

На правах рукописи

ЛАЗАРЕВ

Владимир Федорович

**МЕХАНИЗМЫ АГРЕГАЦИИ МУТАНТНЫХ БЕЛКОВ В МОДЕЛЯХ БОЛЕЗНИ
ХАНТИНГТОНА И АМИОТРОФИЧЕСКОГО БОКОВОГО СКЛЕРОЗА**

03.03.04 – Клеточная биология, цитология, гистология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой
степени кандидата биологических наук

Санкт-Петербург

2013

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте цитологии
Российской академии наук.

Научный руководитель: доктор биологических наук
Маргулис Борис Александрович,
Институт цитологии РАН

Официальные оппоненты: Доктор биологических наук
Казначеева Елена Валентиновна,
Институт цитологии РАН

Кандидат биологических наук
Галкин Алексей Петрович,
Санкт-Петербургский филиал Института
общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН

Ведущая организация: Московский государственный университет
им. М.В. Ломоносова

Защита диссертации состоится «31» мая 2013 года в 14 часов на заседании Диссертационного совета
Д002.230.01 на базе Федерального государственного учреждения науки Института цитологии РАН по
адресу:

194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий проспект, д. 4
e-mail: cellbio@mail.cytspb.rssi.ru
Сайт: <http://www.cytspb.rssi.ru>
Факс: 8(812)297-35-41

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института цитологии РАН.

Автореферат разослан «30» апреля 2013 года.

Ученый секретарь диссертационного
совета, кандидат биологических наук



Е.В. Каминская

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы.

Нейродегенеративные патологии представляют серьезную угрозу человечеству, и не только людям, достигшим преклонного возраста; жертвами таких патологий часто становятся люди в возрасте до 40 лет. Несмотря на перспективные исследования, ведущиеся в лучших научных центрах, терапия нейродегенеративных патологий остается пока на уровне использования симптоматических средств. Поэтому внимание исследователей сосредоточено на изучении молекулярных механизмов патологий, на понимании того, как реализуется патогенная программа в модельных организмах и на поиске мишеней для фармакологического вмешательства.

Многие нейродегенеративные процессы являются следствием накопления в нейронах или в их непосредственной близости комплексов и агрегатов мутантных белков, которые нарушают клеточную физиологию и, в итоге, приводят к гибели клеток. Наше внимание привлекли два заболевания из этой группы: болезнь Хантингтона (БХ) и амиотрофический боковой склероз (АБС). В качестве модели этих заболеваний мы использовали временную трансфекцию клеток нейробластомы генами, кодирующими соответствующие мутантные белки.

В патогенезе БХ и других полиглутаминовых заболеваний формирование белковых комплексов происходит за счет образования водородных связей между соседними цепями глутаминовых повторов (Perutz et al., 1994) либо благодаря формированию ковалентных связей между глутаминами и донорами активных аминогрупп. В обоих случаях агрегаты по мере их роста становятся недоступными клеточным протеазам, и накопление агрегирующих белковых комплексов внутри клетки коррелирует с нарушением работы протеасом, дисфункцией ионных каналов, появлением свободных радикалов, что является причиной гибели популяций нейрональных клеток.

Значительное число семейных случаев АБС относится к мутации в гене белка супероксид дисмутаза-1 (СОД1), представляющей собой замену G93A (Rosen et al., 1993). Накопление мутантного белка приводит к его агрегации, что сопровождается выделением свободных радикалов и дисфункцией тех систем, которые должны снижать нагрузку реактивных форм кислорода (Valentine, Hart, 2003).

В патогенезе обоих заболеваний мутантные белки могут формировать комплексы с нормальными клеточными белками, причем функция последних может подавляться и (или) вносить вклад в токсичность образующихся комплексов. Одним из таких белков является фермент глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (ГАФД), роль которого в процессе агрегации мутантных белков, однако, исследована мало. Согласно литературным данным, ГАФД обнаруживается на срезах мозга пациентов с болезнью Паркинсона (Tsuchiya et al., 2005), БХ (Wu et al., 2007) и АБС (Pierce et al., 2008) в точках локализации соответствующих белков-патогенов. Более того, установлен факт физической связи

указанных белков, например, амилоидного бета-пептида с ГАФД (Naletova et al., 2008). Следует подчеркнуть, что поскольку количество фермента в любой эукариотической клетке крайне велико, он может влиять на сам процесс агрегации и увеличивать патогенный эффект, по меньшей мере в болезни Альцгеймера (Sirover, 2011).

Современная наука крайне важную роль в борьбе с мутантными патогенными белками отводит молекулярным шаперонам, в частности белкам теплового шока с массой 70 кДа (БТШ70) (Margulis et al., 2006). Шаперонный аппарат клетки препятствует появлению в нейронах токсичных олигомеров и комплексов мутантных белков и подавляет их цитотоксическую активность, причем не последнюю роль в этом играет именно БТШ70. Поэтому необходимо исследовать механизмы взаимодействия БТШ70 как с мутантными белками и пептидами, так и с другими белками-участниками в процессе сборки патогенных агрегатов.

Цели и задачи исследования.

Целью данной работы было исследование механизмов формирования агрегатов в моделях болезни Хантингтона и амиотрофического бокового склероза, а также определение возможных мишеней для терапевтического вмешательства. Исходя из этого, были поставлены следующие задачи.

1. Выяснить роль ГАФД в формировании белковых агрегатов в моделях нейродегенеративных патологий (БХ и АБС).
2. Определить возможную роль тканевой трансклутаминазы, в формировании связей между ГАФД и патогенными полипептидами.
3. Разработать новую тест-систему для скрининга низкомолекулярных факторов, связывающих ГАФД и обладающих антиагрегатной активностью в модели БХ, и осуществить проверку эффективности системы.
4. Исследовать функцию шаперона БТШ70 в процессе формирования агрегатов мутантного хантингтина.
5. Разработать тест-систему для определения шаперонной активности БТШ70 и его количества в клетке.

Основные положения, выносимые на защиту.

1. В моделях БХ и АБС ГАФД является критическим участником процесса образования агрегатов.
2. Низкомолекулярные соединения, связывающие ГАФД, способны снижать уровень агрегации мутантных белков в обеих моделях нейродегенерации.
3. Шаперон БТШ70 препятствует агрегации в модели БХ за счет взаимодействия как с мутантным хантингином, так и с ферментом ГАФД.

Научная новизна полученных результатов.

В настоящей работе впервые продемонстрирована ведущая роль ГАФД в патогенезе таких нейродегенеративных патологий, как БХ и АБС. Кроме того, доказано участие тканевой трансглутаминазы в формировании связей между ГАФД и мутантными белками в моделях обеих указанных патологий.

Были определены возможные пути фармакологического подавления процесса агрегации мутантных хантингина и супероксид дисмутазы-1. Впервые была разработана тест-система для скрининга фармакологических препаратов, учитывающая влияние ГАФД и тТГ на образование патогенных белковых комплексов.

Приоритетные данные были получены при анализе взаимодействий между шапероном БТШ70 и белками, составляющими агрегаты в имитации БХ, мутантным хантингином и ГАФД; установлено, что оба этих компонента связываются шапероном.

Теоретическое и практическое значение работы.

Полученные результаты свидетельствуют о значительной роли ГАФД в таких нейродегенеративных патологиях, как болезнь Хантингтона и амиотрофический боковой склероз. Доказано, что противоагрегатное действие шаперона БТШ70 достигается не только за счет его взаимодействия с мутантным белком, но и за счет формирования связей с ГАФД.

Тест-система для проверки веществ, предположительно связывающих ГАФД, предложенная в данной работе, может использоваться для высокопроизводительного скрининга библиотек фармакологических препаратов.

Апробация работы.

Основные положения работы были представлены на тринадцатой Всероссийской медико-биологической конференции молодых исследователей «Человек и его здоровье» (Санкт-Петербург, 2010), на научной конференции по биоорганической химии и биотехнологии «X чтения памяти

академика Юрия Анатольевича Овчинникова» (Москва, Пущино, 2011), на 9-ом европейском симпозиуме белкового общества (Швеция, 2011), на XXIII международной зимней молодежной школе «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии». (Москва, 2011) и на конференции молодых ученых «Молекулярная и клеточная биология: прикладные аспекты» (Москва, 2012).

Личный вклад автора.

Все экспериментальные процедуры, описанные в работе, были проведены автором лично. Материалы, вошедшие в представленную работу, обсуждались и публиковались совместно с соавторами и научными руководителями.

Финансовая поддержка работы.

Работа проходила при поддержке программ РАН «Фундаментальные науки – медицине» и «Молекулярная и клеточная биология», а также Российского фонда фундаментальных исследований (гранты офи-м № 11-04-12047 и № 12-08-31523-мол-а).

Структура и объем работы.

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов работы, обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы, включающего 172 ссылок. Диссертация изложена на 114 страницах, содержит 15 рисунков и 1 таблицу.

Список сокращений.

АБС – амиотрофический боковой склероз

БТШ70 – белок теплового шока 70 кДа

БХ – болезнь Хантингтона

ГАФД – глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа

ДСН – додецилсульфат натрия

ИФА – иммуно-ферментный анализ

КМЛА – карбоксиметилированный лактальбумин

СОД1 – супероксиддисмутаза-1

тТГ – тканевая трансглутаминаза

ФСР – фосфатно-солевой раствор

ЭДТА – этилендиаминтетраацетат

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследований.

Культивирование клеток. Клетки нейробластомы человека SK-N-SH были любезно предоставлены проф. Д. Рубинштейном из Университета Кэмбриджа (Великобритания). Культивирование клеток проводили при температуре 37 °С в атмосфере 5 % CO₂. Для культивирования использовали среду DMEM (Биолот) с добавлением L-глутамина, гентамицина и 10 % фетальной сыворотки (Панэко).

Белки и пептиды. Рекомбинантный человеческий БТШ70 выделяли из бактерий, трансформированных плазмидой pMSHsp70. Экстракт бактериальных клеток подвергали анионообменной хроматографии с гелем DEAE-Сефарозы (GE Health Care). Связавшиеся белки элюировали раствором, содержащим 0.35 М NaCl, после чего элюат пропускали через колонку с гелем АТФ-агарозы (Sigma). БТШ70 элюировали раствором, содержащим 5 мМ АТФ, далее переводили в свободную от нуклеотида форму и концентрировали.

ГАФД, выделенный из мышцы кролика, был любезно предоставлен проф. В.И. Муронцом (Институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова).

Рекомбинантный первый экзон хантингтина, содержащий 58 (мутантная форма) либо 23 (контрольная форма) остатка глутамина, выделяли из бактерий, трансформированных плазмидами pGEX-2TK-httQ58 либо pGEX-2TK-httQ23, соответственно. Экстракты бактерий инкубировали с Глутатион-сефарозой (GE Health Care) и после промывок геля элюцию белков производили с помощью раствора, содержащего 15 мМ глутатиона (Sigma), при pH 8.0.

Трансфекция клеток. Для временной трансфекции использовали плазмиды, кодирующие первый экзон белка хантингтина с различным количеством остатков глутамина (Q25 и Q103), сшитыми с геном усиленного зеленого флуоресцентного белка (EGFP) (плазмиды получены от проф. Д. Рубинштейна), и плазмиды, кодирующие супероксиддисмутазу-1 (СОD1WT) и ее мутантную форму (СОD1G93A), соединенные с геном зеленого флуоресцентного белка, EGFP (получены от д-ра М. Читэма, Колледж Университета Лондона).

За 24 ч до трансфекции клетки пересеивали в 96-луночную или 6-луночную плату в свежую среду (30000 клеток на 1 мл). В качестве трансфицирующего агента использовали систему Lipofectamine – PLUS (Invitrogen.).

Трансфекция малой интерферирующей РНК против ГАФД (Ambion GAPDH siRNA) проводилась согласно протоколу производителя, за сутки до трансфекции генами Q103 (Q25) или одновременно с

трансфекцией генами СОД1G93А либо СОД1WТ. Суть данного метода заключается в том, что в результате трансфекции клеток малой интерферирующей РНК экспрессия целевого белка подавляется.

Агрегация белков в бесклеточной системе. Для анализа процесса агрегации мутантного хантингтина использовали модель, в которой процесс формирования агрегатов проходил в клеточном экстракте в пробирке. Клетки трансфицировали плазмидами, кодирующими фрагмент гена хантингтина с различным количеством остатков глутамина (Q25 и Q103). После появления диффузно распределенного по цитоплазме белка Q103-EGFP клеточные белки экстрагировали раствором, содержащим 25 мМ трис-НСl рН 8.0, 20 мМ NaCl и 1 мМ ЭДТА. Концентрацию общего белка в пробах измеряли с помощью метода Брэдфорда (Bradford, 1976). Пробы далее инкубировали при 37 °С в течение 48 ч и анализировали с применением метода ловушки на фильтре и (или) с использованием метода электрофореза с задержкой в геле (описание методов приведено ниже).

Анализ агрегации в клетках, экспрессирующих патогенный белок. Эта система анализа использовалась для исследования процесса агрегации непосредственно в клетке. Клетки трансфицировали плазмидами, кодирующими фрагмент гена хантингтина с различным количеством остатков глутамина (Q25 и Q103) или ген СОД1 мутантного и дикого типов. Спустя 24 ч после трансфекции для Q103 и 48 ч для СОД1G93А, клетки собирали, трижды промывали холодным ФСР, центрифугировали при 800 g в течение 5 мин. Супернатант удаляли. К клеточному осадку добавляли лизирующий буфер следующего состава: 10 мМ трис-НСl рН 8.0, 150 мМ NaCl, 2 % ДСН. Лизаты клеток обрабатывали ультразвуком в течение 1 мин и инкубировали при 98 °С в течение 2 мин. Пробы анализировали при помощи метода ловушки на фильтре либо при помощи метода электрофореза с задержкой в геле (описание методов приведено ниже).

Система на основе очищенных белков и пептидов. Для анализа агрегирующих комплексов мутантного хантингтина с другими белками использовали тест-систему, включающую следующие компоненты: 0.1 мг/мл Q58-GST либо Q23-GST, 0.1 мг/мл ГАФД и 0.005 мг/мл тТГ (Sigma). Формирование агрегатов инициировали введением в систему тромбина (Sigma), разрушающего связь полиглутамин-GST, из расчета 1 ЕД на 1 мкг пептида (Q58-GST либо Q23-GST). Раствор инкубировали 48 ч на роторной мешалке при 37 °С, затем подвергали анализу.

Определение субстрат-связывающей (шаперонной) активности. Измерение шаперонной активности БТШ70 проводили с помощью иммуно-ферментного анализа (Шап-ИФА) по

предложенному ранее методу (Новоселов и др. 2004). Субстратный белок-мишень, карбоксиметилированный лактальбумин (КМЛА), получали путем денатурации лактальбумина выдержкой в 8 М мочеvine, после чего в раствор белка добавляли дитиотреитол и далее проводили реакцию алкилирования по стандартному протоколу. Готовый КМЛА иммобилизовывали в лунках 96-луночного планшета в концентрации 10 мкг/мл в фосфатно-солевом растворе, ФСР. Для блокирования неспецифического связывания в лунки планшета вносили 0.3 %-ный раствор бычьего сывороточного альбумина (Sigma), после чего – клеточные экстракты в концентрациях 10 и 30 мкг/мл. Hsp70, входящий в состав белковой смеси экстрактов, связывался с денатурированным белком-мишенью, и далее в лунки вносили раствор аффинно-очищенных поликлональных антител RAF-6. Визуализацию пероксидазной активности проводили по ранее описанному способу (Еременко и др., 2010).

Метод ловушки на фильтре (Filter trap assay). Этот тест проводили с помощью метода, описанного ранее (Novoselova et al., 2005). Суть метода заключается в том, что растворимые клеточные белки проходят через поры мембраны, а нерастворимые в ДСН белковые агрегаты на ней задерживаются.

Пробы клеточных экстрактов вносили в лунки с дном из мембраны ацетат-целлюлозы специального аппарата для дот-блоттинга (Hemel Hempstead), соединенные с вакуумным насосом; мембрану предварительно промывали в экстрагирующем растворе, содержащем 0.1 % ДСН. Растворимые в ДСН клеточные белки проходили через поры мембраны, а нерастворимые белковые агрегаты задерживались. Чтобы выявить последние, мембрану инкубировали с антителами против EGFP.

ПААГ-ДСН электрофорез и иммуноблоттинг. Для приготовления проб клетки собирали, трижды промывали холодным ФСР, центрифугировали при 800 g в течение 5 мин. К сухому клеточному осадку добавляли лизирующий буфер следующего состава: 20 мМ Трис-НСl, рН 7.5, 150 мМ NaCl, 0.5 % Тритон X-100, 2 мМ ЭДТА. Электрофоретическое разделение белков проводили по методу Лаэммли (Laemmli, 1970) в 11 %-ном ПААГ.

Перенос разделенных белковых зон из геля на нитроцеллюлозную мембрану (Immobilon-P (PVDF), размер пор 0.45 мкм, фирмы Millipore Corporation) проводили, используя аппарат TransBlot (BioRad).

Зоны интересующих белков выявляли с использованием первичных моноклональных или поликлональных антител и вторичных антител против иммуноглобулина (IgG) мыши или кролика, меченных пероксидазой хрена. Пероксидазную реакцию визуализировали при помощи метода усиленной хемиллюминесценции.

Для окрашивания белковых зон использовали следующие антитела: моноклональные мышинные против EGFP, титр 1:2000 (Abscam); моноклональные мышинные против ГАФД, клон 6С5, титр 1:5000 (Abscam); поликлональные кроличьи против БТШ70, титр 1:2000 (R22); поликлональные кроличьи против тканевой трансглутаминазы, (Sigma). В работе использовали антитела против иммуноглобулина (IgG) мыши или кролика, меченные пероксидазой (фирмы Sigma, титр 1:10000).

Модификация ДСН-ПААГ электрофореза для анализа ДСН-нерастворимой клеточной фракции – электрофорез с задержкой в геле. Для анализа уровня исследуемых белков в ДСН-нерастворимой клеточной фракции использовали модификацию ДСН-ПААГ электрофореза, при котором нерастворимые комплексы задерживались в концентрирующем геле.

Клеточные осадки растворяли в 200 мкл буфера следующего состава: 62.5 мМ Трис-НСl рН 8.0, 2.5 ДСН, 10 % глицерин, 0.1 мМ ЭДТА, 0.02 % бромфеноловый синий. Пробы обрабатывали ультразвуком в течение 30 с и далее инкубировали при 100 °С в течение 5 мин.

Концентрирующий гель имел следующий состав: 2 % акриламида (АА), 0.17 % бисакриламида (бисАА), 0.125 мМ Трис-НСl, рН 6.8, 0.1 % ДСН, 0.06 % персульфат аммония (ПСА), 0.06 % N,N,N',N'-тетраметиленамин (ТЕМЕД). Для переноса белковых зон и последующего их окрашивания использовали оба геля, разделяющий и концентрирующий.

Иммунопреципитация. Для теста иммунопреципитации использовали клеточные экстракты, приготовленные с применением лизирующего буфера (20 мМ Трис-НСl, рН 7.5, 150 мМ NaCl, 0.5 % Тритон X-100, 2 мМ ЭДТА), содержащего смесь ингибиторов протеаз (1:100). После лизиса смесь центрифугировали и к надосадочной жидкости добавляли поликлональные антитела к БТШ70 или моноклональные антитела к ГАФД, а также 10 мкл Белок G-Сефарозы, и пробы инкубировали в течение ночи при 40 °С на роторном смесителе. Затем гель осаждали центрифугированием при 200 g в течение 5 мин, а супернатант отбирали для приготовления электрофорезных проб, после чего четыре раза промывали гель ФСР. Гель использовали для приготовления электрофорезных проб: к осадку добавляли четырехкратный буфер для электрофорезных проб и далее проводили определение уровня исследуемых белков с помощью метода иммуноблоттинга, как описано выше.

Определение активности дегидрогеназ по Мосману. Для проверки выживаемости клеток, синтезирующих патогенные пептиды на фоне подавленной экспрессии ГАФД, использовали метод оценки жизнеспособности по Мосману (Mosmann, 1983). Измерение сигнала производили на

иммунохимическом анализаторе «Флюорофот» (ПРОБАНАУЧПРИБОР). Результатом служила разница между значениями поглощения, полученными при 570 нм и 630 нм.

Атомно-силовая микроскопия. Для определения структуры получаемых на основе очищенных белков агрегатов использовали метод атомно-силовой микроскопии. Растворы, содержащие агрегаты, в объеме 3 мкл наносили на покровные стекла, высушивали, затем промывали деионизованной водой и снова высушивали. Анализ проб проводили на приборе Ntegra Aura (производства фирмы NT-MDT, Россия). Исследования проводили на базе Ресурсного центра микроскопии и микроанализа Санкт-Петербургского государственного университета.

Визуальная оценка уровня агрегации. Через 24 ч после временной трансфекции клеток плазмидой Q103 проводили анализ агрегатов с помощью флуоресцентного микроскопа Axioskop (Carl Zeiss). Подсчитывали количество клеток, содержащих агрегаты мутантного хантингтина и количество клеток с диффузно распределенным мутантным белком, далее определяли долю первых от общего числа трансфицированных.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью компьютерной программы Excel (Microsoft) с использованием t-критерия Стьюдента. Полученные значения представлены в виде среднего \pm стандартная ошибка среднего.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Уровень агрегации мутантного хантингтина определяется количеством ГАФД.

Анализ, проведенный с помощью метода ловушки на фильтре, позволил исследовать агрегаты во внеклеточной системе. Клеточные экстракты были приготовлены через 8 ч после трансфекции клеток плазмидами, несущими полиглутаминовые цепи различной длины. Предварительные эксперименты показали, что к этому времени в клетке уже имеется достаточное количество Q103-EGFP (либо Q25-EGFP), однако агрегаты еще не успели образоваться. В клеточном экстракте процессы формирования агрегатов продолжаются, и для сравнительной оценки количества агрегатов достаточно пропустить соответствующие экстракты через ацетат-целлюлозную мембрану и покрасить антителами к EGFP. Для выяснения роли ГАФД в формировании полиглутаминовых агрегатов известные количества очищенного фермента добавляли в экстракт на стадии формирования агрегатов. Количество образовавшегося нерастворимого материала оценивали спустя 34 ч. Оказалось, что ГАФД дозо-

зависимым образом усиливает агрегацию Q103-EGFP (рис. 1А). Эти данные удалось подтвердить в следующем эксперименте. Эндогенный ГАФД удалили из экстракта при помощи специфических антител, связанных с матрицей (белок-G сефарозой). Как видно на рис. 1Б, количество Q103-EGFP, сформировавшего агрегаты, находилось в обратной зависимости от количества удаленного ГАФД;

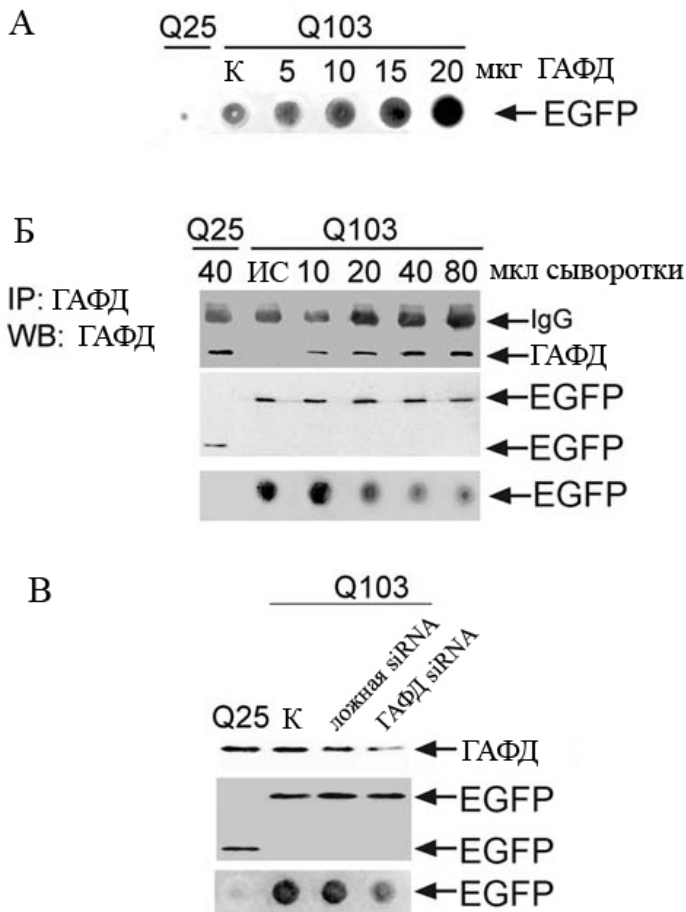


Рис. 1. (А) Добавление в клеточный экстракт, содержащий фрагмент мутантного хантингтина ГАФД (от 5 до 20 мкг) приводит к дозозависимому увеличению количества полиглутаминовых агрегатов (К – ГАФД не добавляли). (Б) Дозозависимое истощение пула ГАФД в клеточном экстракте при помощи специфических антител (от 10-ти до 80-ти мкл иммунной сыворотки) приводит к уменьшению количества нерастворимого в ДСН Q103-EGFP (ИС – добавляли 40 мкл интактной сыворотки). (В) Подавление экспрессии ГАФД в клетках, трансфицированных Q103-EGFP, при помощи интерферирующих РНК приводит к уменьшению количества агрегатов мутантного пептида (К – клетки с нормальным уровнем экспрессии ГАФД, ложная siRNA – клетки, обработанные неспецифической РНК, ГАФД siRNA – клетки обработанные siRNA против ГАФД). IP – иммунопреципитация, WB – вестерн блоттинг.

интересно, что, таким образом, удавалось снизить количество полиглутаминовых агрегатов почти в 5 раз (Guzhova I.V., Lazarev

V.F. et al., 2011).

Чтобы исследовать влияние изменения количества ГАФД в клетке на размер растущих агрегатов, мы использовали метод снижения экспрессии белка с помощью малых интерферирующих РНК. С этой целью клетки SK-N-SH за сутки до запуска процесса агрегации мутантного белка Q103 трансфицировали малой РНК (siRNA) против ГАФД и после определения уровня фермента анализировали темпы агрегации. По результатам иммуноблоттинга можно сказать, что применение такой технологии позволило снизить количество ГАФД в клетках нейробластомы человека SK-N-SH на 50-60 %, что привело к подавлению роста агрегатов и суммарному уменьшению их количества почти в два раза (рис. 1В) (Guzhova, Lazarev et al., 2011).

ГАФД участвует в формировании агрегатов в модели АБС.

Предполагая, что участие ГАФД в агрегации мутантных белков характерно для других патологий, мы проанализировали роль фермента в формировании патогенных белковых агрегатов на примере еще одного нейродегенеративного заболевания, амиотрофического бокового склероза. Для этого использовали генную конструкцию СОД1-EGFP дикого и мутантного (образующего агрегаты) типов (СОД1WT-EGFP и СОД1G93A-EGFP, соответственно). Применяя технологию специфических малых интерферирующих РНК, мы определили влияние клеточной концентрации ГАФД на количество агрегатов в клетках-моделях АБС (рис.2). Анализируя результаты, полученные с помощью электрофореза с задержкой в геле, можно обнаружить, что в экстрактах, выделенных из клеток, трансфицированных, специфической к ГАФД интерферирующей РНК, количество ГАФД на поверхности концентрирующего геля, входящей в состав высокомолекулярного комплекса СОД1G93A-ГАФД, значительно меньше, чем в пробах, выделенных из клеток, не обработанных РНК;

соответственно, интенсивность окраски зон ГАФД в разделяющем геле изменяется в обратной зависимости

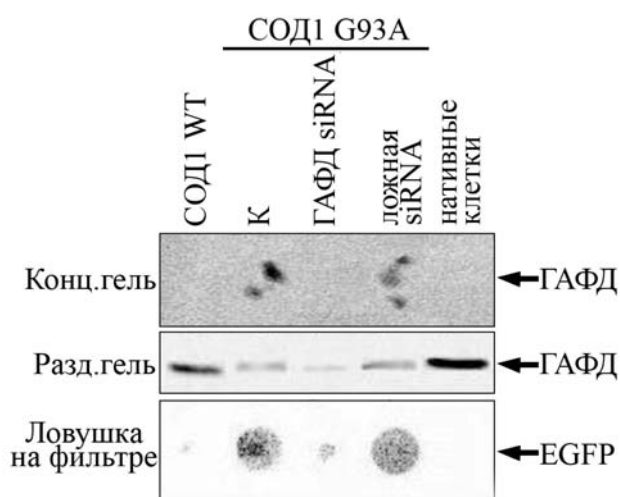


Рис. 2. Подавление экспрессии ГАФД при помощи малых интерферирующих РНК в клетках SK-N-SH, трансфицированных СОД1G93A-EGFP, приводит к подавлению агрегации мутантной супероксиддисмутазы (К – клетки с нормальным уровнем экспрессии ГАФД, ложная siRNA – клетки, обработанные неспецифической РНК, ГАФД siRNA – клетки, обработанные siRNA против ГАФД).

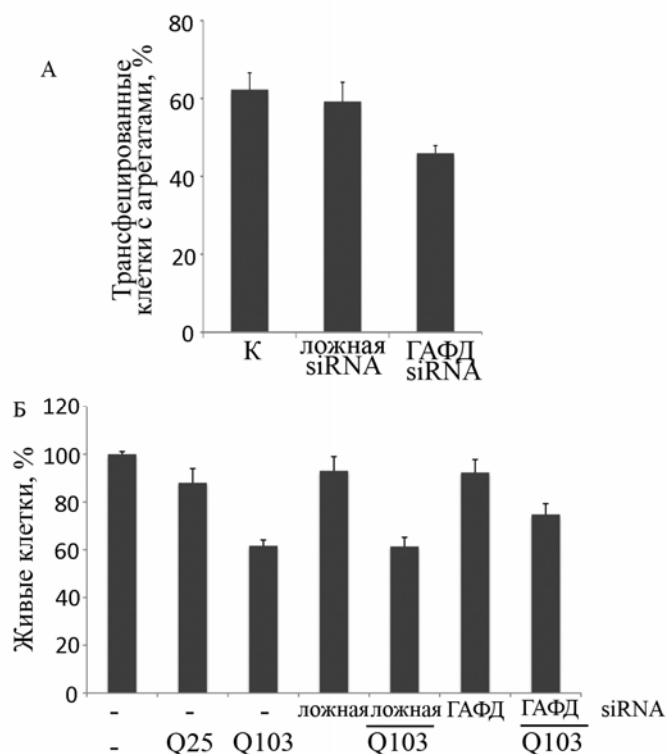
(рис. 2, верхняя и средняя панели). Результаты,

полученные с помощью метода ловушки на фильтре (рис. 2, нижняя панель), также говорят о том, что нокдаун ГАФД приводит к существенному подавлению процесса агрегации мутантного СОД1 (почти в 10 раз) (Лазарев и др., 2013).

Подавление экспрессии ГАФД вызывает задержку процесса агрегации и снижение цитотоксичности в модели БХ.

Для подтверждения проагрегатной активности ГАФД потребовалось привлечение клеточной модели БХ. Кроме того, мы проверили влияние изменений клеточной концентрации ГАФД на выживаемость клеток с растущими агрегатами Q103. Клетки нейробластомы человека SK-N-SH трансфицировали малыми интерферирующими РНК (см. Материалы и методы), после чего инициировали процесс агрегации с помощью трансфекции Q103-EGFP (Q25-EGFP). Через 24 ч после

трансфекции считали количество клеток с диффузно распределенным Q103-EGFP и количество клеток с агрегатами, вычисляли процентное соотношение последних относительно экспрессирующих Q103 клеток. Оказалось, что подавление ГАФД приводит к уменьшению этого соотношения на четверть (рис. 3А), что свидетельствует о замедлении скорости формирования агрегатов в клеточной культуре в условиях недостатка ГАФД. Выживаемость клеток всех указанных групп была определена с помощью



метода Моссмана. Установлено, что блокирование синтеза ГАФД увеличивало выживаемость клеток, экспрессирующих патогенный белок (Q103), на 30 % по сравнению с клетками с нормальным уровнем синтеза ГАФД (рис. 3Б) (Лазарев и др., 2013).

Рис. 3. (А) Отношение клеток, в которых образовались агрегаты, к общему числу трансфицированных клеток при различном уровне экспрессии ГАФД (К – клетки с нормальным уровнем экспрессии ГАФД, ложная siRNA – клетки, обработанные неспецифической РНК, ГАФД siRNA – клетки, обработанные siRNA против ГАФД). (Б) Доля выживших клеток, производящих патогенный пептид (Q103) относительно интактной культуры (крайний левый столбик) на фоне различного уровня экспрессии ГАФД.

Роль транслугаминазы в формировании связей между ГАФД и белками-виновниками патогенеза БХ и АБС.

Агрегаты мутантного хантингина, атаксина и некоторых других патогенных белков могут формироваться за счет сшивания аномально длинных полиглутаминовых цепей с белками-донорами реактивных лизинов в процессе, катализируемом тТГ. Роль одного из таких доноров в патогенезе БХ отводят ферменту ГАФД (Ortu et al., 2002). С целью подтвердить участие тТГ в образовании агрегатов мы ввели очищенный фермент в экстракт из клеток, трансфицированных конструкцией Q103-EGFP, до того как началось формирование агрегатов. Как показывают данные, полученные с применением метода ловушки на фильтре, добавление тТГ дозо-зависимым образом увеличивает количество нерастворимого в ДСН и остающегося на мембране Q103-EGFP (рис. 4А). Мы предположили, что участие тТГ в формировании агрегатов может быть универсальным механизмом, свойственным многим нейродегенеративным патологиям. Для подтверждения этой гипотезы мы проверили, насколько

подавление активности тТГ отразится на процессе образования агрегатов мутантной супероксиддисмутазы в культуре клеток. Мы применили известный ингибитор фермента, цистамин, и инкубировали с ним клетки SK-N-SH, начиная с момента запуска процесса агрегации, то есть через 5 ч после трансфекции геном СОД1G93А-EGFP. Результаты анализа полученных агрегатов наглядно показывают, что подавление активности тТГ значительно препятствует агрегации – количество агрегированной СОД1G93А-EGFP уменьшилось почти в 3 раза (рис. 4Б) (Лазарев и др., 2013).

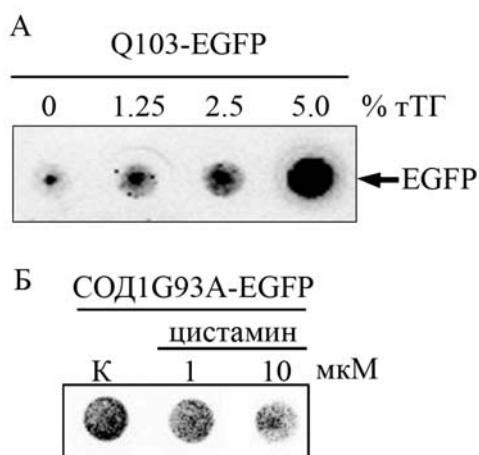


Рис. 4. (А) Добавление тТГ в клеточный экстракт с растущими агрегатами (от 1.25 до 5.0 % от общего количества белка в растворе) приводит к градуальному увеличению количества нерастворимого в ДСН полиглутамина. (Б) Обработка клеток, экспрессирующих СОД1G93А-EGFP, ингибитором тТГ цистамином в концентрации 1 либо 10 мкМ приводит к уменьшению количества агрегированной мутантной супероксиддисмутазы (К – клетки, не обработанные цистамином).

Разработка основанной на очищенных белках тест-системы для скрининга препаратов, на предмет их антиагрегатной активности.

Полученные нами данные говорят о том, что в формировании агрегатов при БХ ГАФД играет значительную роль, причем в процессе образовании начального комплекса ГАФД-полиглутамин участвует тТГ. На основании этих результатов была разработана новая тест-система для скрининга соединений, подавляющих рост агрегатов белков с аномально длинными глутаминовыми повторами. В качестве основного фактора, являющегося субстратом для агрегации, мы использовали часть рекомбинантного хантингина, содержащую последовательность в 58 глутаминов (патогенная форма) либо 23 глутамина (контроль), слитых с глутатион-S-трансферазой. В инкубационную среду, содержащую патогенный белок, добавляли ГАФД и тТГ, формируя таким образом смесь, имеющую, исходя из наших новых данных, все необходимые для агрегации компоненты. Процесс комплексообразования инициировали внесением в систему тромбина (разрезает сшивку между Q58/Q23 и GST). Далее раствор инкубировали в течение 48 ч и затем анализировали при помощи метода ловушки на фильтре (рис. 5А). Очевидно, что добавление ГАФД приводит к значительному увеличению количества полиглутаминовых агрегатов (примерно в 10 раз) (рис. 5А, верхняя панель). Введение в систему, содержащую ГАФД и Q58, тТГ повышало уровень агрегации комплекса полиглутамин-ГАФД

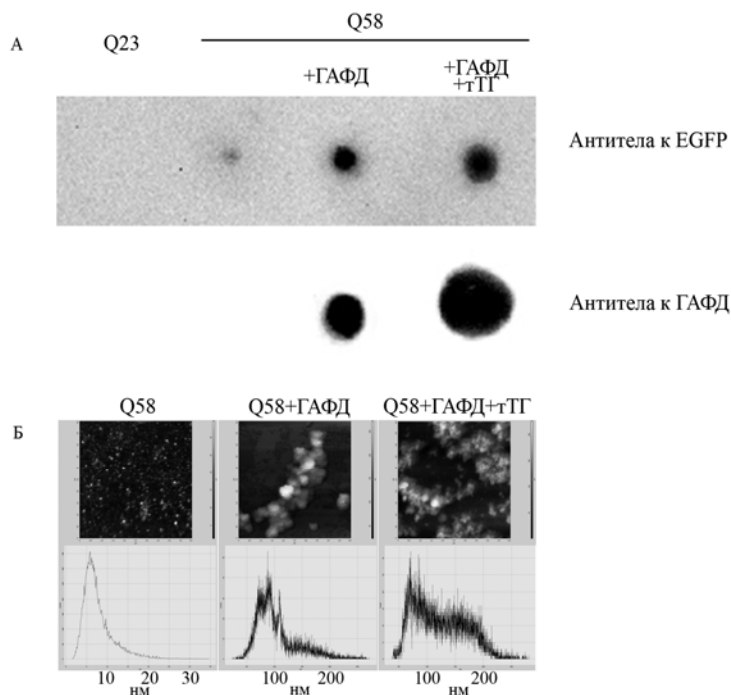


Рис. 5. (А) Добавление в раствор с образующимися из полиглутамина агрегатами ГАФД приводит к увеличению количества Q58, сформировавшего крупные нерастворимые в ДСН комплексы (верхняя панель), причем сама ГАФД также обнаруживается в нерастворимых конгломератах (нижняя панель). Участие тТГ усугубляет этот процесс – количество нерастворимого Q58 и ГАФД увеличивается. (Б) Результаты, полученные при помощи метода ловушки на фильтре, контролировали с использованием атомно-силовой микроскопии. На нижней панели показано распределение количества проанализированных точек в зависимости от их высоты относительно подложки (в нм).

приблизительно в 10 раз. Для анализа агрегирующих белковых комплексов использовали также метод атомно-силовой микроскопии (рис. 5Б, верхняя панель). Установлено, что введение в смесь ГАФД и тТГ приводило к формированию более крупных глобулоподобных агрегатов. Распределение количества проанализированных точек по высоте над фоном также демонстрирует примерно десятикратное увеличение размеров конечных агрегатов.

Пробный скрининг низкомолекулярных факторов с использованием новой тест-системы.

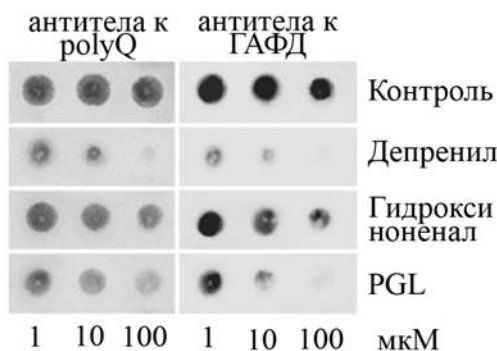


Рис. 6. Результаты анализа агрегатов (при помощи метода ловушки на фильтре), сформировавшихся в присутствии различных низкомолекулярных факторов на базе трех компонентов – Q58, ГАФД, тТГ. Эти вещества использовались в трех концентрациях: 1, 10 и 100 мкМ. В качестве контроля – растворитель – ДМСО.

Используя описанную в предыдущем разделе тест-систему, мы проверили имеющиеся в нашем распоряжении низкомолекулярные факторы, по литературным данным связывающие ГАФД, на наличие у них антиагрегатной активности. Обнаружено, что вещества депренил, гидроксиноненал, PGL и ловастатин влияют на количество агрегирующих белковых комплексов дозо-зависимым образом (рис.

6). Наиболее эффективными антиагрегатными соединениями являются депренил и PGL, которые в концентрации 10 мкм снижали количество полиглутаминовых агрегатов не менее чем в 100 раз.

БТШ70 предотвращает агрегацию в модели БХ, связывая и ГАФД, и полиглутамин.

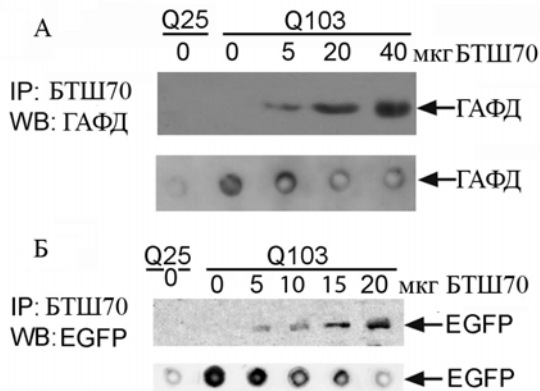


Рис. 7. (А, Б) верхние панели – результат анализа комплексов БТШ70 (БТШ70 добавляли в систему в количестве от 5и до 40 мкг) с белками, формирующими агрегаты в клеточном экстракте. (А, Б) нижние панели – результат анализа состава агрегатов, сформировавшихся в клеточном экстракте, после иммунопреципитации БТШ70. В обоих случаях БТШ70 сначала вводили в систему, а затем удаляли (в комплексе со связавшимися с ним белками) при помощи специфических антител. IP – иммунопреципитация, WB – вестерн блоттинг.

Известно, что при многих патологиях, сопровождающихся накоплением в клетке белковых комплексов на основе мутантных белков, особое значение имеют шапероны. Поэтому нашей задачей было выяснить, какова функция шаперона БТШ70 в формировании комплекса ГАФД-полиглутамин. С этой целью мы добавили известное количество очищенного человеческого рекомбинантного БТШ70 в экстракт, приготовленный из клеток, экспрессирующих Q103-EGFP (либо Q25-EGFP). При помощи специфических антител из экстракта извлекали БТШ70 вместе со связанными с ним белками. Полученные комплексы анализировали с помощью электрофореза и иммуноблотинга. Количество агрегатов, сформировавшихся в экстрактах после удаления БТШ70, анализировали с помощью метода ловушки на фильтре.

Результаты иммуноблотинга показывают, что удаление БТШ70 из экстракта приводило к дозозависимому понижению концентрации ГАФД в экстракте и, как следствие, уменьшению его количества в полиглутаминовых агрегатах (рис. 7А). Влияние БТШ70 на подавление агрегации Q103-EGFP исследовали аналогичным образом, но мембраны с белками инкубировали с антителами к EGFP. Мы обнаружили, что шаперон связывается с длинными полиглутаминовыми последовательностями, а количество Q103-EGFP, задержавшегося на фильтре уменьшается (рис. 7Б). Такие данные свидетельствуют о том, что шаперон БТШ70 связывает два компонента агрегатов мутантного хантингина – Q103-EGFP и ГАФД – что приводит к значительному уменьшению количества ДСН-нерастворимого материала (Guzhova, Lazarev et al., 2011).

Лекарственное прекондиционирование активирует шаперонный аппарат клетки.

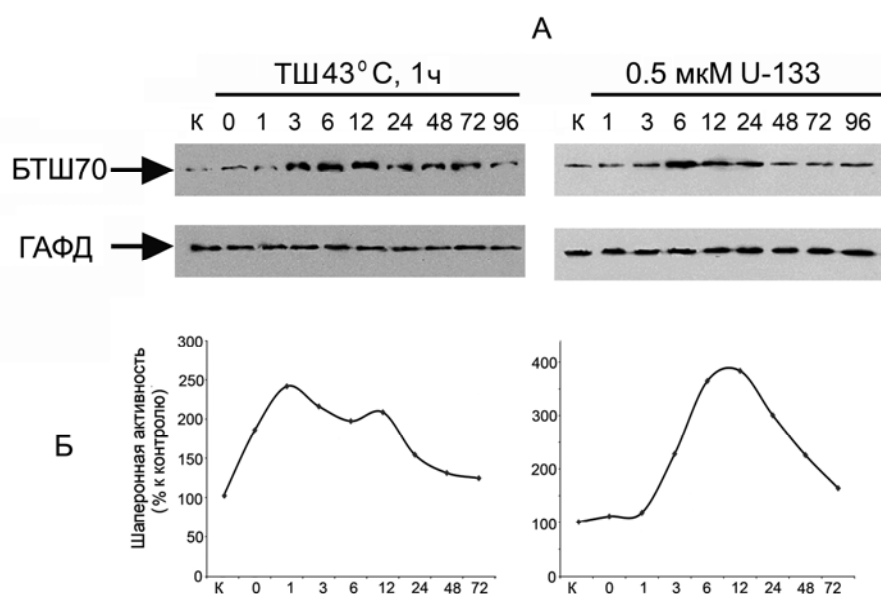


Рис. 8. Изменение количества (А) БТШ70 и его активности (Б) в клетках лейкемии человека U-937 после действия теплового шока (ТШ) (левые панели) и препарата U-133 в концентрации 0.5 мкМ (правые панели). Спустя указанное время (от 0 до 96 часов) клетки лизировали и готовили пробы для иммуноблоттинга (А) либо для ИФА (Б). К – интактные клетки.

Для анализа эффективности лекарственных средств, индуцирующих шаперон БТШ70 и способных замедлить формирование белковых агрегатов, была разработана тест-система Шап-ИФА. В основу этой системы положено свойство БТШ70 узнавать модельный денатурированный белок, КМЛА. При этом, для контроля за количественным содержанием белка в клетке использовали иммуноблоттинг. Для апробации этого теста использовали вещество – производное эхинохрома (трисацетилглюкозид) U-133. Препарат инкубировали с культурой клеток миелоидной лейкемии человека U-937 определенное время, затем клетки лизировали, а полученные экстракты анализировали с помощью Шап-ИФА и иммуноблоттинга, который использовали для измерения общего содержания БТШ70 в клетке. В качестве положительного контроля использовали тепловой шок. Увеличение интенсивности зоны БТШ70 на иммуноблоте свидетельствует о том, что обработка препаратом U-133 так же, как и тепловой шок, приводит к увеличению содержания БТШ70 почти в 8 раз (рис. 8А) и его шаперонной активности почти в 4 раза (рис. 8Б). Повышенное содержание белка сохраняется в клетках в течение приблизительно 18 ч. К этому же выводу можно прийти при анализе данных, полученных с помощью Шап-ИФА. Субстрат-связывающая активность БТШ70 возрастает после тепловой обработки и лекарственного прекондиционирования клеток. Однако временная динамика этого параметра несколько отличается от динамики внутриклеточного содержания БТШ70. Основным результатом проделанной работы можно считать успешную апробацию комплекса тестов для скрининга веществ, нацеленных на стимуляцию шаперонного аппарата клетки и, соответственно, противодействие формированию белковых агрегатов (Лазарев и др., 2011).

ОБСУЖДЕНИЕ

Процесс агрегации мутантных белков, ведущий к гибели клеток мозга в патогенезе многих нейродегенеративных заболеваний, вовлекает нормальные клеточные белки. Функции этих белков изменяются, и сами они могут также становиться патогенными. Основным результатом представляемой работы является установление вклада одного из таких белков – ГАФД – в патогенезе БХ и АБС.

Используя преимущества бесклеточной модели БХ, мы варьировали количество ГАФД в экстракте и показали, что количество агрегированного материала находится в прямой зависимости от концентрации ГАФД, то есть фермент может не только колокализироваться с патогенным белком в агрегатах, но и влиять на процесс их формирования (рис. 1). В то же время специфическое подавление экспрессии ГАФД малыми РНК приводило к снижению темпов агрегации мутантного хантингтина. Таким образом, было впервые показано, что фермент ГАФД является одним из факторов, определяющих патогенность в процессе БХ. Этот вывод подтверждается результатами, полученными при анализе жизнеспособности клеток, экспрессирующих Q103: снижение уровня ГАФД в них вызывало увеличение доли выживающих клеток (рис. 3).

Важные данные получены при анализе функции фермента в модели другого заболевания – АБС, патогенез которого определяется накоплением агрегатов мутантной СОД1. Установлено, что степень агрегации этого белка снижается при трансфекции клеток малой РНК против ГАФД (рис. 2). Поскольку ранее фермент был обнаружен в агрегатах, типичных для АБС (Pierce et al., 2008), можно предположить, что ГАФД является универсальным патогенным агентом, чья способность к формированию агрегатов обнаруживается лишь после появления в клетке мутантных белков. Это предположение подкрепляется данными Налетовой с соавторами (Naletova et al., 2008), показавших существование комплекса фермента с амилоидным белком в модели болезни Альцгеймера.

Значительный раздел работ посвящен разработке тест-системы для скрининга соединений, препятствующих агрегации мутантного хантингтина. Полученные нами результаты побудили нас ввести в эту систему кроме мутантного хантингтина ферменты ГАФД и тТГ. Эта система построена на основании обсуждаемых данных и, с нашей точки зрения, является много более информативной, чем тесты, используемые в массовых скринингах фармакопрепаратов, направленных на терапию полиглутаминовых заболеваний (Wang et al., 2005). Релевантность новой модели продемонстрировал пробный скрининг отобранных на основании литературных данных соединений; по его результатам стало возможным отобрать несколько веществ, связывающих фермент и, как следствие, предотвращающих агрегацию аномально длинных цепей глутамина (рис. 6).

Помимо экзогенных факторов, которые могут повлиять на образование агрегатов, внутри клетки имеются собственные системы, могущие частично помешать формированию белковых конгломератов.

Одной из таких систем являются молекулярные шапероны (Muchowski, Wacker, 2005). Значение молекулярных шаперонов, в особенности БТШ70, в предотвращении формирования агрегатов патогенных или поврежденных белков общеизвестно, однако механизмы этого эффекта до сих пор остаются невыясненными. В соответствии с нашими результатами БТШ70, оказавшись в среде с растущими агрегатами, связывается не только с их главным компонентом – мутантным хантингтином, но и с ГАФД, предотвращая таким образом взаимодействие между двумя основными участниками патогенного процесса (рис. 7). Насколько известно, такой результат получен впервые, и целью заключительного этапа исследований стала разработка тест-системы для анализа соединений, способных увеличить шаперонную активность или количество БТШ70. В подобную разработку мы ввели принцип узнавания шапероном денатурированного белка. С помощью этой тест-системы нам удалось продемонстрировать тождественность эффектов теплового и лекарственного прекондиционирования на индукцию шаперона в клетках человека (рис. 8). Таким образом, нам удалось сформировать две тест-системы для скрининга веществ, способных препятствовать процессу сборки патогенных комплексов мутантный хантингтин-ГАФД.

ВЫВОДЫ

1. ГАФД связывается с мутантными хантингтином и СОД1 и многократно увеличивает степень агрегации этих белков в моделях болезни Хантингтона и амиотрофического бокового склероза.
2. Фермент тканевая транскламиназа выполняет роль катализатора взаимодействия ГАФД и мутантных белков при БХ и АБС.
3. Создана тест-система из очищенных белков для анализа роста агрегатов на основе мутантного хантингтина. Тест-система пригодна для высокопроизводительного скрининга лекарственных факторов на предмет их антиагрегатной активности.
4. Вещества, связывающие ГАФД, подавляют образование комплекса фермента с мутантными белками и их агрегацию в моделях БХ и АБС.
5. Шаперон БТШ70 предотвращает образование агрегатов на основе длинных повторов глутамина за счет связывания мутантного хантингтина и благодаря удалению ГАФД из комплекса с последним.
6. Разработана тест-система, позволяющая определить шаперонную активность и количество БТШ70 в клетке.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ.

Лазарев В.Ф., Казначеева А.В. 2010. Агрегация на основе глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы: формирование модели *in vitro* патогенных процессов. Тринадцатая Всероссийская медико-биологическая конференция молодых исследователей «Человек и его здоровье. Фундаментальная наука и клиническая медицина». Санкт-Петербург. С. 108-109.

Лазарев В.Ф., Казначеева А.В., Гужова И.В., Маргулис Б.А. 2011. Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа – потенциальная мишень при терапии хореи Гентингтона. XXIII Международная зимняя молодежная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии». 7-10 февраля. Москва. С. 47.

Лазарев В.Ф., Онохин К.В., Антимонова О.И., Полоник С.Г., Гужова И.В., Маргулис Б.А. 2011. Кинетика изменения шаперонной активности белков Hsp70 и Hdj1 в клетках миелоидной лейкемии человека U-937 после теплового и лекарственного прекондиционирования. Биохимия. 5(76). С. 724-730

Guzhova I.V., **Lazarev V.F.**, Kaznacheeva A.V., Ippolitova M.V., Muronetz V.I., Kinev A.V., Margulis B.A. 2011. Novel mechanism of Hsp70 chaperone-mediated prevention of polyglutamine aggregates in a cellular model of Huntington disease. Hum Mol Genet. 20(20). P. 3953-3963.

Lazarev V.F., Kaznacheeva A.V., Kinev A.V., Guzhova I.V., Margulis B.A. 2011. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and heat shock protein 70 are putative drug target for the therapy polyglutamine-related pathologies. IX European Symposium of The Protein Society. «Wonders and Disasters of the Protein World». May 22-26, Stockholm, Sweden. P. 65.

Лазарев В.Ф., Казначеева А.В., Онохин К.В., Маргулис Б.А., Гужова И.В. 2011. Научная конференция по биоорганической химии и биотехнологии «X чтения памяти академика Ю. А. Овчинникова». 14-17 ноября. Москва – Пушкино. С. 37.

Лазарев В., Гужова И., Маргулис Б. 2012. Новая платформа для скрининга веществ, направленных на терапию полиглутаминовых патологий. Конференция молодых ученых. «Молекулярная и клеточная биология: прикладные аспекты». 13 апреля. Москва. P. 17.

Лазарев В.Ф., Сверчинский Д.В., Ипполитова М.В., Казначеева А.В., Гужова И.В., Маргулис Б.А. 2013. Условия агрегации мутантных белков в клеточных моделях болезни Хантингтона и амиотрофического бокового склероза. Acta Naturae. 2(17): 34-43.

СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.

- Лазарев В.Ф.**, Онохин К.В., Антимонова О.И., Полоник С.Г., Гужова И.В., Маргулис Б.А. 2011. Кинетика изменения шаперонной активности белков Hsp70 и Hdj1 в клетках миелоидной лейкемии человека U-937 после теплового и лекарственного прекондиционирования. *Биохимия*. 5(76). С. 724-730.
- Еременко Е.М., Антимонова О.И., Шекалова О.Г., Полоник С.Г., Маргулис Б.А., Гужова И.В. 2010. Новые соединения, повышающие экспрессию шаперона Hsp70, и их биологическая активность. *Цитология* 52. С. 235–241.
- Лазарев В.Ф.**, Сверчинский Д.В., Ипполитова М.В., Казначеева А.В., Гужова И.В., Маргулис Б.А. 2013. Условия агрегации мутантных белков в клеточных моделях болезни хантингтона и амиотрофического бокового склероза. *Acta Naturae*. 2(17). С. 34-43.
- Bradford M. A. 1976. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem*. 72. P. 248-254.
- Cooper A.J., Sheu K.R., Burke J.R., Onodera O., Strittmatter W.J., Roses A.D., Blass J.P. 1997. Polyglutamine domains are substrates of tissue transglutaminase: does transglutaminase play a role in expanded CAG/poly-Q neurodegenerative diseases? *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94(23). P. 12604-12609.
- Guzhova I.V., **Lazarev V.F.**, Kaznacheeva A.V., Ippolitova M.V., Muronetz V.I., Kinev A.V., Margulis B.A. 2011. Novel mechanism of Hsp70 chaperone-mediated prevention of polyglutamine aggregates in a cellular model of huntington disease. *Hum Mol Genet*. 20(20). P. 3953-3963.
- Kobayashi Y., Kume A., Li M., Doyu M., Hata M., Ohtsuka K., Sobue G. 2000. Chaperones Hsp70 and Hsp40 suppress aggregate formation and apoptosis in cultured neuronal cells expressing truncated androgen receptor protein with expanded polyglutamine tract. *J Biol Chem*. 275(12). P. 8772-8778.
- Laemmli U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of bacteriophage T4. *Nature* 227. P. 680-685.
- Margulis B., Kinev A., Guzhova I. 2006. Chaperones in neurodegenerative pathologies: Therapeutic prospects. «Heat Shock Proteins in Biology and Medicine» Kerala, India: Research Signpost. P. 305-329.
- Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* 65(1-2). P. 55–63.
- Muchowski P.J., Wacker J.L. 2005. Modulation of neurodegeneration by molecular chaperones. *Nature reviews* 6. P. 11-22.
- Naletova I., Schmalhausen E., Kharitonov A., Katrukha A., Saso L., Caprioli A., Muronetz V. 2008. Non-native glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase can be an intrinsic component of amyloid structures. *Biochim Biophys Acta*. 1784(12). P. 2052-2058.

Novoselova T.V., Margulis B.A., Novoselov S.S., Sapozhnikov A.M., van der Spuy J., Cheetham M.E., Guzhova I.V. 2005 Treatment with extracellular HSP70/HSC70 protein can reduce polyglutamine toxicity and aggregation. *J Neurochem.* 94(3). P. 597-606.

Orru S., Ruoppolo M., Francese S., Vitagliano L., Marino G., Esposito C. 2002. Identification of tissue transglutaminase-reactive lysine residues in glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Protein Sci.* 2002 11. P. 137-146.

Perutz M.F., Johnson T., Suzuki M., Finch J.T. 1994. Glutamine repeats as polar zippers: their possible role in inherited neurodegenerative diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91(12). P. 5355-5358.

Pierce A., Mirzaei H., Muller F., De Waal E., Taylor A.B., Leonard S., Van Remmen H., Regnier F., Richardson A., Chaudhuri A.J. 2008. GAPDH is conformationally and functionally altered in association with oxidative stress in mouse models of amyotrophic lateral sclerosis. *Mol Biol.* 382(5). P. 1195-1210.

Rosen D. R., Siddique T., Patterson D., Figlewicz D.A., Sapp P., Hentati A., Donaldson D., Goto J., O'Regan J.P., Deng H.X. 1993. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 362. P. 59-62.

Sirover M.A. 2011. On the functional diversity of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: biochemical mechanisms and regulatory control// *Biochim. Biophys. Acta.* 1810. P. 741-751.

Tsuchiya K., Tajima H., Kuwae T., Takeshima T., Nakano T., Tanaka M., Sunaga K., Fukuhara Y., Nakashima K., Ohama E. Mochizuki H, Mizuno Y, Katsube N, Ishitani R. 2005. Pro-apoptotic protein glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase promotes the formation of Lewy body-like inclusions. *Eur J Neurosci.* 21(2). P. 317-326.

Valentine J. S., Hart P. J. 2003. Misfolded CuZnSOD and amyotrophic lateral sclerosis. *PNAS* 100(7). P. 3617–3622.

Wang J., Gines S., MacDonald M.E., Gusella J.F. 2005. Reversal of a full-length mutant huntingtin neuronal cell phenotype by chemical inhibitors of polyglutamine-mediated aggregation. *BMC Neurosci.* 6.

Wu J., Lin F., Qin Z. 2007. Sequestration of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase to aggregates formed by mutant huntingtin. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 39(11). P. 885-890.

Подписано в печать 26.04.2013 Формат 60x90/16
Бумага офсетная. Усл. печ. л. 1,75
Тираж 100 экз. Заказ 209

Отпечатано в типографии «Адмирал»
199178, Санкт-Петербург, В.О., 7-я линия, д. 84 А