вызывает токсичность мутантного гентингина Htt103Q-GFP [131]. 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. 23).



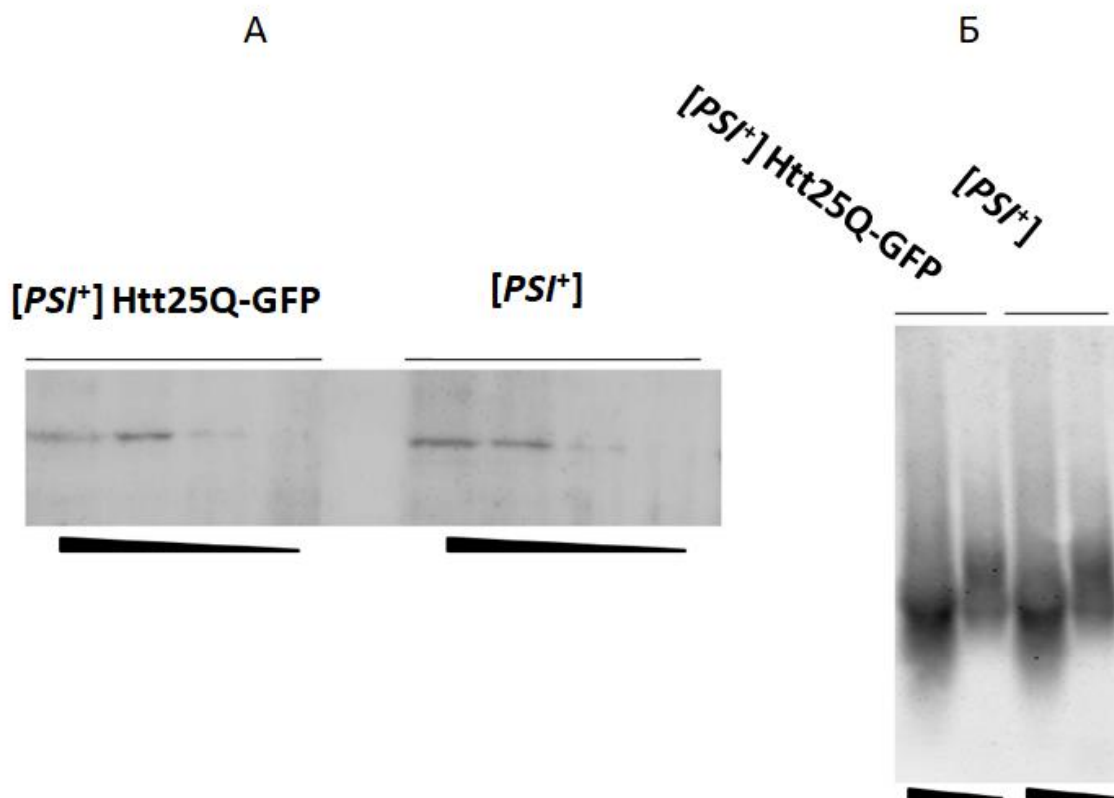
**Рисунок 23. Продукция Htt25Q-GFP в  $[PSI^+]$  клетках приводит к цитотоксичности.** В клетки штамма дрожжей 74-D694  $[PSI^+][PIN^+]$  вводили одну из двух плазмид pQ25-GFP или pYES2. Затем в получившиеся трансформанты вводили либо центромерную плазмиду, кодирующую С-концевой домен белка Sup35, либо пустой вектор (-). В качестве контроля использовали производный от первого штамма штамм дрожжей 74-D694  $[psi^-][PIN^+]$ , в одном случае несущий плазмиды pQ25-GFP и Yер1ac181, в другом pYES2 и Yер1ac181 (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). Все процедуры выполняли в соответствии с методиками, описанными в разделе “Материалы и методы”.

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. 24).



**Рисунок 24. Белок Htt25Q-GFP не образует ДСН-устойчивых полимеров в штаммах дрожжей 74-D694 *[PSI<sup>+</sup>][PIN<sup>+</sup>]* и 74-D694 *[psi<sup>-</sup>][PIN<sup>+</sup>]*.** Для исследования брали клетки дрожжей штамма 74-D694 *[PSI<sup>+</sup>][PIN<sup>+</sup>]* и 74-D694 *[psi<sup>-</sup>][PIN<sup>+</sup>]*, содержащие плазмиду, кодирующую белок Htt25Q-GFP. В качестве позитивного контроля использовали клетки несущие плазмиду рYES2-120QY-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). Все процедуры проводили в соответствии с протоколами, указанными в разделе “Материалы и методы”.

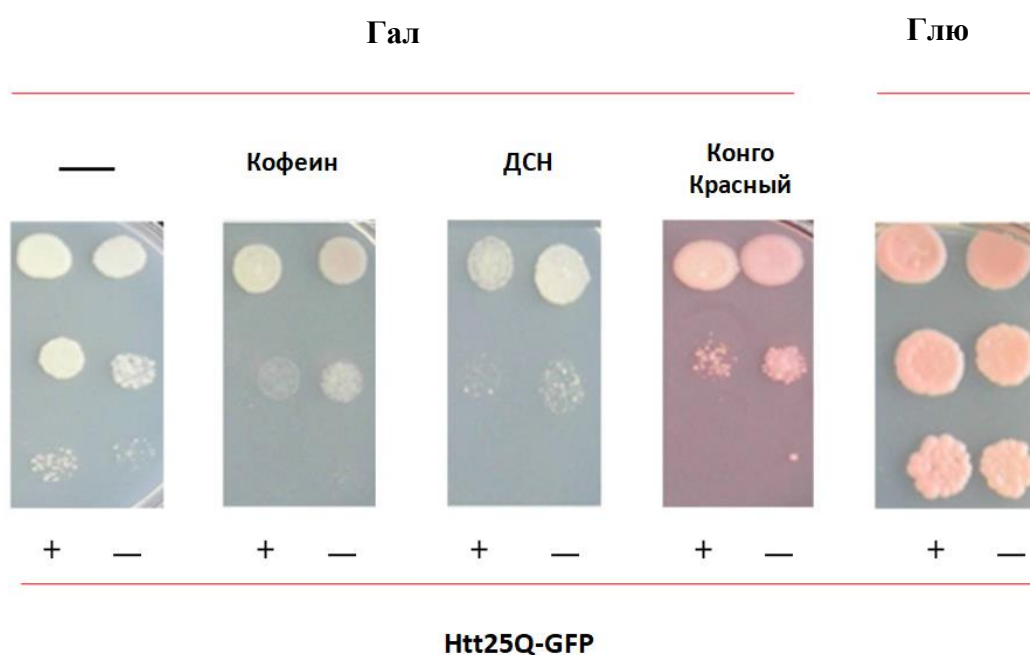
Чтобы объяснить причины замедления роста клеток, мы предположили, что нормальный гентингтин Htt25Q-GFP, не агрегируя сам, вызывает усиление агрегации белка Sup35 в составе прионных амилоидов. Однако это предположение не подтвердилось, так как экспрессия Htt25Q-GFP в *[PSI<sup>+</sup>]* клетках не уменьшала уровень растворимого Sup35 и не увеличивала количества его полимеров (Рис. 25).



**Рисунок 25. Продукция белка Htt25Q-GFP в [PSI<sup>+</sup>] клетках не влияет на количество белка Sup35, находящегося в растворимой и агрегированной форме.** Лизаты клеток дрожжей 74-D694 [PSI<sup>+</sup>][PIN<sup>+</sup>] 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 клетки [PSI<sup>+</sup>] растут медленнее, чем [psi<sup>-</sup>], при этом именно среда с галактозой используется для индукции экспрессии Htt25Q-GFP (Рис. 23), и эффект замедления роста становится более выраженным при продукции в клетках [PSI<sup>+</sup>] 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. 26), при этом не наблюдается агрегации Htt25Q-GFP.

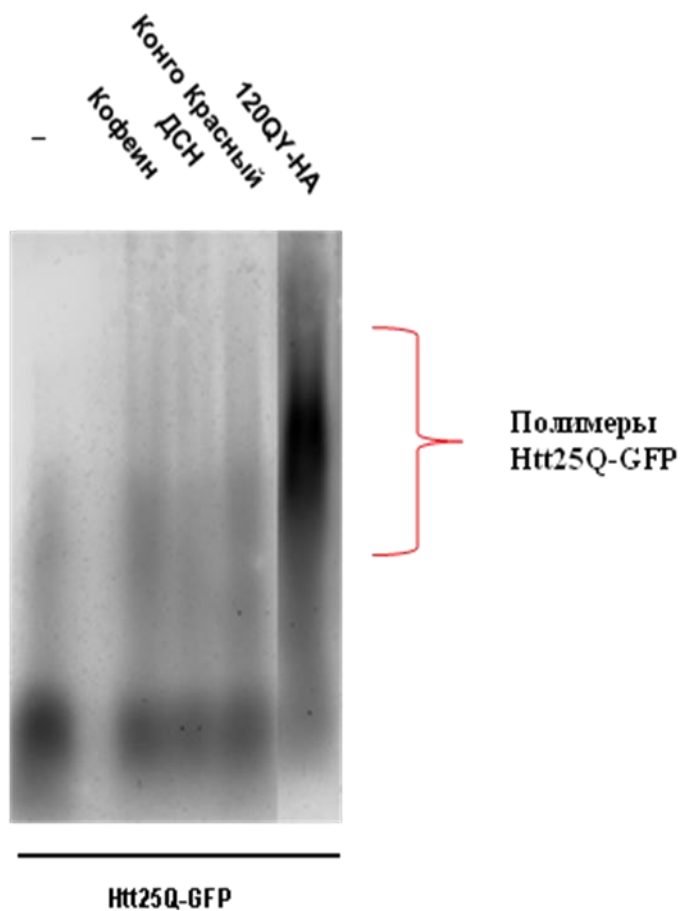
Полученные данные показывают, что растворимая форма белка Htt25Q-GFP может вызывать токсичность в дрожжевых клетках, однако неясно связана ли эта токсичность с наличием полиглютаминовой области или же токсичность связана с GFP или просто тем фактом, что некий белок продуцируется на высоком уровне. Ген, кодирующий белок Htt25Q-GFP находится под контролем сильного галактозного промотера, 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 [212, 213]. Поэтому можно предположить, что высокие уровни продукции GFP-меченых белков могут оказывать токсическое действие на дрожжевые клетки.



**Рисунок 26. Растворимая форма белка Htt25Q-GFP может быть токсична в условиях, неоптимальных для роста клеток дрожжей.** Дрожжевые клетки штамма 74-D694 [*psi*][*PIN*<sup>+</sup>], содержащие плазмиду p25Q-GFP или пустой вектор, выращивали на селективной среде с глюкозой и затем переносили на 3 часа на среду с раффинозой для дерепрессии галактозного промотера. 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. 27).

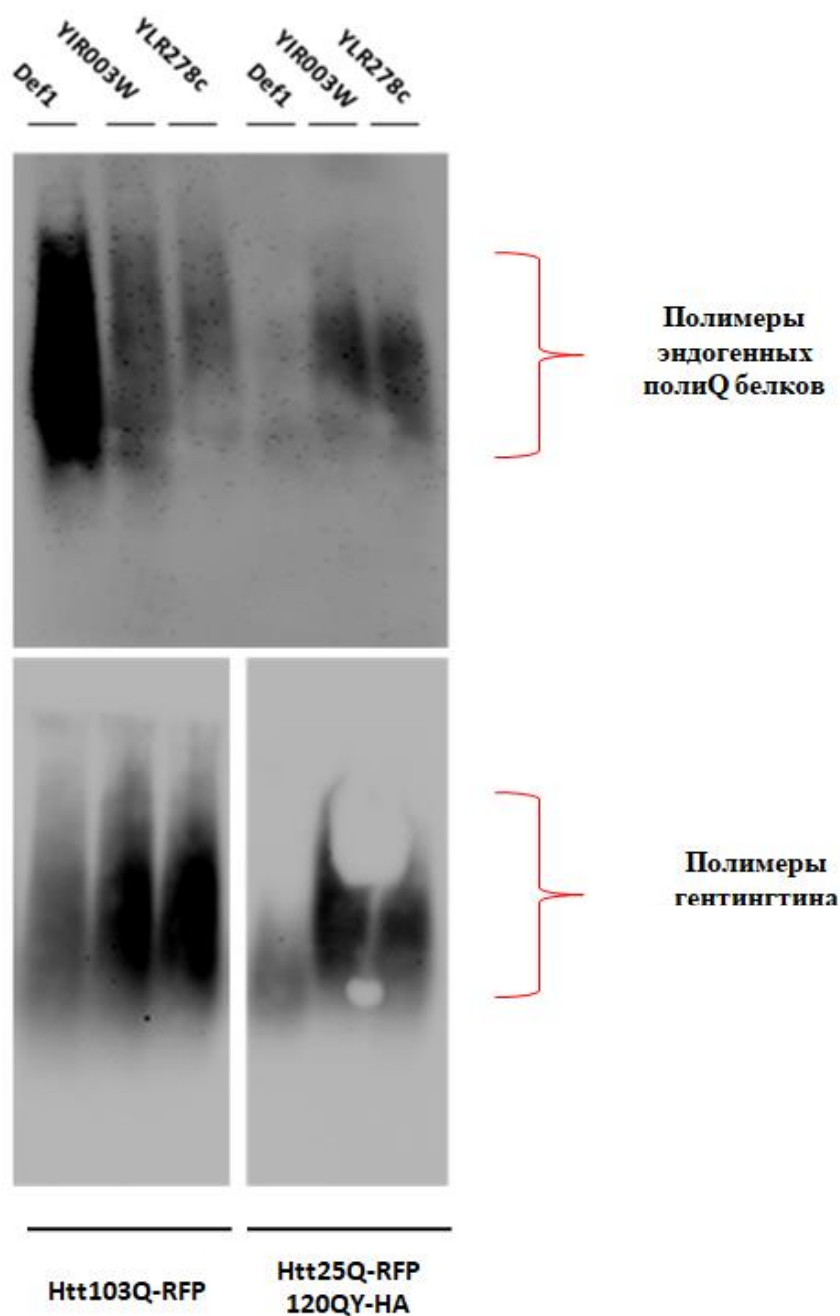


**Рисунок 27. Белок Htt25Q-GFP не образует амилоидных полимеров при росте на среде с галактозой в присутствии ДСН, кофеина или Конго Красного.** Дрожжевые клетки штамма дрожжей 74-D694 [*psi<sup>-</sup>*][*PIN<sup>+</sup>*], содержащие плазмиду p25Q-GFP, выращивали на селективной среде с глюкозой, затем 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.

### **3.10. Полимеры мутантного и нормального гентингина по-разному индуцируют полимеризацию глутамин богатых белков**

Как уже было отмечено выше, Duenwald M. с соавторами [149] продемонстрировали, что полиглутаминовые белки – Def1, Yir003w, Ylr278c - колокализуются с агрегатами мутантного гентингина Htt103Q. Помимо этого, Нижниковым с соавторами было показано, что белок Def1 дикого типа образует амилоидные полимеры при сверхпродукции белка HttQ103 в штамме 74-D694 [140]. Также известно, что делеция генов *YIR003* и *YLR278c* существенно снижает количество агрегированного белка Htt103Q, уменьшая токсический эффект. Делеция гена *DEF1* не влияет на количество агрегированного Htt103Q, но также приводит к снятию токсичности в клетках, сверхпродуцирующих белок Htt103Q [149, 150]. Так как белки Def1, Yir003w, Ylr278c принимают участие в агрегации и токсичности мутантного гентингина, было решено подробнее изучить природу белок-белковых взаимодействий, формируемых данными белками в присутствии амилоидов Htt103Q, и выяснить, будут ли данные белки переходить в амилоидное состояние в присутствии амилоидов Htt25Q. Было установлено, что белки Def1, Yir003w, Ylr278c образуют ДСН-устойчивые комплексы в присутствии как амилоидов белка Htt103Q-RFP, так и амилоидов белка Htt25Q-RFP (Рис. 28).





**Рисунок 28.** Полимеры мутантного и нормального гентингина индуцируют переход в амилоидное состояние белков Def1, Yir003w и Ylr278c с разной эффективностью. В клетки дрожжей штамма BY4741, продуцирующие указанные белки, слитые с GFP, трансформировали плазмиду p103Q-RFP или p25Q-RFP. Клетки выращивали в жидкой селективной среде с глюкозой, переносили на 3 часа на среду с раффинозой и индуцировали синтез рекомбинантных белков на среде с галактозой. Лизаты клеток были подвергнуты SDD-AGE анализу. Агрегацию белков исследовали при помощи иммуноблотинга. Покраску блотов производили с использованием поликлональных антител на GFP и Flag-эпитоп. Все эксперименты проводили в соответствии с протоколами, описанными в разделе “Материалы и методы”.

Можно отметить, что амилоиды Htt103-RFP и Htt25Q-RFP с разной эффективностью индуцировали полимеризацию белков, слитых с GFP: амилоиды белка Htt103Q-RFP лучше индуцировали амилоидную полимеризацию белка Def1, амилоиды Htt25Q-RFP – белков Yir003w и Ylr278c. Этот результат может говорить о том, что длина полиглутаминового фрагмента белка гентингина в некоторых случаях может не является определяющим критерием для эффективной индукции полимеризации какого-либо амилоидогенного белка. Нами продемонстрировано, что амилоиды, образованные белком Htt25Q-RFP, могут быть лучшими индукторами амилоидной полимеризации, чем амилоиды Htt103Q-RFP. Механизмы, лежащие в основе данного явления, не ясны. Если предположить что у амилоидов белков с длинными полиQ доменами, площадь кополимеризующей поверхности больше, чем у амилоидов коротких полиQ белков, то можно сделать вывод, что в некоторых случаях основную роль в индукции полимеризации играет не площадь поверхности “фибриллы-индуктора”, а сродство этой поверхности к белковой молекуле конкретного белка, которое может определяться типом укладки “фибриллы индуктора”, третичной структурой кополимеризуемого амилоидогенного белка и молекулярным микроокружением. С другой стороны, различия в кополимеризационных свойствах амилоидов Htt103Q и Htt25Q могут возникать в результате различающейся компарментализации агрегатов данных белков. То есть амилоидные агрегаты белка Htt103 и белка Htt25Q могут располагаться в “разных местах” клетки и вследствие этого в большей или меньшей степени иметь доступ к кополимеризуемым ими белкам.

Следует также отметить, что согласно результатам, представленным на рисунке 28, амилоиды Htt103RFP с разной эффективностью индуцируют полимеризацию трех разных белков, то же самое наблюдается для амилоидов Htt25Q-RFP. Это можно объяснить тем, что эффективная полимеризация одного из этих белков на поверхности амилоидов гентингина может мешать другим белкам переходить в амилоидное состояние, демонстрируя феномен амилоидной интерференции.

Таким образом, мы охарактеризовали механизм токсичности амилоидов Htt25Q-GFP. Этот механизм токсичности с некоторыми особенностями также характерен для патологических амилоидов белка Htt103-GFP.

На сегодняшний день известно множество механизмов, которые описывают токсичность амилоидов мутантного гентингина в дрожжевых клетках. Поскольку в основе некоторых из них лежат взаимодействия между амилоидогенными белками, было решено изучить взаимосвязь между такими механизмами.

Выбор именно мутантного гентингина Htt103Q, а не белка Htt25Q с какой-либо затравкой (например, 120QY-NA), объясняется несколькими причинами: во-первых,

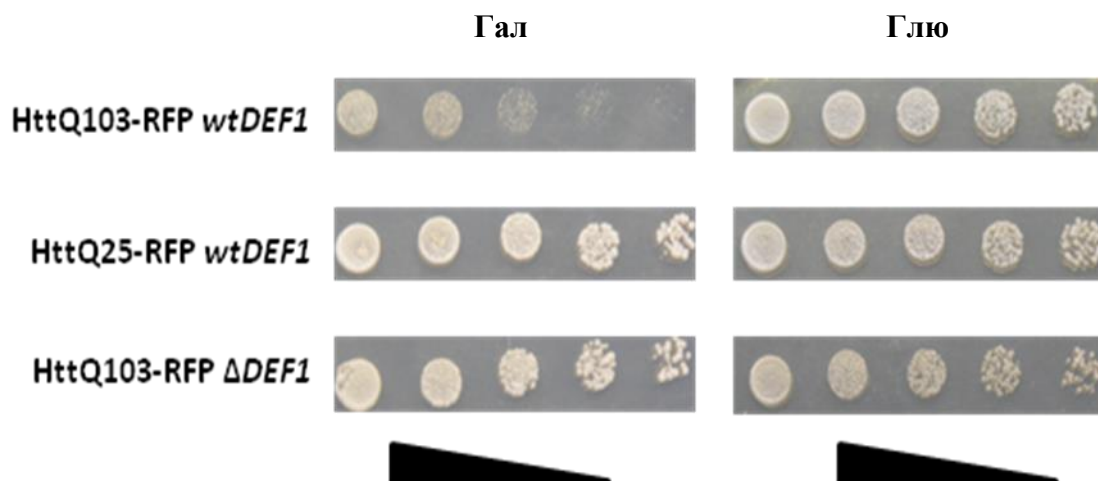
сверхпродукция мутантного гентингина Htt103Q имеет более выраженный фенотип, чем сверхпродукция белка Htt25Q в присутствии затравочных полимеров, во-вторых, моделирование болезни Гентингтона в дрожжах с использованием сверхпродукции белка Htt103Q удобнее, по сравнению с системой токсичности, основанной 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 гентингина Htt103Q больше, чем для нормального гентингина (токсичность Htt25Q впервые была показана в данной диссертационной работе).

## **Механизмы токсичности гентингтина отличаются для разных штаммов**

### **3.11. 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 [118, 141, 142]. 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 [150].

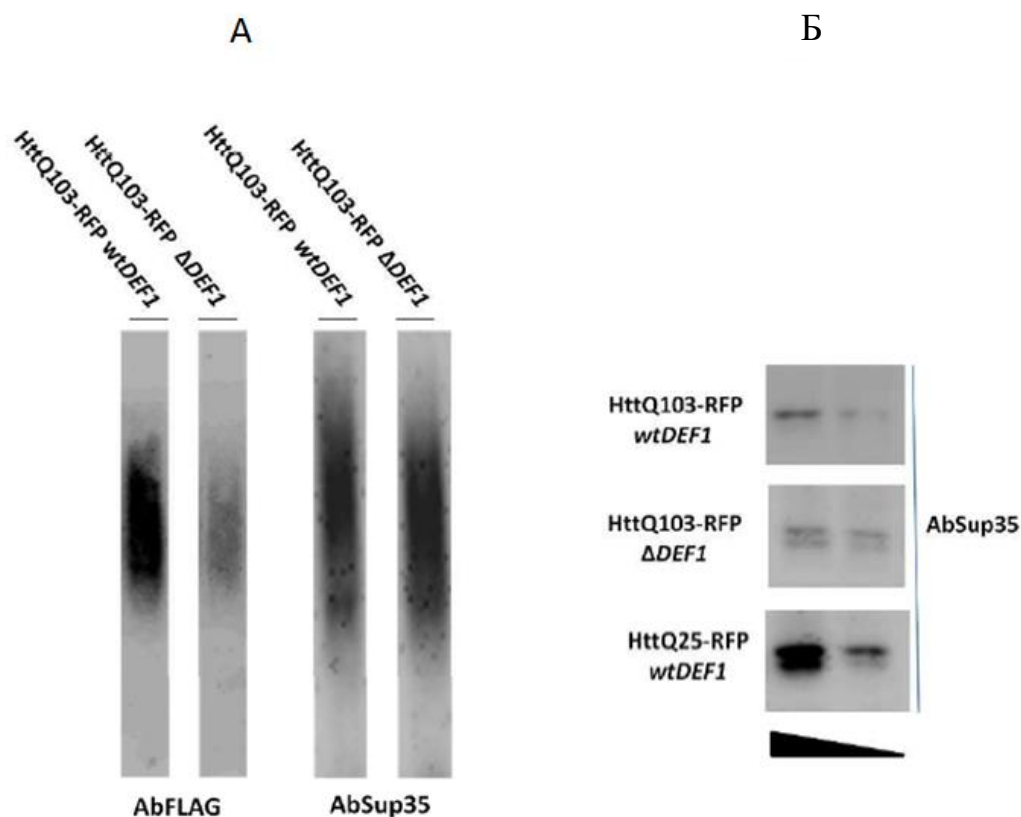
Чтобы изучить причину снятия токсического эффекта, связанного со сверхпродукцией белка Htt103Q в клетках дрожжей с делециями генов *DEF1*, *YIR003w*, *YLR278c*, необходимо было воспроизвести данный результат. Работая со штаммом BY4742, который отличается от штамма BY4741 только типом спаривания, мы смогли воспроизвести этот эффект только для делеции гена *DEF1* (Рис. 29).



**Рисунок 29.** Делеция гена *DEF1* снимает токсичность, вызванную сверхпродукцией белка Htt103Q-RFP в штамме BY4742. Клетки штамма BY4742 дикого типа и с делецией гена *DEF1* трансформировали плазмидами p103Q-RFP и p25Q-RFP. Клетки выращивали в жидкой селективной среде, дерепрессировали галактозный промотор на среде с раффинозой в течение 12 часов. 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). Все описанные процедуры проводили в соответствии с методиками представленными в разделе “Материалы и методы”.

По литературным данным известно, что белок Def1 коагрегирует с амилоидами гентингина [149], 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.

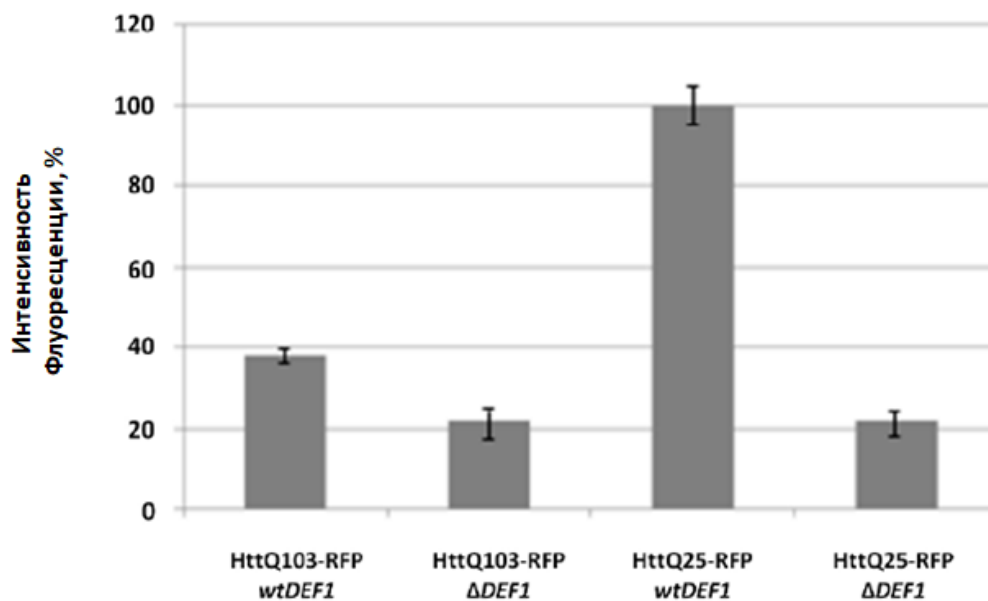
Однако, оказалось, что делеция гена *DEF1* значительно уменьшает количество ДСН-устойчивых полимеров Htt103-RFP и не оказывает влияния на количество ДСН-устойчивой и растворимой фракций белка Sup35 (Рис. 30).



**Рисунок 30.** Делеция гена *DEF1* в штамме BY4742 приводит к уменьшению количества ДСН-устойчивых полимеров белка Htt103-RFP, при этом не влияя на количество полимеров белка Sup35. В анализ брали клетки штамма BY4742 дикого типа и с делецией гена *DEF1*, содержащие плазмиду p103Q-RFP (Штамм BY4742 дикого типа, содержащий плазмиду 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 иммуноблотинга (антитела на Flag-эпитоп и NM-домены Sup35). Б) Измерение количества растворимой формы белка Sup35 проводили с помощью полиакриламидного электрофореза и иммуноблотинга (антитела на NM-домены белка Sup35). Лизаты клеток перед нанесением на полиакриламидный гель не кипятили, что позволяло увидеть только растворимую фракцию белка Sup35 [139, 168]. Представлены лизаты, разведенные в 1 и 3 раза. Белок Sup35 бежит на фореже двумя полосами. Нижняя полоса представляет из себя форму этого белка, подвергшуюся протеолизу [178]. Все процедуры проводили в соответствии с протоколами, представленными в разделе “Материалы и методы”.

Уменьшение количества амилоидов HttQ103-RFP в клетках штамма дрожжей BY4742  $\Delta DEF1$  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 ВУ4742  $\Delta DEF1$ . 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. 31).



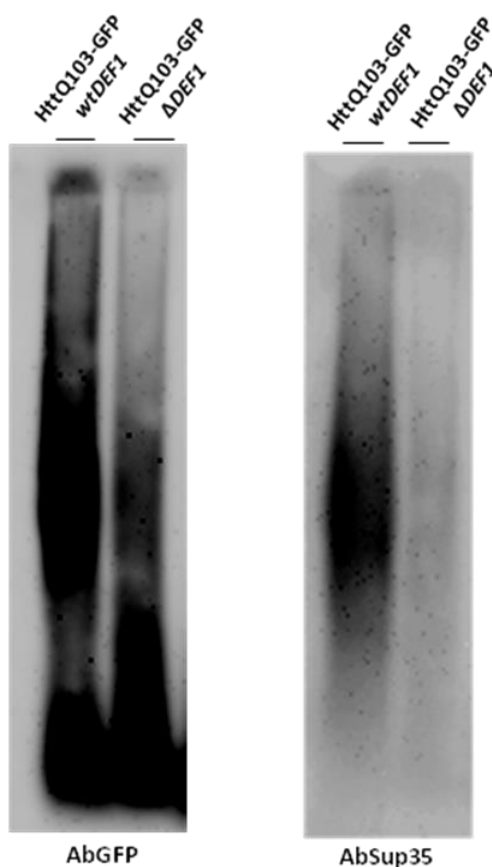
**Рисунок 31. Делеция гена *DEF1* приводит к снижению общего количества белков Htt103Q-RFP и Htt25Q-RFP.** В анализ брали клетки штамма дрожжей BY4742 дикого типа и с делецией гена *DEF1* и трансформировали в них плазмиды p103Q-RFP и p25Q-RFP. Клетки выращивали в жидкой селективной среде с глюкозой, 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 в соответствии с методикой, описанной в разделе “Материалы и методы”.

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



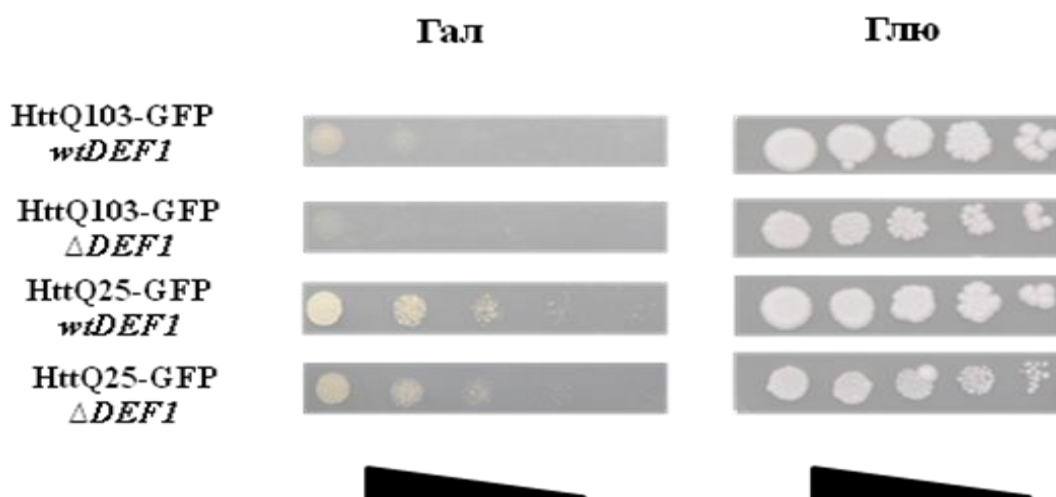
### 3.12. Делеция *DEF1* в штамме 74-D694 уменьшает количество детергент-устойчивых агрегатов белков Htt103Q и Sup35, но не приводит к снятию токсического эффекта

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. Это показано на рисунке 32.



**Рисунок 32.** 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.

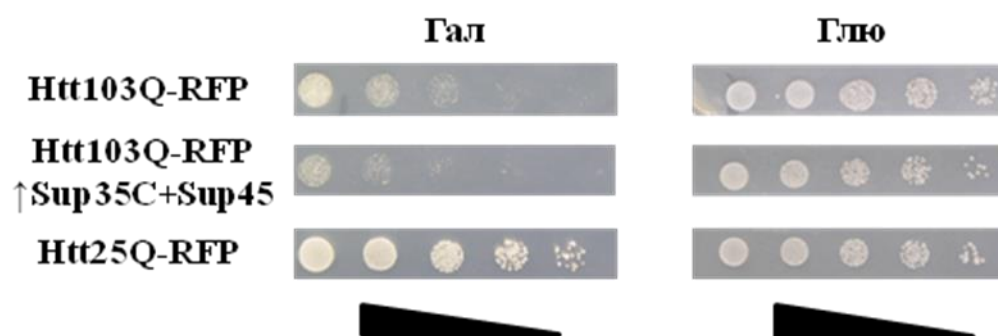
Данное противоречие объясняется тем, что делеция гена *DEF1* в штамме 74D-694 ингибирует рост клеток, так как клетки экспрессирующие нетоксичную версию гентингина HttQ25-GFP и несущие делецию *DEF1*, растут медленнее, чем клетки дикого типа, как на среде с галактозой, так и на среде с глюкозой. Поэтому при продукции мутантного гентингина Htt103Q-GFP в штамме 74D-694  $\Delta DEF1$  происходит сложение токсических эффектов: первого, связанного с делецией *DEF1* и второго, вызванного сверхпродукцией мутантного гентингина Htt103Q-GFP (Рис. 33). 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 гентингина 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 33. 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.

### **3.13. 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, продуцирующей мутантный гентингин, 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 [118]. Однако, как было описано выше, делеция гена *DEF1* в штамме BY4742 приводила к снятию токсичности мутантного гентингина, не уменьшая количества амилоидных полимеров белка Sup35 и не влияя на уровень растворимого белка Sup35. Данное наблюдение говорит о том, что механизмы токсичности мутантного гентингина различаются для разных штаммов. Чтобы дополнительно подтвердить наше предположение, мы одновременно сверхпродуцировали Sup35C и Sup45 в штамме BY4742, в котором экспрессировался мутантный гентингин HttQ103-RFP. Оказалось, что сверхпродукция этих белков в штамме BY4742 не приводит к снятию токсичности HttQ103-RFP, в отличие от штамма 74-D694 (Рис. 34).



**Рисунок 34. Одновременная сверхпродукция С-домена белка Sup35 и белка Sup45 не приводит к снятию токсичности, вызванной сверхэкспрессией гена мутантного гентингина 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 32.

## Глава 4. Обсуждение

### 4.1. Белок Htt25Q-GFP может агрегировать и приводить к замедлению роста клеток дрожжей в присутствии амилоидов других белков

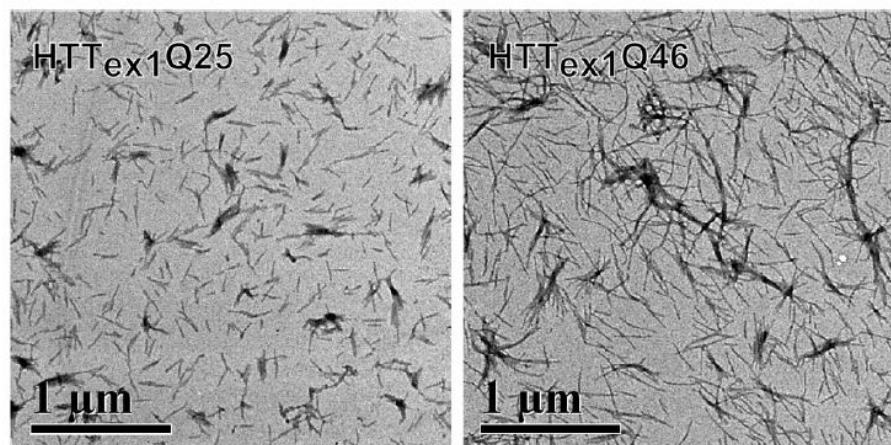
Ранее считалось, что белковый продукт первого экзона гена гентингтна с коротким полиглутаминовым доменом (Htt25Q-GFP) не может переходить в амилоидное состояние и вызывать токсичность у дрожжей. Однако в нашей лаборатории было показано, что белок Htt25Q-GFP образует следовые количества ДСН-нерастворимых агрегатов в [*PIN*<sup>+</sup>] клетках, и поэтому было решено подробнее исследовать агрегационные и цитотоксические свойства белка Htt25Q-GFP.

Начальный этап исследований основывался на результатах, полученных в нашей и других лабораториях, согласно которым амилоиды некоторых белков, имеющих Q/N-богатые домены, могут служить индукторами полимеризации множества других белков, имеющих Q/N-богатые области [118, 120, 131, 138, 140, 144].

Мы обнаружили, что белок Htt25Q-GFP образует ДСН-устойчивые агрегаты в присутствии амилоидов ряда искусственных полиглутаминовых белков (76QY-НА/GFP, 85Q-НА, 91QV-НА, 131Q-НА, 120QY-НА/GFP, 101QT-НА), а также прионных амилоидов белка Rnq1 на фоне его сверхпродукции. Амилоидные полимеры белка Htt25Q-GFP возникают только благодаря постоянному взаимодействию мономерного Htt25Q-GFP с амилоидными матрицами глутамин-богатых белков. Это согласуется с данными флуоресцентной корреляционной спектроскопии и данными, полученным при помощи ПААГ-фореза с докипячиванием, говорящими о небольшом числе молекул Htt25Q-GFP в амилоидном агрегате, а также подтверждается одинаковым размером полимеров искусственных полиглутаминовых белков и белка Htt25Q-GFP.

Агрегаты белка Htt25Q-GFP, в свою очередь, могут индуцировать переход ряда Q/N-богатых белков, в частности белка Sup35, в агрегированное состояние, что в совокупности с устойчивостью к обработке ДСН указывает на их амилоидную природу.

Кроме того, дополнительным подтверждением того, что агрегаты HttQ25 образуют амилоидные полимеры, является работа, опубликованная в 2017 году Isas с соавторами. Исследователями было продемонстрировано, что амилоиды белка Htt46Q могут индуцировать полимеризацию белка Htt25Q *in vitro*, и амилоидные полимеры Htt25Q, полученные таким образом, могут ускорять переход белка Htt46Q в амилоидное состояние (Рис. 35).

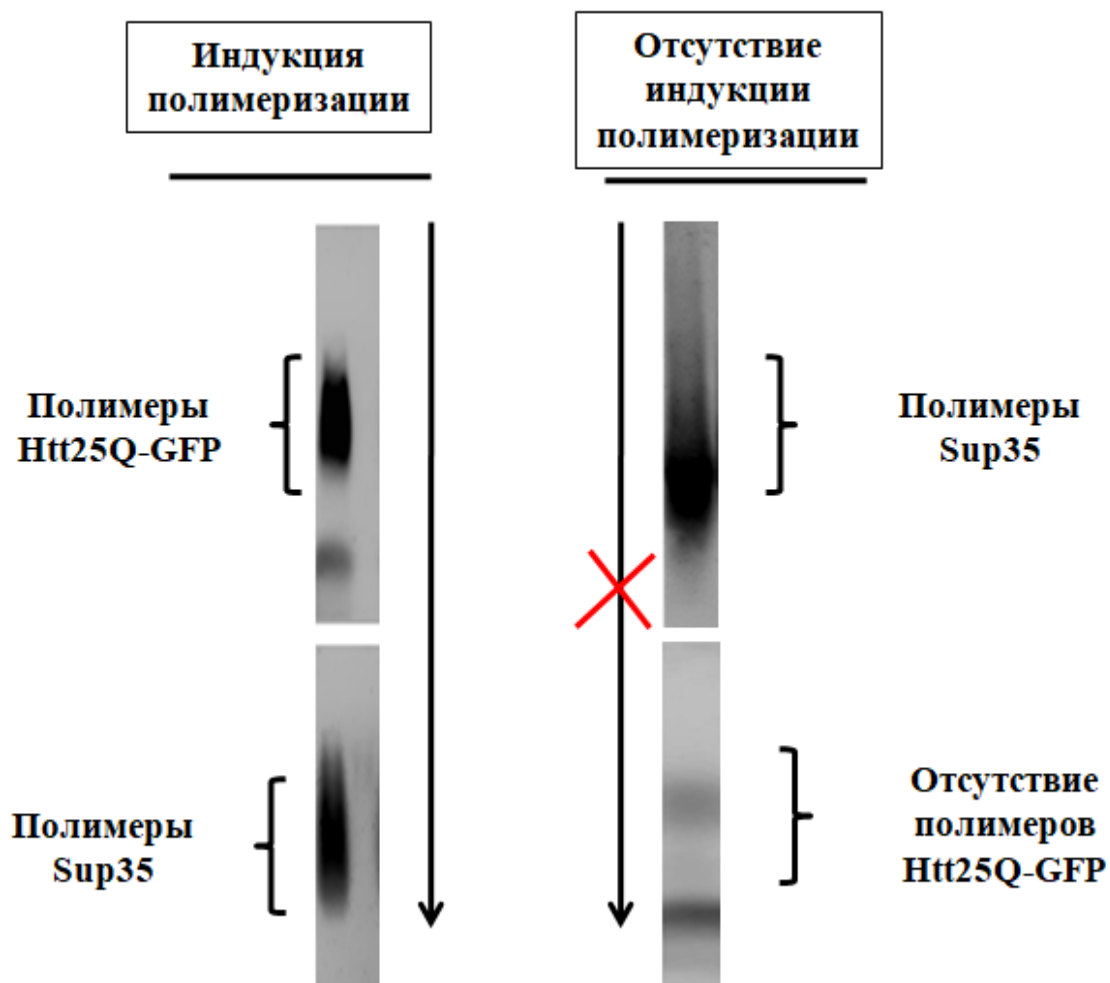


**Рисунок 35. Фибриллы белков Htt25Q и Htt46Q полученные *in vitro*.** Фибриллы Htt25Q получены при помощи индукции полимеризации белка Htt25Q фибриллами Htt46Q. Амилоидные фибриллы Htt46Q получены при помощи индукции полимеризации белка Htt46Q с использованием фибрилл, образованных белком Htt25Q [179].

Было также показано, что белок Htt25Q в полимерном виде присутствует в составе полимеров Htt46Q, однако в очень небольшом количестве. Данный результат мы показали и в нашей работе (см. ниже). Кроме того, при использовании методов твердотельного ядерного магнитного резонанса и электронного парамагнитного резонанса было обнаружено, что амилоидные ядра амилоидных фибрилл, образуемых двумя этими белками, структурно схожи, но амилоидное ядро фибрилл, образованных белком Htt25Q, менее протяженно [179].

Амилоидная агрегация белка Htt25Q-GFP в дрожжевых клетках приводит к токсическому эффекту, что было впервые показано для белка, имеющего короткий полиглутаминовый домен. Совместная продукция белков 76QY-GFP/HA, 131Q-GFP/HA, 141Q-GFP/HA, 120QY-GFP/HA, 101QT-GFP/HA, 96QW-GFP или 110QS-GFP вместе с белком Htt25Q-GFP приводила к замедлению роста клеток. При этом токсичность агрегатов этого белка возникает по механизму, ранее продемонстрированному для мутантного гентингина, в основе которого лежит амилоидная агрегация белка Sup35 в присутствии полимеров гентингина [118] (описано ниже).

Стоит отметить, что в отличие от прионных амилоидов Rnq1, прионные амилоиды белка Sup35([PSI<sup>+</sup>]), не индуцируют полимеризацию Htt25Q-GFP. Таким образом, можно наблюдать эффект асимметрии в индукции амилоидной полимеризации белков: агрегаты Htt25Q-GFP индуцируют амилоидную полимеризацию белка Sup35, но прионные амилоиды белка Sup35 не приводят к образованию амилоидных полимеров белка Htt25Q-GFP (Рис. 36).



**Рисунок 36. Эффект асимметрии амилоидной полимеризации.** Амилоидные фибриллы белка Htt25Q-GFP индуцируют переход белка Sup35 в амилоидное состояние, амилоиды белка Sup35 не способствуют амилоидной агрегации белка Htt25Q-GFP.

Таким образом, в данной работе мы продемонстрировали, что белок Htt25Q, ранее считавшийся неагрегирующим и нетоксичным белком, который использовали в качестве контроля для экспериментов с мутантным гентингином Htt103Q, может агрегировать и быть причиной токсичности в присутствии амилоидов других белков.

#### **4.2. 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

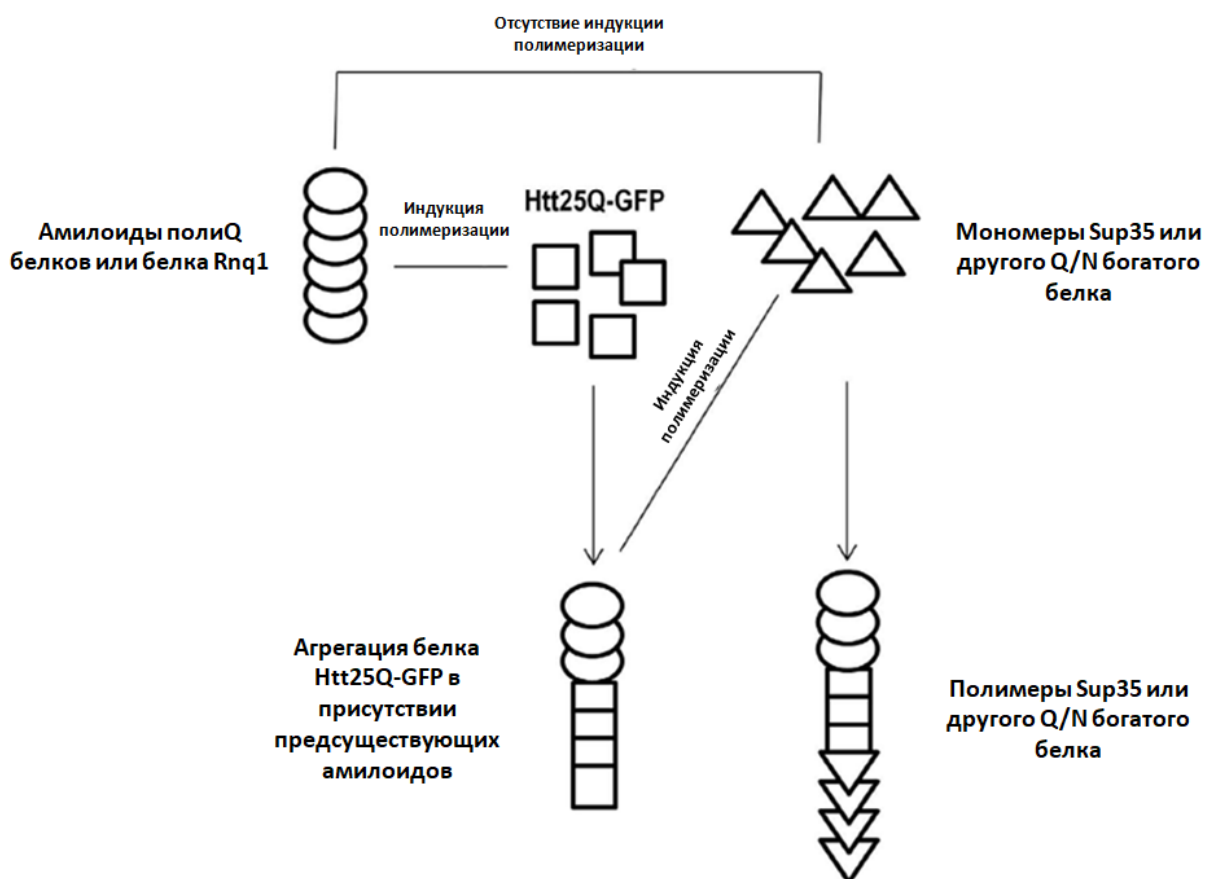
эффективной полимеризации белка Sup35 и некоторых других белков на матрицах амилоидов Htt25Q-GFP. В данном случае можно говорить о том, что белок Htt25Q-GFP играет роль посредника в передаче амилоидной конформации белку Sup35, так как сами по себе искусственные глутамин-богатые белки или амилоиды белка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

Только белки 85Q-НА и 131Q-НА 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 белков Sup35, Def1, Yir003w, Ylr278c (Рис. 37).





**Рисунок 37. Полимеризационный каскад.** Белок Htt25Q-GFP является посредником в передаче амилоидной конформации от амилоидов искусственных глутамин-богатых белков или амилоидов Rnq1 белку Sup35 и другим глутамин-богатым белкам.

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 [180].

### 4.3. Молекулярные основы токсичности белка Htt25Q-GFP

Как в нашей, так и в других лабораториях было продемонстрировано, что основным источником токсичности мутантного гентингина в штамме 74D-694 является истощение растворимых форм факторов терминации трансляции Sup35 и Sup45. Белок Sup35 в присутствии амилоидов гентингина переходит в амилоидную форму, а белок Sup45 - его функциональный партнер, включается в состав агрегатов Sup35 [118, 141, 142]. Данные полученные в нашей работе говорят о том, что механизм токсичности белка Htt25Q-GFP в присутствии амилоидов искусственных полиглутаминовых белков очень похож на механизм токсичности мутантного гентингина, так как, во-первых, токсичность вызванная полимерами нормального гентингина всегда сопровождалась амилоидной полимеризацией белка Sup35 и истощением его растворимой формы, а также растворимой формы белка Sup45, во-вторых, токсичность, вызванная амилоидной формой белка Htt25Q-GFP, снималась одновременной сверхпродукцией двух белков: неагрегирующей формой белка Sup35(Sup35C) и Sup45. Наиболее вероятно, что цитотоксичность, возникающая в результате амилоидной полимеризации белка Htt25Q-GFP на матрицах прионных амилоидов Rnq1 наряду со сверхэкспрессией Rnq1, также связана с переходом в полимерное состояние белка Sup35.

В ходе дальнейшей работы по изучению токсичности, вызванной белком Htt25Q-GFP, нам удалось показать, что растворимая форма этого белка также может приводить к замедлению роста клеток дрожжей. Однако, проявление этого эффекта можно увидеть только в условиях ингибирования роста клеток с помощью различных стрессовых факторов. Такими факторами могут являться некоторые химические агенты, добавленные в питательную среду: Конго Красный, ДСН, кофеин. Но также и присутствие в клетках прионных амилоидов белка Sup35 при росте на среде с галактозой может быть причиной замедленного роста клеток, и на фоне замедления роста мономерный белок Htt25Q-GFP может вызывать токсический эффект. Таким образом, можно предполагать, что растворимая форма Htt25Q-GFP наряду с амилоидными полимерами белка Htt25Q-GFP также вносит свой вклад в замедление роста клеток.

#### **4.4. Роль немутантных аллелей в патогенезе полиглутаминовых заболеваний. Взаимодействие между амилоидозами**

На сегодняшний день установлена обратная зависимость между числом CAG повторов в генах, ассоциированных с полиглутаминовыми болезнями, и возрастом начала проявления симптомов этих заболеваний, однако такая зависимость составляет только 50-70% от общего вклада всех факторов влияющих на возраст начала проявления симптомов [181]. На самом деле, существуют и другие факторы, влияющие на возраст начала заболевания - генетические и/или внешние факторы окружающей среды [181, 182]. Одним из таких факторов является длина полиглутаминовой области немутантной версии белка, ассоциированного с данным полиглутаминовым заболеванием [183, 184, 185].

Например, нормальный гентингтин может сложным образом модулировать токсический эффект мутантного гентингина. Так, возрастание длины полиглутаминового тракта у нормального гентингина смягчает токсический эффект мутантного гентингина, если последний имеет достаточно длинный полиглутаминовый домен и усиливает токсический эффект мутантного гентингина, если тот имеет короткий полиглутаминовый домен [184]. Механизмы данных эффектов остаются неясными, хотя некоторые исследования, проведенные и на дрожжах, и на людях, показали, что гентингтин дикого типа может коагрегировать с мутантным гентингином [1, 149, 171,]. Коагрегация нормального гентингина с мутантным гентингином может способствовать патогенезу болезни Гентингтона либо вследствие потери функции нормального гентингина [1], либо из-за усиления агрегации мутантного гентингина [186]. Дополнительным подтверждением взаимодействия мутантного и нормального гентингина могут являться результаты исследований, проведенных Jeon с соавторами в 2016 году. Исследователи показали, что интрацеребральное введение фибробластов или плюрипотентных стволовых клеток, продуцирующих мутантный гентингтин (Htt72Q, Htt143Q и Htt180Q) и принадлежащих пациентам с болезнью Гентингтона, молодым мышам, имеющим нормальную длину полиглутаминовой области белка гентингина, приводит к появлению у последних патологических фенотипов и поведенческих отклонений, характерных для болезни Гентингтона [211].

Также были получены данные, что копродукция нормального и мутантного гентингина в дрожжах может приводить к уменьшению токсичности мутантного белка [187], однако в нашей лаборатории не удалось воспроизвести данный эффект и более того, в подтверждении более ранних данных, мы показали, что в дрожжах агрегация гентингина дикого типа, происходящая в присутствии агрегатов мутантного гентингина [149], может способствовать развитию клеточной токсичности (данные не представлены).

Кроме того, имеются свидетельства тому, что возраст начала и патогенез полиQ болезней могут также зависеть от длины полиглутаминового тракта в белках, ассоциированных с другими полиглутаминовыми болезнями [188, 189, 190, 191]. Например, было показано, что возраст начала спиноцеребральной атаксии второго типа зависит не только от расширения полиглутаминового участка в белке SCA2, агрегация которого и вызывает это заболевание, но также коррелирует с длинной полиглутаминовой области белка CACNA1A, ассоциированного с спиноцеребральной атаксией шестого типа [189]. Модуляция токсичности одного белка, вызывающего полиглутаминовое заболевание, при помощи другого также показана в модельной системе спиноцеребральной атаксии с использованием организма *D. melanogaster* [192].

Опубликованные корреляционные исследования главным образом были направлены на поиск модулирующих эффектов различных длин полиглутаминовых областей в белках, ассоциированных с болезнями. Однако, наиболее вероятно, что полиморфизм в длинах полиQ областей у белков, которые не связаны с болезнями, также может влиять на различные клинические параметры полиQ болезней.

Интересно, что белки с полиглутаминовыми доменами также вовлечены в патогенез заболеваний связанных с агрегацией белков с Q-богатыми доменами, ассоциированных с заболеваниями, не относящимися к группе полиглутаминовых амилоидозов. Например, непатологическое расширение полиглутаминового участка в белке SCA2 может являться фактором повышающим риск развития амиотрофического латерального склероза, ассоциированного с белками TDP-43 и FUS [192]. Роль взаимодействий белков TDP-43 и FUS с белком SCA2 в патогенезе амиотрофического латерального склероза также подтверждается коагрегацией этих белков в модельной системе этого заболевания на основе *Drosophila melanogaster* [193, 194].

Таким образом, существует большое количество литературных данных, согласно которым в патогенез одних амилоидных заболеваний вовлечены белки либо ассоциированные с другими амилоидозами, либо непосредственно не связанные с болезнями, но способные модулировать токсические эффекты патологических амилоидогенных белков.

В данной диссертационной работе мы продемонстрировали, что сверхпродукция различных белков с длинными Q-богатыми участками в дрожжах может вызывать полимеризацию и токсичность нормального гентингина. Таким образом, можно предполагать, что у людей какие-либо предрасполагающие амилоиды могут способствовать развитию полиQ заболевания даже если длина полиглутаминовой области в соответствующих амилоидогенных белках лишь незначительно превышает существующую норму для данного заболевания. Возможно такие амилоиды даже могут индуцировать полимеризацию немутантных

полиглутаминовых белков, ассоциированных с соответствующими полиQ амилоидозами и вызывать появление симптомов похожих на те, которые возникают при соответствующих полиглутаминовых болезнях.

Кроме того, индукция полимеризации других белков амилоидами белков с Q/N богатыми доменами может иметь еще более широкие последствия, если такие амилоиды способны вызывать агрегацию белков, которые не обладают Q/N-богатыми областями, и именно это было продемонстрировано в работах на мутантном гентингтине [120, 140]. Такой тип белкового перекрестного затравления (белковой кополимеризации) может предоставить новый механизм, в соответствии с которым увеличение полиглутаминовой последовательности в белках, ассоциированных с полиглутаминовыми болезнями, может влиять на возникновение нейродегенеративных амилоидозов неполиглутаминовой природы [195, 196, 197]. Кроме того, представляется вероятным, что похожий механизм перекрестного затравления может также лежать в основе взаимодействий между разными амилоидозами не полиглутаминовой природы [198]. Эта возможность подтверждается способностью структурно несвязанных, ассоциированных с болезнями белков ускорять агрегацию друг друга как *in vivo* [199] так и *in vitro* [179], хотя при этом сильные структурные различия могут уменьшать такую кополимеризационную активность [146, 147]. Важно, что взаимосвязи между склонными к полимеризации белками могут быть довольно сложными, так как эти белки могут индуцировать полимеризацию друг друга не только прямо, но также с помощью посредника - через полимеризационный каскад. Таким образом, имеется довольно много данных, говорящих о том, что важную роль во взаимозависимом возникновении амилоидных болезней может играть белковая кополимеризация. Однако, такая взаимозависимость также может объясняться способностью амилоидов взаимодействовать с шаперонами, тем самым снижая их количество и мешая выполнению ими других биологически значимых функций в клетке. Это, в свою очередь, может негативно влиять на правильное сворачивание белков и способствовать образованию амилоидов белками, склонными к агрегации [200]. Однако необходимо больше данных, чтобы понять какой из этих двух механизмов (непосредственно сама кополимеризация или снижение количества свободных шаперонов) оказывает большее влияние на возникновение и патогенез амилоидных заболеваний.

В заключение следует подчеркнуть, что способность непатогенных белков с протяженными глутаминовыми трактами индуцировать агрегацию и вызывать токсичность гентингина дикого типа, а также существование полимеризационных каскадов не только указывают на сложную молекулярную природу полиQ заболеваний и, возможно, других амилоидных болезней, но также служат основой для поиска новых клеточных факторов среди полиглутаминовых белков, не связанных с амилоидными болезнями, но влияющих на их патогенез.

#### **4.5. Причины токсичности мутантного гентингина различаются для разных штаммов дрожжей**

Ранее в нашей и двух других лабораториях были независимо получены результаты, показывающие, что токсичность мутантного гентингина 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 [118, 141, 142]. 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 гентингина 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 гентингина 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. Данное предположение подтверждается тем, что мгновенная репрессия экспрессии белков Sup35 и Sup45 до уровня 10% от нормы вызывает значительную гибель клеток дрожжей [201]. И в то же время получены мутанты с экстремально низкими концентрациями белков Sup35 и Sup45 [202, 203], существование которых может объясняться наличием компенсаторных мутаций, позволяющих восполнить недостаток активности транскрипционных факторов.

По своему происхождению штаммы 74D-694 и GT81 отличаются от всех других штаммов, на которых проводились исследования токсических эффектов мутантного гентингина 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 [204]. Таким образом, так как в штамме BY4742 переход белка Sup35 в полимерное состояние в результате кополимеризации с амилоидами мутантного гентингина не приводит к замедлению роста клеток, токсический эффект мутантного гентингина может объясняться множеством других патологических процессов, возникающих вследствие сверхпродукции Htt103Q (Таблица 4).

**Таблица 4. Причины токсичности мутантного гентингина, экспрессируемого в цитоплазме.**

<b>Штамм</b>	<b>Процессы/органеллы, в которых происходят нарушения</b>	<b>Ссылка</b>
74-D694 GT81	Терминация трансляции	[118, 141, 142]
W303 YRH499	Протеосомная деградация белков	[205] [206]
W303 BY4741	Функционирование митохондрий	[207] [137]
W303 BY4739 BY4741 BY4742 YY1001	Эндоцитоз, структура актинового цитоскелета	[134, 169, 208]
BY4741 EY0986	Деление клетки	[209]
BY4741	Катаболизм триптофана, связанный с образованием активных форм кислорода	[150]
W303	Деградация белков, ассоциированных с ЭПР	[210]



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 гентингина в этом штамме [118].

Штаммы 74D-694 и ВУ4742, используемые в данной работе имели фенотип [*PIN*<sup>+</sup>], то есть белок Rnq1 находился в прионной форме. Этот фенотип значительно усиливает полимеризацию и токсичность Htt103Q [118]. Однако мы продемонстрировали, что полимеризация Htt103Q также зависит от белка Def1, который кополимеризуется с амилоидами Htt103Q в обоих штаммах: ВУ4742 и 74D-694 [140]. Стоит отметить, что в отличие от штамма 74D-694, делеция гена *DEF1* в штамме ВУ4742 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 ВУ4742 с делецией гена *DEF1* обеспечивают более эффективную удельную полимеризацию Sup35, чем в штамме ВУ4742 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 гентингина в дрожжах трудно объединить, так как неясно, основан ли токсический эффект HttQ103 на единственно 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 гентингина.

В данной работе мы показали, что в разных дрожжевых штаммах могут действовать разные механизмы токсичности мутантного гентингина. Например, токсичность мутантного гентингина в штамме 74D-694, который использовался в наших предыдущих исследованиях, главным образом зависит от истощения растворимых фракций белков Sup35 и Sup45. Однако, в штамме ВУ4742 агрегация этих белков не является причиной токсичности мутантного гентингина. Полученные данные говорят о штаммовой специфичности механизмов токсичности мутантного гентингина в дрожжевой модели, а также могут объяснять различия в чувствительности отдельных клеточных популяций к агрегации гентингина при болезни Гентингтона.

## Заключение

**Полученные результаты позволяют сделать следующие выводы:**

1. Непатогенная форма гентингина 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 гентингина 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.

## Благодарности

Хочу сердечно поблагодарить моего научного руководителя член-корреспондента РАН, профессора, доктора биологических наук Михаила Давидовича Тер-Аванесяна не только за неоценимую помощь в моем научном становлении, проработке исследовательских планов и написании научных работ, но также за создание прекрасной лаборатории и прекрасного коллектива, частью которого я был и в котором я рос, как ученый и как личность. Также хочу выразить особую благодарность моему научному руководителю кандидату биологических наук Александрову Александру Ивановичу за всестороннюю помощь в написании научных статей и диссертационной работы, у которого я учился биохимическим, микробиологическим и молекулярно генетическим методам работы, а также грамотно самостоятельно составлять экспериментальные планы; который в трудные минуты мог разжечь азарт и мотивацию к экспериментальной работе. Отдельную благодарность выражаю доктору биологических наук Виталию Владимировичу Кушникову за совместную работу по поиску дрожжевых прионов, за полезные замечания применительно к моей основной научной работе и своевременную необходимую помощь в написании диссертации. Хочу поблагодарить своего друга младшего научного сотрудника института биохимии им. А.Н. Баха РАН Азамата Валерьевича Каргинова за постоянную огромную помощь в трудные минуты обучения в аспирантуре и работы в лаборатории. Благодарю младшего научного сотрудника института биохимии им. А.Н. Баха РАН Александра Андреевича Дергалева за интересные научные дискуссии, заполняющие пробелы в моих знаниях, и всестороннюю помощь. Благодарю всех действующих и бывших сотрудников лаборатории молекулярной генетики: кандидата биологических наук Ольгу Владимировну Митькевич, кандидата биологических наук Михаила Олеговича Агафонова, кандидата биологических наук Валерия Владимировича Уракова, кандидата биологических наук Анастасию Владимировну Фокину за точные и своевременные советы по научной работе.

## Список литературы

1. Busch A., Engemann S., Lurz R., Okazawa H., Lehrach H., Wanker E. E. Mutant huntingtin promotes the fibrillogenesis of wild-type huntingtin: a potential mechanism for loss of huntingtin function in Huntington's disease. // *J. Biol. Chem.* 2003. T. 278. C. 41452–61.
2. Chiti F., Dobson C.M. Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. // *Ann. Rev. Biochem.* 2006. T. 75. C. 333–66.
3. Sunde M. , Blake C. The structure of amyloid fibrils by electron microscopy and X-ray diffraction. // *Advances in protein chemistry.* 1997. T. 50, C.123-59.
4. Biancalana M. and Koide S. // Molecular mechanism of Thioflavin-T binding to amyloid fibrils. 2010. T. 1804, № 7, C. 1405-1412.
5. Khurana R. Is Congo red an amyloid-specific dye? // *The Journal of biological chemistry.* 2001 T. 276 (25) C. 22715-21.
6. Wasmer C., Lange A., Van Melckebeke H., Siemer A. B., Riek R., Meier B. H. Amyloid fibrils of the HET-s (218-289) prion form a beta solenoid with a triangular hydrophobic core. // *Science.* 2008. T. 319 (5869). C. 1523-6.
7. Paravastu A.K., Leapman R.D., Yau W.M., Tycko R. Molecular structural basis for polymorphism in Alzheimer's beta-amyloid fibrils. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2008. T. 05. № 47. C. 18349-54.
8. Kajava A.V., Baxa U., Wickner R.B., Steven A.C. A model for Ure2p prion filaments and other amyloids: the parallel superpleated beta-structure. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A .* 2004. T. 101. № 21. C. 7885-90.
9. Vocht, M. L. D., Reviakine, I., Wösten, H. A. B., Brisson, A., Wessels, J. G. H. & Robillard, G. T. Structural and functional role of the disulfide bridges in the hydrophobin SC3. // *The Journal of Biological Chemistry.* 2000. T. 275, № 37, C. 28428 - 28432.
10. Gebbink M. F., Claessen D., Bouma B., Dijkhuizen L., Wösten H.A. Amyloids - a functional coat for microorganisms. // *Nature reviews. Microbiology.* 2005. T. 3, C. 333-341.
11. Elliot M. A., Karoonuthaisiri N., Huang J., Bibb M. J., Cohen S. N., Kao C. M., Buttner M. J. The chaplins: a family of hydrophobic cell-surface proteins involved in aerial mycelium formation in *Streptomyces coelicolor*. // *Genes and development.* 2003. T. 17, № 14, C. 1727-40.

12. Iconomidou V., Willis J., Stavros J. Hamodrakas. Unique features of the structural model of 'hard'cuticle proteins: implications for chitin–protein interactions and cross-linking in cuticle. // *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 2005. T. 35, C. 553–560.
13. Barco A., Bailey C.H., Kandel E.R. Common molecular mechanisms in explicit and implicit memory. // *J. Neurochem*. 2006. T. 97. C. 1520–1533.
14. Majumdar A. et. al. Critical Role of Amyloid-like Oligomers of *Drosophila* Orb2 in the Persistence of Memory. // *Cell*. 2012. T. 148, № 3, C. 515-529.
15. Prusiner S. B. Prions. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998. T. 95. №23. C. 13363-83.
16. Mizusawa H. and Kuroiwa Y. Guideline for infection control of prion diseases. The Research Committee on Prion Disease and Slow Virus Infection, Research on Measures for Intractable Diseases Health and Labour Sciences Research Grants, The Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan. 2008.
17. Harris D. A., P. J. Peters, A. Taraboulos, V. Lingappa, S. J.DeArmond, and S. B. Prusiner. Cell biology of prions. // In S. B. Prusiner (ed.), *Prion Biology and Diseases*, 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. 2004. C. 483-544.
18. Stahl N., D. R. Borchelt, K. Hsiao, and S. B. Prusiner. Scrapie prion protein contains a phosphatidylinositol glycolipid. // *Cell*. 1987. T. 51. C. 229-240.
19. Bueler H., M. Fisher, Y. Lang, H. Bluethmann, H.-P. Lipp, S. J. DeArmond, S. B. Prusiner, M. Aguet, and C. Weissmann. Normal development and behavior of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. // *Nature*. 1992. T. 356. C. 577-582.
20. Manson J. C., A. R. Clarke, M. L. Hooper, L. Aitchison, I. McConnell, and J. Hope. 129/Ola mice carrying a null mutation in PrP that abolishes mRNA production are developmentally normal. // *Mol. Neurobiol*. 1994. T. 8. C. 121-127.
21. Moore R. C., I. Y. Lee, G. L. Silverman, P. M. Harrison, R. Strome, C. Heinrich, A. Karunaratne, S. H. Pasternak, M. A. Chishti, Y. Liang, P. Mastrangelo, K. Wang, A. F. A. Smit, S. Katamine, G. A. Carlson, F. E. Cohen, S. B. Prusiner, D. W. Melton, P. Tremblay, L. E. Hood, and D. Westaway. Ataxia in prion protein (PrP)-deficient mice is associated with upregulation of the novel PrP-like protein doppel. // *J. Mol. Biol*. 1999. T. 292. C. 797-817.

22. Cashman N. R., R. Loertscher, J. Nalbantoglu, I. Shaw, R. J. Kascsak, D. C. Bolton, and P. E. Bendheim. Cellular isoform of the scrapie agent protein participates in lymphocyte activation. // *Cell*. 1990. T. 61. C. 185-192.
23. Maglio L. E., M. F. Perez, V. R. Martins, R. R. Brentani, and O. A. Ramirez. Hippocampal synaptic plasticity in mice devoid of cellular prion protein. // *Mol. Brain Res*. 2004. T. 131. C. 58-64.
24. Chiarini L. B., A. R. Freitas, S. M. Zanata, R. R. Brentani, V. R. Martins, and R. Linden. Cellular prion protein transduces neuroprotective signals. // *EMBO J*. 2002. T. 21. C. 3317-3326.
25. Brown L. R. and D. A. Harris. The prion protein and copper: What is the connection? In E. J. Massaro (ed.), *Handbook of Copper Pharmacology and Toxicology*. Humana Press, Totowa, NJ. 2002. C. 103-113.
26. Steele A. D., J. G. Emsley, P. H. Ozdinler, S. Lindquist, and J. D. Macklis. Prion protein (PrPC) positively regulates neural precursor proliferation during developmental and adult mammalian neurogenesis. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006. T. 103. C. 3416-3421.
27. Zhang C. C., A. D. Steele, S. Lindquist, and H. F. Lodish. Prion protein is expressed on long-term repopulating hematopoietic stem cells and is important for their selfrenewal. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006. T. 103. C. 2184-2189.
28. DeArmond S. J., M. P. McKinley, R. A. Barry, M. B. Braunfeld, J. R. McColloch, and S. B. Prusiner. Identification of prion amyloid filaments in scrapie-infected brain. // *Cell*. 1985. T. 41. C. 221-235.
29. Hetz C., M. Russelakis-Carneiro, K. Maundrell, J. Castilla and C. Soto. Caspase-12 and endoplasmic reticulum stress mediate neurotoxicity of pathological prion protein. // *EMBO J*. 2003. T. 22. C. 5435-5445.
30. Marella M., C. Gaggioli, M. Batoz, M. Deckert, S. Tartare-Deckert, and J. Chabry. Pathological prion protein exposure switches on neuronal mitogen-activated protein kinase pathway resulting in microglia recruitment. // *J. Biol. Chem*. 2005. T. 280. C. 1529-1534.
31. Brandner S., S. Isenmann, A. Raeber, M. Fischer, A. Sailer, Y. Kobayashi, S. Marino, C. Weissmann, and A. Aguzzi. Normal host prion protein necessary for scrapieinduced neurotoxicity. // *Nature*. 1996. T. 379. C. 339-343.

32. Kuwahara C., A. M. Takeuchi, T. Nishimura, K. Haraguchi, A. Kubosaki, Y. Matsumoto, K. Saeki, Y. Matsumoto, T. Yokoyama, S. Itohara, and T. Onodera. Prions prevent neuronal cell-line death. // *Nature*. 1999. T. 400. C. 225-226.
33. Cox B. *PSI*, a cytoplasmic suppressor of super-suppressor in yeast. // *Heredity*. 1965. T. 20. C. 505-521.
34. Lacroute F. Non-Mendelian mutation allowing ureidosuccinic acid uptake in yeast. // *J. Bacteriol.* 1971. T. 106. C. 519-522.
35. Wickner R. B., 1994 [URE3] as an altered URE2 protein: evidence for a prion analog in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science*. T. 264. C. 566–569.
36. Wickner R.B., Masison D.C., Edskes H.K. [PSI] and [URE3] as yeast prions. // *Yeast* Chichester England. 1995. T. 11. C. 1671–1685.
37. Derkatch I.L., Bradley M.E., Hong J.Y., Liebman S.W. Prions affect the appearance of other prions: the story of [*PIN*<sup>+</sup>]. // *Cell*. 2001. T. 106. C. 171–182.
38. Alberti S., Halfmann R., King O., Kapila A., Lindquist S. A Systematic Survey Identifies Prions and Illuminates Sequence Features of Prionogenic Proteins. // *Cell*. 2009. T. 137. C. 146–158.
39. Suzuki G., Shimazu N., Tanaka M. A yeast prion, Mod5, promotes acquired drug resistance and cell survival under environmental stress. // *Science*. 2012. T. 336 № 6079 C. 355-9.
40. Patel B.K., Gavin-Smyth J., Liebman S.W. The yeast global transcriptional co-repressor protein Cyc8 can propagate as a prion. // *Nature cell biology*. 2009. T. 11. C. 344–349.
41. Du Z., Park K-W., Yu H., Fan Q., Li L., Newly identified prion linked to the chromatin-remodeling factor Swi1 in *Saccharomyces cerevisiae*. // *Nature genetics*. 2008. T. 40. C. 460–465.
42. Coustou V., Deleu C., Saupe S., Begueret J. The protein product of the het-s heterokaryon incompatibility gene of the fungus *Podospora anserina* behaves as a prion analog. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997. T. 94 C. 9773–9778.
43. Nizhnikov A., Ryzhova T., Volkov K., Zadorsky S., Sopova J., Inge-Vechtomov S., Galkin A. Interaction of Prions Causes Heritable Traits in *Saccharomyces cerevisiae*. // *PLoS Genet*. 2016. T. 12. № 12.

44. Brown J. C. and Lindquist S. A heritable switch in carbon source utilization driven by an unusual yeast prion. // *Genes and Development*. 2009. T. 23, № 19. C. 2320-32.
45. Roberts, B. T., and Wickner, R. B. 2003 Heritable activity: y: a prion that propagates by covalent autoactivation. // *Genes and Development*. 2003. T. 17, № 17. C. 2083-7.
46. Pezza A. Amyloid-associated activity contributes to the severity and toxicity of a prion phenotype. // *Nature Communications*. 2014. T. 5, C. 4384.
47. Chakrabortee S. et. al. Intrinsically Disordered Proteins Drive Emergence and Inheritance of Biological Traits. // *Cell*. 2016. T. 167, 1–13.
48. Ball A.J.S., Wong D.K. and Elliott J.J. Glucosamine resistance in yeast. I. A preliminary genetic analysis. // *Genetics*. 1976. T. 84. C. 311-317.
49. Paushkin S. V., Kushnirov V. V., Smirnov V. N. and Ter-Avanesyan M. D. Propagation of the yeast prion-like [*PSI*<sup>+</sup>] determinant is mediated by oligomerization of the SUP35-encoded polypeptide chain release factor. // *EMBO J.*, 1996. T. 15. C. 3127-3134.
50. Helsen C.W., Glover J.R. Insight into the molecular basis of curing of the [*PSI*<sup>+</sup>] prion by overexpression of the 104 kDa heat shock protein (Hsp104). // *The Journal of biological chemistry*. 2012. T. 287. C. 542–556.
51. Stansfield I., Jones K. M., Kushnirov V. V., Dagkesamanskaya A. R., Poznyakovski A.I., Paushkin S.V., Nierras C.R., Cox B.S., Ter-Avanesyan M.D., Tuite M.F. The products of the SUP45 (eRF1) and SUP35 genes interact to mediate translation termination in *Saccharomyces cerevisiae*. // *EMBO J.* T. 1995. 14(17). C. 4365-73.
52. Аленин В.В., Домкин В.Д., Ковалева А.А., Смирнов М.Н. Регуляция экзогенным аденином экспрессии генов ADE1 и ADE2, кодирующих структуру двух ферментов пуринового биосинтеза у дрожжей *S. cerevisiae*. // *Биополимеры и клетка*. 1987. Т. 3. № 6. С. 325-326.
53. Derkatch I. L., M. E. Bradley P., Zhou Y. O. Chernoff and S. W. Liebman. Genetic and environmental factors affecting the de novo appearance of the [*PSI*<sup>+</sup>] prion in *Saccharomyces cerevisiae*. // *Genetics*. 1997. T. 147. C. 507–519.
54. Kadnar M. L., Articov G., Derkatch I. L. Distinct type of transmission barrier revealed by study of multiple prion determinants of Rnq1. // *PLoS Genetics*. 2010. 6: e1000824.



55. Derkatch I. L., Chernoff Y. O., Kushnirov V. V., Inge-Vechtomov S. G. and Liebman S. W. Genesis and variability of [*PSI*<sup>+</sup>] prion factors in *Saccharomyces cerevisiae*. // *Genetics*. 1996. T. 144. C. 1375–1386.
56. Zhou, P., I. L. Derkatch, S. M. Uptain, M. M. Patino, S. Lindquist *et al.* The yeast non-Mendelian factor [*ETA*<sup>+</sup>] is a variant of [*PSI*<sup>+</sup>], a prion-like form of release factor eRF3. // *EMBO J.*, 1999. T. 18. C. 1182–1191.
57. Uptain S. M., G. J. Sawicki, B. Caughey and S. Lindquist. Strains of [*PSI*<sup>+</sup>] are distinguished by their efficiencies of prion-mediated conformational conversion. // *EMBO J.* 2001. T. 20. C. 6236–6245.
58. Shkundina I.S., Kushnirov V.V., Tuite M.F., Ter-Avanesyan M.D. The role of the N-terminal oligopeptide repeats of the yeast Sup35 prion protein in propagation and transmission of prion variants. // *Genetics*. 2006. T. 172 (2). C. 827-35.
59. Krishnan R., Lindquist S.L. Structural insights into a yeast prion illuminate nucleation and strain diversity. // *Nature*. 2005 T. 435(7043). C. 765-72.
60. Toyama B.H., Kelly M.J., Gross J.D., Weissman J.S. The structural basis of yeast prion strain variants. // *Nature*. 2007. T. 449(7159) C. 233-7.
61. Tanaka M., S. R. Collins, B. H. Toyama, and J. S. Weissman. The physical basis of how prion conformations determine strain phenotypes. // *Nature*. 2006. T. 442. C. 585–589.
62. Bradley M. E., H. K. Edskes, J. Y. Hong, R. B. Wickner, and S. W. Liebman. Interactions among prions and prion “strains” in yeast. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2002. T. 99. C. 16392–16399.
63. Shorter J. Emergence and natural selection of drug-resistant prions. // *Mol. Biosyst.* 2010. T. 6. C. 1115–1130.
64. Schlumpberger M., S. B. Prusiner, and I. Herskowitz. Induction of distinct [*URE3*] yeast prion strains. // *Mol. Cell. Biol.* 2001. T. 21. C. 7035–7046.
65. Schirmer E. C., Glover J. R., Singer M. A., Lindquist S. HSP100/Clp proteins: a common mechanism explains diverse functions. // *Trends in Biochemical Sciences*. 1996. T. 21. C. 289–296.

66. Glover J. R., Lindquist S. Hsp104, Hsp70, and Hsp40: a novel chaperone system that rescues previously aggregated proteins. *Cell*. 1998. T. 94. C. 73–82.
67. Kushnirov V. V. and Ter-Avanesyan M. D.. Structure and replication of yeast prions. // *Cell*. 1998. T. 94. C. 13–16.
68. Kryndushkin D. S., Alexandrov I. M., Ter-Avanesyan M. D., Kushnirov V.V. Yeast [*PSI*<sup>+</sup>] prion aggregates are formed by small Sup35 polymers fragmented by Hsp104. // *The Journal of biological chemistry*. 2003. T. 278. C. 49636–49643.
69. Glover J. R. and R. Lum. Remodeling of protein aggregates by Hsp104. // *Protein Pept. Lett*. 2009. T. 16. C. 587–597.
70. Alexandrov I. M., Vishnevskaya A. B., Ter-Avanesyan M. D., Kushnirov V. V. Appearance and propagation of polyglutamine-based amyloids in yeast: tyrosine residues enable polymer fragmentation. *J. Biol. Chem*. 2008. T. 283. C. 15185–15192.
71. Knowles T. P. J, Vendruscolo M., Dobson C.M. The amyloid state and its association with protein misfolding diseases. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 2014. T. 15. C. 384–96.
72. Nizhnikov A. A., Antonets K. S, Inge-Vechtomov S. G. Amyloids: from pathogenesis to function. // *Biochem*. 2015. T. 80. C. 1127–44.
73. Asúa D., Costa R., Galván J., Filigheddu M. T., Trujillo D., Cadiñanos J. Systemic AA amyloidosis: epidemiology, diagnosis, and management. // *Clinical Epidemiology*. 2014. T. 6. C. 369–377.
74. Westermark P. Localized AL amyloidosis: a suicidal neoplasm? // *Upsala Journal of Medical Sciences*. 2012. T. 117, № 2. C. 244-50.
75. Buxbaum J. and Linke R. A Molecular History of the Amyloidoses. // *Journal of Molecular Biology*. 2012. T. 421. C. 142–159.
76. Desport E., et. al. Al amyloidosis. // *Orphanet J. Rare Dis*. 2012. T. 21. C. 7-54.
77. Terry W. D., Page D. L., Kimura S., Isobe T., Osserman E. F. & Glenner G. G. Structural identity of Bence Jones and amyloid fibril proteins in a patient with plasma cell dyscrasia and amyloidosis. // *J. Clin. Invest*. 1973. T. 52. C. 1276–1281.

78. Merlini M.D. and Bellotti M.D. Molecular Mechanisms of Amyloidosis. // *The new england journal of medicine*. 2003. T. 349. C. 583-96.
79. Cray C., Zaias J., Altman N. H. Acute phase response in animals: a review. *Comp. Med.* 2009. T. 59. C. 517–526.
80. Urieli-Shoval S., Linke R.P., Matzner Y. Expression and function of serum amyloid A, a major acute-phase protein, in normal and disease states. // *Curr. Opin. Hematol.* 2000 T. 7 № 1. C. 64–69.
81. Ilieva H., Polymenidou M., Cleveland D. W. Non-cell autonomous toxicity in neurodegenerative disorders: ALS and beyond. // *J. Cell Biol.* 2009. T. 187. C. 761–772.
82. Polymenidou M., Lagier-Tourenne C., Hutt K. R., Bennett C. F., Cleveland D. W., Yeo G. W. Misregulated RNA processing in amyotrophic lateral sclerosis. // *BrainRes.* 2012. T. 1462. C. 3–15.
83. Neumann M., Sampathu D. M., Kwong L. K., Truax A. C., Micsenyi M. C., Chou T.T., Bruce J., Schuck T., Grossman M., Clark C. M., McCluskey L. F., Miller B. L., Masliah E., Mackenzie I. R., Feldman H., Feiden W., Kretzschmar H. A., Tro-janowski J. Q., Lee V. M. Y. Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. // *Science*. 2006. T. 314. C. 130–133.
84. Cushman M., Johnson B. S., King O. D., Gitler A. D., Shorter J. Prion-like disorders: blurring the divide between transmissibility and infectivity. // *J. Cell Sci.* 2010 T. 123. C. 1191–1201.
85. Lagier-Tourenne C., Polymenidou M., Cleveland D. W. TDP-43 and FUS/TLS: emerging roles in RNA processing and neurodegeneration. // *Hum. Mol. Genet.* 2010. T. 19. R46–R64.
86. Da Cruz S. and D. W. Cleveland. Understanding the role of TDP-43 and FUS/TLS in ALS and beyond. // *Curr. Opin. Neurobiol.* 2011. T. 21. C. 904–919.
87. Ефимова А. Д., Овчинников Р. К., Роман А. Ю., Мальцев А. В., Григорьев В. В., Ковражкина Е. А., Скворцова В. И. Белок FUS: физиологические функции и роль в развитии бокового амиотрофического склероза. // *Молекулярная биология*. 2017. Т. 51, № 3. С. 387-399.
88. Vance C., Rogelj B., Hortobágyi T., De Vos K. J., Nishimura A. L., Sreedharan J., Hu X., Smith B., Ruddy D., Wright P., Ganesalingam J., Williams K. L., Tripathi V., Al-Saraj S., Al-Chalabi

- A., Leigh P. N., Blair I. P., Nicholson G., de Bellerocche J., Gallo J.-M., Miller C. C., Shaw C. E. Mutations in FUS, an RNA processing protein, cause familial amyotrophic lateral sclerosis type 6. *Science*. 2009. T. 323. C. 1208–1211.
89. Coughlan C.M., Brodsky J.L. Use of yeast as a model system to investigate protein conformational diseases. // *Mol. Biotechnol.* 2005. T. 30. C. 171–180.
90. T. Lührs et al. 3D structure of Alzheimer's amyloid-beta (1-42) fibrils. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2005. T. 102. C. 17342-7.
91. Levy-Lahad E., et al. Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. // *Science*. 1995. T. 269. C. 973-7.
92. Rogaev E. I., et al. Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene. // *Nature*. 1995. T. 376. C. 775-8.
93. De Strooper B., et al. Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein. // *Nature*. 1998. T. 391. C. 387-90.
94. Wolfe M. S., et al. Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and gamma-secretase activity. // *Nature*. 1999. T. 398. C. 513-7.
95. Citron M., et al. Mutant presenilins of Alzheimer's disease increase production of 42-residue amyloid beta-protein in both transfected cells and transgenic mice. // *Nat. Med.* 1997. T. 3. C. 67-72.
96. Lee V. M.-Y., Goedert M., Trojanowski J. Q. Neurodegenerative tauopathies. *Annu. Rev. Neurosci.* 2001. T. 24. C. 1121-59.
97. Avila J. Tau phosphorylation and aggregation in Alzheimer's disease pathology. // *FEBS Lett.* 2006. T. 580. 2922-7.
98. George DeMaagd et. al. Parkinson's Disease and Its Management. Part 1: Disease Entity, Risk Factors, Pathophysiology, Clinical Presentation, and Diagnosis. // *P. and T.* T. 40, № 8.
99. Polymeropoulos M. H., Lavedan C., Leroy E., Ide S. E., Dehejia A., Dutra A., Pike B., Root H., Rubenstein J., Boyer R., Stenroos E. S., Chandrasekharappa S., Athanassiadou A., Papapetropoulos T., Johnson W. G., Lazzarini A. M., Duvoisin R. C., Di Iorio G., Golbe L. I.,

- Nussbaum R. L. Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. // *Science*. 1997. T. 276. C. 2045–7.
100. Funayama M., Hasegawa K., Kowa H., Saito M., Tsuji S., Obata F. A new locus for Parkinson's disease (PARK8) maps to chromosome 12p11.2-q13.1. // *Ann. Neurol.* 2002. T. 51. C. 296–301.
101. Kitada T., Asakawa S., Hattori N., Matsumine H., Yamamura Y., Minoshima S., Yokochi M., Mizuno Y., Shimizu N.. Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature*. 1998. T. 392. C. 605–8.
102. Valente E. M., Bentivoglio A. R., Dixon P. H., Ferraris A., Ialongo T., Frontali M., Albanese A., Wood N. W. Localization of a novel locus for autosomal recessive early-onset parkinsonism, PARK6, on human chromosome 1p35-p36. // *Am. J. Hum. Genet.* 2001. T. 68. C. 895–900.
103. Lee L. V., Kupke K. G., Caballar-Gonzaga F., Hebron-Ortiz M., Müller U. The phenotype of the X-linked dystonia-parkinsonism syndrome. An assessment of 42 cases in the Philippines. // *Medicine (Baltimore)*. 1991. T. 70 № 3. C. 179-87.
104. Braak H., Del Tredici K., Rub U. et al. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. // *Neurobiol Aging*. 2003. T.24. C. 197–211.
105. Del Tredici K., Braak H. Lewy pathology and neurodegeneration in premotor Parkinson's disease. *Mov. Disord.* 2012. T. 27. C. 597–607.
106. Langston et. al. Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. // *Science*. 1983. T. 219, № 4587 C. 979-80.
107. Calne D. B., Langston J. W., Martin W. R., Stoessl A. J., Ruth T. J., Adam M. J., Pate B. D., Schulzer M. Positron emission tomography after MPTP: observations relating to the cause of Parkinson's disease. // *Nature*. 1985. T. 317, № 6034 C. 246-8.
108. Bower J. H., Maraganore D. M., Peterson B. J., McDonnell S. K., Ahlskog J. E., Rocca W. A. Head trauma preceding PD: a case-control study. // *Neurology*. 2003. T. 60, № 10. C. 1610-5.
109. Fan H., Li-Ing Ho, Ching-Shiang Chi, Shyi-Jou Chen, Giia-Sheun Peng, Tzu-Min Chan, Shinn-Zong Lin, and Horng-Jyh Harn. Polyglutamine (PolyQ) Diseases: Genetics to Treatments. // *Cell Transplantation*, 2014. T. 23. C. 441–458.
110. Александров А. И. Факторы, влияющие на фрагментацию и токсичность амилоидных полимеров в клетках дрожжей. // Кандидатская диссертация, 2012. Федеральное

государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии им. А. Н. Баха Российской академии наук.

111. Hoffner G. and Djian P. Monomeric, Oligomeric and Polymeric Proteins in Huntington Disease and Other Diseases of Polyglutamine Expansion. // *Brain Sci.* 2014. T. 4. C. 91-122.
112. MacDonald M. E., Ambrose C. M., Duyao M. P., Myers R. H., Lin C., Srinidhi L., Barnes G., Taylor S. A., James M., Groot N. et al. A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. // *Cell.* 1993. T. 72. C. 971-83.
113. Bates G. Huntingtin aggregation and toxicity in Huntington's disease. // *Lancet.* 2003. T. 361. C. 1642-4.
114. Ross C. A., Tabrizi S. J. Huntington's disease: from molecular pathogenesis to clinical treatment. // *Lancet Neurol.* 2011. T. 10. C. 83-98.
115. DiFiglia M. Aggregation of huntingtin in neuronal intranuclear inclusions and dystrophic neurites in brain. // *Science.* 1997. T. 277. C. 1990-3.
116. Davies S. W., Turmaine M., Cozens B. A., DiFiglia M., Sharp A. H., Ross C. A., Scherzinger E., Wanker E. E., Mangiarini L., Bates G. P. Formation of neuronal intranuclear inclusions underlies the neurological dysfunction in mice transgenic for the HD mutation. // *Cell.* 1997. T. 90. C. 537-48.
117. Takahashi T., Katada S., Onodera O. Polyglutamine diseases: where does toxicity come from? what is toxicity? where are we going? // *J. Mol. Cell Biol.* 2010. T. 2 C. 180-91.
118. Kochneva-Pervukhova N. V., Alexandrov A. I., Ter-Avanesyan M.D. Amyloid-mediated sequestration of essential proteins contributes to mutant huntingtin toxicity in yeast. // *PLoS One.* 2012. T. 7:e29832.
119. Wang Y. et al. Characterization of proteins associated with polyglutamine aggregates: a novel approach towards isolation of aggregates from protein conformation disorders. // *Prion.* 2007. T. 1, № 2. C. 128-35.
120. Wear M. P. et al. Proteins with intrinsically disordered domains are preferentially recruited to polyglutamine aggregates. // *PLoS One.* 2015. T. 10. e0136362.
121. Mitsui K., Doi H., Nukina N. Proteomics of polyglutamine aggregates. // *Methods in enzymology.* 2006. T. 412. № 06. C. 63-76.

122. Nasir J. et al. Targeted disruption of the Huntington's disease gene results in embryonic lethality and behavioral and morphological changes in heterozygotes. // *Cell*. 1995. T. 81. C. 811–823.
123. Duyao M. P. et al. Inactivation of the mouse Huntington's disease gene homolog Hdh. // *Science*. 1995. T. 269. C. 407–410
124. Gauthier L. R., Charrin B. C., Borrell-Pagès M., Dompierre J. P., Rangone H., Cordelières F. P., De Mey J., MacDonald M. E., Lessmann V., Humbert S., Saudou F. Huntingtin controls neurotrophic support and survival of neurons by enhancing BDNF vesicular transport along microtubules. // *Cell*. 2004. T. 118, № 1 C. 127-38.
125. Davies S. W., Sathasivam K., Hobbs C., Doherty P., Mangiarini L., Scherzinger E., Wanker E. E., Bates G. P. Detection of polyglutamine aggregation in mouse models. // *Methods Enzym.* 1999. T. 309. C. 687–701.
126. Marsh J. L., Pallos J., Thompson L. M. Fly models of Huntington's disease. // *Hum. Mol. Genet.* 2003. T. 12. C. 187–93.
127. Faber P. W., Voisine C., King D. C., Bates E. A., Hart A. C. Glutamine/proline-rich PQE-1 proteins protect *Caenorhabditis elegans* neurons from huntingtin polyglutamine neurotoxicity. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2002. T. 99. C. 17131–6.
128. Meriin A. B., Zhang X., He X., Newnam G. P., Chernoff Y. O., Sherman M. Y. Huntingtontoxicity in yeast model depends on polyglutamine aggregation mediated by a prion-like protein Rnq1. *J. Cell. Biol.* 2002. T. 157. C. 997–1004.
129. Hughes R. E. et al. Altered transcription in yeast expressing expanded polyglutamine. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2001. T. 98. C. 13201–13206.
130. Mitkevich O. V., Kochneva-Pervukhova N. V., Surina E. R., Benevolensky S. V., Kushnirov V. V., Ter-Avanesyan M. D.. DNA aptamers detecting generic amyloid epitopes. // *Prion*. 2012. T. 6. C. 400–6.
131. Gokhale K. C., Newnam G. P., Sherman M. Y., Chernoff Y. O. Modulation of prion-dependent polyglutamine aggregation and toxicity by chaperone proteins in the yeast model. // *J. Biol. Chem.* 2005. T. 280. C. 22809–18.

132. Duennwald M. L., Jagadish S., Muchowski P. L. & Lindquist S. Flanking sequences profoundly alter polyglutamine toxicity in yeast. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006. T. 103. C. 11045–11050.
133. Tauber E., Miller-Fleming L., Mason R. P., Kwan W., Clapp J., Butler N. J., Outeiro T. F., Muchowski P. J., Giorgini F. Functional gene expression profiling in yeast implicates translational dysfunction in mutant huntingtin toxicity. // *J. Biol. Chem.* 2011. T. 286. C. 410–9.
134. Meriin A. B., Zhang X., Alexandrov I. M., Salnikova A. B., Ter-Avanesian M. D., Chernoff Y. O., Sherman M. Y. Endocytosis machinery is involved in aggregation of proteins with expanded polyglutamine domains. // *FASEB J.* 2007. T. 21. C. 1915–25.
135. Duennwald M. L., Lindquist S. Impaired ERAD and ER stress are early and specific events in polyglutamine toxicity. // *Genes Dev.* 2008. T. 22. C. 3308–19.
136. Bocharova N. A., Sokolov S. S., Knorre D. A., Skulachev V. P., Severin F. F. Unexpected link between anaphase promoting complex and the toxicity of expanded polyglutamines expressed in yeast. // *Cell Cycle.* 2008. T. 7. C. 3943–6.
137. Papsdorf K., Kaiser C. J. O., Drazic A., Grötzinger S. W., Haebner C., Eisenreich W., Richter K. Polyglutamine toxicity in yeast induces metabolic alterations and mitochondrial defects. // *BMC Genomics.* 2015. T. 16. C. 662.
138. Urakov V. N. et al. Interdependence of amyloid formation in yeast: implications for polyglutamine disorders and biological functions. // *Prion.* 2010. T. 4. C. 45–52.
139. Kryndushkin D., Pripuzova N., Burnett B. G., Shewmaker F. Non-targeted identification of prions and amyloid-forming proteins from yeast and mammalian cells. // *J. Biol. Chem.* 2013. T. 288. C. 27100–11.
140. Nizhnikov A. A., Alexandrov A. I., Ryzhova T. A., Mitkevich O. V., Dergalev A. A., Ter-Avanesyan M. D., Galkin A. P. Proteomic screening for amyloid proteins. // *PLoS One.* 2014. T. 9:e116003.
141. Zhao X., Park Y-N., Todor H., Moomau C., Masison D., Eisenberg E., Greene L. E. Sequestration of Sup35 by aggregates of huntingtin fragments causes toxicity of [*PSI*<sup>+</sup>] yeast. // *J. Biol. Chem.* 2012. T. 287. C. 23346–55.



142. Gong H., et al. Polyglutamine toxicity is controlled by prion composition and gene dosage in yeast. // PLoS Genet. 2012. T. 8, e1002634.
143. Salnikova A. B., D. S. Kryndushkin, V. N. Smirnov, V. V. Kushnirov, and M. D. Ter-Avanesyan. Nonsense suppression in yeast cells overproducing Sup35 (eRF3) is caused by its non-heritable amyloids. // J. Biol. Chem. 2005. T. 280. C. 8808–8812.
144. Derkatch I. L., S.M. Uptain, T. F. Outeiro, R. Krishnan, S. L. Lindquist *et al.* Effects of Q/N-rich, polyQ, and non-polyQ amyloids on the de novo formation of the [PSI<sup>+</sup>] prion in yeast and aggregation of Sup35 in vitro. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2004. T. 101. C. 12934–12939.
145. Vitrenko Y. A., E. O. Gracheva, J. E. Richmond, and S. W. Liebman. Visualization of aggregation of the Rnq1 prion domain and cross-seeding interactions with Sup35NM. // J. Biol. Chem. 2007. T. 282. C. 1779–1787.
146. O’Nuallain B., Williams A. D., Westermark P., Wetzel R. Seeding specificity in amyloid growth induced by heterologous fibrils. // J. Biol. Chem. 2004. T. 279. C. 17490–9.
147. Krebs M. R. H., Morozova-Roche L. A., Daniel K., Robinson C. V., Dobson C. M. Observation of sequence specificity in the seeding of protein amyloid fibrils. // Protein Sci. 2004 T. 13. C. 1933–8.
148. Yoshiaki Furukawa, Kumi Kaneko, Gen Matsumoto, Masaru Kurosawa and Nobuyuki Nukina. Cross-Seeding Fibrillation of Q/N-Rich Proteins Offers New Pathomechanism of Polyglutamine Diseases. // The Journal of Neuroscience. 2009. T. 29, № 16 C. 5153–5162.
149. Duennwald M. L., Jagadish S., Giorgini F., Muchowski P. J., Lindquist S. A network of protein interactions determines polyglutamine toxicity. // Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 2006. T. 103. C.11051–6.
150. Giorgini F., Guidetti P., Nguyen Q., Bennett S. C., Muchowski P. J. A genomic screen in yeast implicates kynurenine 3-monooxygenase as a therapeutic target for Huntington disease. // Nature genetics. 2005. T. 37. C. 526–531.
151. Fuentealba R., Udán M., Bell S., Wegorzewska I., Shao J., et. al. Interaction with polyglutamine aggregates reveals a Q/N-rich domain in TDP-43. // The Journal of biological chemistry. 2010. T. 285. C. 26304–26314.

152. Li L. B., Xu K., Bonini N.M. Suppression of polyglutamine toxicity by the yeast Sup35 prion domain in *Drosophila*. // *J. Biol. Chem.* 2007. T. 282 № 52. C. 37694-701.
153. Ayyadevara S., Balasubramaniam M., Gao Y., Yu L. R., Alla R., Shmookler Reis R. Proteins in aggregates functionally impact multiple neurodegenerative disease models by forming proteasome-blocking complexes. // *Aging Cell.* 2015. T. 1. C. 35-48.
154. Ghosh D. K., Roy A., Ranjan A. Aggregation-prone Regions in HYPK Help It to Form Sequestration Complex for Toxic Protein Aggregates. // *J. Mol. Biol.* 2018 T. 430. № 7. C. 963-986.
155. Kayatekin C., Matlack K. E. S., Hesse W. R., Guan Y., Chakrabortee S., Russ J., Wanker E. E., Shah J. V., Lindquist S. Prion-like proteins sequester and suppress the toxicity of huntingtin exon 1. // *Proc. Natl. Acad. Science U S A.* 2014. T. 111. C. 12085-90.
156. Ripaud L., Chumakova V., Antonin M., Hastie A. R., Pinkert S., Körner R., Ruff K. M., Pappu R. V., Hornburg D., Mann M., Hartl F. U., Hipp M. S. Overexpression of Q-rich prion-like proteins suppresses polyQ cytotoxicity and alters the polyQ interactome. // *Proc. Natl. Acad. Sc. U S A.* 2014. T. 111. № 51. C. 18219-24.
157. Sherman F., Fink G.R. and Hicks J.B. *Methods in Yeast Genetics.* // 1986. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Press.
158. Sambrook J., Fritsch E. E., and Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* // 1989a. 2<sup>nd</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Press.
159. Chernoff Y.O., Lindquist S.L., Ono B., Inge-Vechtomov S.G. and Liebman S.W. Role of the chaperone protein Hsp104 in propagation of the yeast prion-like factor [PSI<sup>+</sup>]. // *Science*, 1995. T. 268. C. 880-884.
160. Thomas B. J. and Rothstein R. Elevated recombination rates in transcriptionally active DNA. // *Cell.* 1989. T. 56. C. 619–630.
161. Sambrook J, Russell DW. The inoue method for preparation and transformation of competent *E. coli*: "ultra-competent" cells. // *CSH. Protoc.* 2006.
162. Gietz R. D. and Sugino A. New yeast-*Escherichia coli* shuttle vectors constructed with *in vitro* mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites. // *Gene.* 1988. T. 74, C. 527–534.

163. Urakov V. N. *et al.* N-terminal region of *Saccharomyces cerevisiae* eRF3 is essential for the functioning of the eRF1/eRF3 complex beyond translation termination. // *BMC. Mol. Biol.* 2006. T. 7, C. 34.
164. Valouev I. A., Urakov V. N., Kochneva-Pervukhova N. V., Smirnov V. N. and Ter-Avanesyan M. D. Translation termination factors function outside of translation: yeast eRF1 interacts with myosin light chain, Mlc1p, to effect cytokinesis. // *Mol Microbiol.* 2004. T. 53. C. 687–696.
165. Agaphonov M. and Alexandrov A. Self-excising integrative yeast plasmid vectors containing an intronated recombinase gene. // *FEMS Yeast Res.* 2014. T. 14, C. 1048–1054.
166. Sikorski R. S. and Hieter P. A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. // *Genetics.* 1989. T. 122, C. 19–27.
167. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. // *Nature.* 1970. T. 227. C. 680-685.
168. Kushnirov V. V., Alexandrov I. M., Mitkevich O. V., Shkundina I. S. and Ter-Avanesyan M. D. Purification and analysis of prion and amyloid aggregates. // *Methods.* 2006. T. 39, C. 50–55.
169. Meriin A. B. *et al.* Aggregation of expanded polyglutamine domain in yeast leads to defects in endocytosis. // *Mol. Cell. Biol.* 2003. T. 23. C. 7554–7565.
170. Perez M. K. *et al.* Recruitment and the role of nuclear localization in polyglutamine-mediated aggregation. // *J. Cell. Biol.* 1998. T. 143. C. 1457–1470.
171. Kazantsev A., Preisinger, E., Dranovsky A., Goldgaber D. and Housman D. Insoluble detergent-resistant aggregates form between pathological and nonpathological lengths of polyglutamine in mammalian cells. // *Proc. Natl. Acad. Sc. USA.* 1999. T. 96. C. 11404–11409.
172. Steffan J. S. *et al.* The Huntington’s disease protein interacts with p53 and CREB-binding protein and represses transcription. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000. T. 97. C. 6763–6768.
173. Shimohata T. *et al.* Expanded polyglutamine stretches interact with TAFIII30, interfering with CREB-dependent transcription. // *Nature Genet.* 2000. T. 26. C. 29–36.
174. Nucifora F. C. Jr. *et al.* Interference by huntingtin and atrophin-1 with cbp-mediated transcription leading to cellular toxicity. // *Science.* 2001. T. 291. C. 2423–2428.

175. Elson E. L. Fluorescence correlation spectroscopy: past, present, future. // *Biophys. J.* 2011. T. 101. C. 2855–2870.
176. Kawai-Noma S. et al. In vivo evidence for the fibrillar structures of Sup35 prions in yeast cells. // *J. Cell. Biol.* 2010. T. 190. C. 223–231.
177. Kawai-Noma S. et al. Dynamics of yeast prion aggregates in single living cells. // *Genes Cells.* 2006. T. 11. C. 1085–1096.
178. Paushkin S. V., Kushnirov V. V., Smirnov V. N. and Ter-Avanesyan M. D. Propagation of the yeast prion-like [*PSI*<sup>+</sup>] determinant is mediated by oligomerization of the SUP35-encoded polypeptide chain release factor. // *EMBO J.*, 1996. T. 15. C. 3127-3134.
179. Isas J. M., Langen A., Isas M. C., Pandey N. K. and Siemer A. B. Formation and Structure of Wild Type Huntingtin Exon-1 Fibrils. // *Biochemistry.* 2017. T. 56 № 28. C. 3579-3586.
180. Schaefer M.H., Wanker E.E., Andrade-Navarro M.A. Evolution and function of CAG/polyglutamine repeats in protein-protein interaction networks. // *Nucleic Acids Res.* 2012. T. 40. C. 4273 – 87.
181. Paradisi I., Hernández A., Arias S. Huntington disease mutation in Venezuela: age of onset, haplotype analyses and geographic aggregation. // *J. Hum. Genet.* 2008. T. 53. C. 127–35. Park S. H., Kukushkin Y., Gupta R. et al. PolyQ proteins interfere with nuclear degradation of cytosolic proteins by sequestering the Sis1p chaperone. // *Cell.* 2013. T. 154. C. 134-45.
182. The U.S.-Venezuela Collaborative Research Project, Wexler NS, Lorimer J, Porter J, Gomez F, Moskowitz C, Shackell E, Marder K, Penchaszadeh G, Roberts SA, et al. Venezuelan kindreds reveal that genetic and environmental factors modulate Huntington's disease age of onset. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004. T. 101. C. 3498–503.
183. Djoussé L., Knowlton B., Hayden M., Almqvist E. W., Brinkman R., Ross C., Margolis R., Rosenblatt A., Durr A., Dode C., et al. Interaction of normal and expanded CAG repeat sizes influences age at onset of Huntington disease. // *Am. J. Med. Genet. A.* 2003. T. 119 A. C. 279-82.
184. Aziz N. A., Jurgens C. K., Landwehrmeyer G. B., van Roon-Mom W. M. C., van Ommen G. J. B., Stijnen T., Roos R. A. C. Normal and mutant HTT interact to affect clinical severity and progression in Huntington disease. // *Neurology* 2009. T. 73. C. 1280–5.

185. França M. C., Emmel V. E., D'Abreu A., Maurer-Morelli C. V., Secolin R., Bonadia L. C., da Silva M. S., Nucci A., Jardim L. B., Saraiva-Pereira M. L., et al. Normal ATXN3 allele but not CHIP polymorphisms modulates age at onset in Machado–Joseph disease. // *Front. Neurol.* 2012. T. 3.
186. Slepko N., Bhattacharyya A.M., Jackson G.R., Steffan J.S., Marsh J.L., Thompson L.M., Wetzel R. Normal-repeat-length polyglutamine peptides accelerate aggregation nucleation and cytotoxicity of expanded polyglutamine proteins. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2006. T. 103. C. 14367–72.
187. Saleh A. A., Bhadra A. K., Roy I. Cytotoxicity of mutant huntingtin fragment in yeast can be modulated by the expression level of wild type huntingtin fragment. // *ACS Chem. Neuroscine.* 2014. T. 5. C. 205-15.
188. Jardim L., Silveira I., Pereira M. L., do Ceu Moreira M., Mendonca P., Sequeiros J., Giugliani R. Searching for modulating effects of SCA2, SCA6 and DRPLA CAG tracts on the Machado-Joseph disease (SCA3) phenotype. // *Acta Neurol. Scand.* 2003. T. 107. C. 211–4.
189. Pulst S-M., Santos N., Wang D., Yang H., Huynh D., Velazquez L., Figueroa K. P. Spinocerebellar ataxia type 2: polyQ repeat variation in the CACNA1A calcium channel modifies age of onset. // *Brain.* 2005. T. 128. C. 2297–303.
190. de Castilhos R. M., Furtado G. V., Gheno T. C., Schaeffer P., Russo A., Barsottini O., Pedroso J. L., Salarini D. Z., Vargas F. R., de Lima M. A. D. F. D., et al. Spinocerebellar ataxias in Brazil--frequencies and modulating effects of related genes. // *Cerebellum.* 2014. T. 13. C. 17–28.
191. Du Montcel S. T., Durr A., Bauer P., Figueroa K. P., Ichikawa Y., Brussino A., Forlani S., Rakowicz M., Schöls L., Mariotti C., et al. Modulation of the age at onset in spinocerebellar ataxia by CAG tracts in various genes. // *Brain.* 2014. T. 137. C. 2444–55.
192. Elden A. C., Kim H-J., Hart M. P., Chen-Plotkin A. S., Johnson B. S., Fang X., Aramkola M., Geser F., Greene R., Lu M. M., et al. Ataxin-2 intermediate-length polyglutamine expansions are associated with increased risk for ALS. // *Nature.* 2010. T. 466. C. 1069–75.
193. Bonini N. M., Gitler A. D. Model organisms reveal insight into human neurodegenerative disease: ataxin-2 intermediate-length polyglutamine expansions are a risk factor for ALS. // *J. Mol. Neuroscine.* 2011. T. 45. C. 676–83.

194. Farg M. A., Soo K.Y., Warraich S. T., Sundaramoorthy V., Blair I. P., Atkin J. D. Ataxin-2 interacts with FUS and intermediate-length polyglutamine expansions enhance FUS related pathology in amyotrophic lateral sclerosis. // *Hum. Mol. Genet.* 2013. T. 22. C. 717–28.
195. Kim J-M., Hong S., Kim G. P., Choi Y. J., Kim Y. K., Park S. S., Kim S. E., Jeon B. S. Importance of low-Range CAG expansion and CAA interruption in SCA2 Parkinsonism. // *Arch. Neurol.* 2007. T. 64. C. 1510.
196. Yamashita C., Tomiyama H., Funayama M., Inamizu S., Ando M., Li Y., Yoshino H., Araki T., Ichikawa T., Ehara Y., et al. The evaluation of polyglutamine repeats in autosomal dominant Parkinson's disease. // *Neurobiol. Aging.* 2014. T. 35. C. 1779. e17–1779. e21.
197. Gratuze M., Cisbani G., Cicchetti F., Planel E. Is Huntington's disease a tauopathy? // *Brain.* 2016. T. 139. C. 1014–25.
198. Jellinger K. A. Interaction between pathogenic proteins in neurodegenerative disorders. // *J. Cell. Mol. Med.* 2012. T. 16. C. 1166–83.
199. Gotz J. Formation of neurofibrillary tangles in p3011 Tau transgenic mice induced by A $\beta$  42 fibrils. // *Science.* 2001. T. 293. C. 1491–5.
200. Arslan F., Hong J. Y., Kanneganti V., Park S-K., Liebman S. W. Heterologous aggregates promote de novo prion appearance via more than one mechanism. // *PLoS Genet.* 2015. 11:e1004814.
201. Valouev I. A., Kushnirov V. V., Ter-Avanesyan M. D. Yeast polypeptide chain release factors eRF1 and eRF3 are involved in cytoskeleton organization and cell cycle regulation. // *Cell Motil. Cytoskeleton.* 2002. T. 52. C. 161-73.
202. Chabelskaya S., Kiktev D., Inge-Vechtomov S. et al. Nonsense mutations in the essential gene SUP35 of *Saccharomyces cerevisiae* are non-lethal. // *Mol. Gen. Genomics.* 2004. T. 272. C. 297–307.
203. Kiktev D., Moskalenko S., Murina O. et al. The paradox of viable sup45 STOP mutations: a necessary equilibrium between translational readthrough, activity and stability of the protein. // *Mol. Genet. Genomics.* 2009. T. 282. C. 83-96.
204. Drozdova P. B., Tarasov O. V., Matveenko A. G. et al. Genome Sequencing and Comparative Analysis of *Saccharomyces cerevisiae* Strains of the Peterhof Genetic Collection. // *PLoS One* 2016. T. 11:e0154722.
205. Bocharova N., Chave-Cox R., Sokolov S. et al. Protein aggregation and neurodegeneration: clues from a yeast model of Huntington's disease. // *Biochemistry (Mosc.)* 2009. T. 74. C. 231-4.

206. Park S. H., Kukushkin Y., Gupta R. et al. PolyQ proteins interfere with nuclear degradation of cytosolic proteins by sequestering the Sis1p chaperone. // *Cell*. 2013. T. 154. C. 134-45.
207. Ocampo A., Zambrano A., Barrientos A. Suppression of polyglutamine-induced cytotoxicity in *Saccharomyces cerevisiae* by enhancement of mitochondrial biogenesis. // *FASEB. J.* 2010. T. 24. C. 1431-41.
208. Yang J., Hao X., Cao X. et al. Spatial sequestration and detoxification of Huntingtin by the ribosome quality control complex. // *eLife*. 2016. T. 5, e11792.
209. Kaiser C. J., Grotzinger S. W., Eckl J. M. et al. A network of genes connects polyglutamine toxicity to ploidy control in yeast. // *Nat. Commun.* 2013. T. 4. C. 1571.
210. Duennwald M. L., Lindquist S. Impaired ERAD and ER stress are early and specific events in polyglutamine toxicity. // *Genes Dev.* 2008. T. 22. C. 3308-19.
211. Iksoo Jeon, Francesca Cicchetti, Giulia Cisbani, Suji Lee, Endan Li, Jiwoo Bae, Nayeon Lee, Ling Li, Wooseok Im, Manho Kim, Hyun Sook Kim, Seung-Hun Oh, Tae-Aug Kim, Jung Jae Ko, Benoit Aub, Abid Oueslati, Yun Joong Kim, Jihwan Song. // Human-to-mouse prion-like propagation of mutant huntingtin protein. // *Acta Neuropathol.* 2016. T. 132 C. 577–592.
212. Liu H. S., Jan M. S., Chou C. K., Chen P. H., Ke N. J. Is green fluorescent protein toxic to the living cells? // *Biochem Biophys Res Commun.* 1999. T. 260 № 3. C. 712-7.
213. Ganini D., Leinisch F., Kumar A., Jiang J., Tokar E., Malone C., Petrovich R., Mason R. Fluorescent proteins such as eGFP lead to catalytic oxidative stress in cells. // *Redox Biol.* 2017. C. 462–468.