

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДОВ
ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ МИКРОСКОПИИ
ДЛЯ АНАЛИЗА ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ПЕПТИДА A β
И PRION PROTEIN В ДРОЖЖАХ
SACCHAROMYCES CEREVISIAE¹**

В.В. Коржова, К.С. Антоненц, А.П. Галкин, А.Ф. Сайфитдинова, А.А. Рубель

Рассматриваются нарушения укладки белков, ведущие к патогенезу при амилоидных заболеваниях, и их возможное взаимное влияние в развитии болезни Альцгеймера и прионных заболеваний. Описывается экспериментальная система, позволяющая исследовать непосредственное взаимодействие пептида A β и Prion Protein.

**USING OF FLUORESCENCE MICROSCOPY METHODS
FOR ANALYSIS OF THE INTERACTION BETWEEN A β PEPTIDE
AND PRION PROTEIN IN YEAST
SACCHAROMYCES CEREVISIAE**

V.V. Korzhova, K.S. Antonec, A.P. Galkin, A.F. Saifitdinova, A.A. Rubel

The present research considers protein misfolding leading to pathogenesis in amyloidoses and their possible influence on each other in Alzheimer and prion diseases. The experimental system that allows to investigate the direct interactions between A β peptide and Prion Protein is described.

Более 20 болезней человека связаны с аномальной укладкой и агрегацией белков, в норме являющихся растворимыми. Такие заболевания называют «болезнями неправильной укладки» (protein misfolding diseases – PMDs) или амилоидозами. Амилоидозы делятся на инфекционные и неинфекционные. Наиболее известными неинфекционными амилоидозами человека являются болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, хоряя Хантингтона, диабет второго типа. К наиболее известным инфекционным амилоидозам, которые также называются прионными заболеваниями, относятся Куру, болезнь Кройцфельда – Якоба у человека и заболевания других млекопитающих – губчатая энцефалопатия крупного рогатого скота («коровье бешенство»), скрэпи овец и др. [1]. Все эти заболевания в настоящее время являются неизлечимыми.

Наиболее распространенным из амилоидных заболеваний является болезнь Альцгеймера, в настоящее время ею страдает каждый третий человек в возрасте старше 85 лет. Это заболевание связано с образованием агрегатов пептида амилоид-бета (A β), который образуется в результате разрезания трансмембранного белка APP (Amyloid Precursor Protein) [2]. В последние годы накапливается все больше данных в пользу того, что именно межклеточное накопление этих агрегатов ведет к нарушениям, вызывающим дисфункцию нейронов [3].

¹ Работа выполнена при поддержке ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 гг., Госконтракт П-2619.

Все прионные заболевания связаны с накоплением в тканях головного мозга высокомолекулярных агрегатов белка, получившего название PrP (от Prion Protein). Инфекционным агентом является олигомерная изоформа в норме мономерного PrP^C (от cellular) – PrP^{Sc} (от scrapie), устойчивая к воздействию температуры, химических агентов и протеолитических ферментов. Такая аномальная конформация белка обеспечивает передачу заболевания за счет автокаталитической конверсии вновь синтезируемых молекул с использованием олигомерной формы как матрицы [4].

Кроме достаточно давно показанной взаимосвязи [5–7] болезни Альцгеймера и прионных заболеваний, интересной особенностью пептида A β и белка PrP является их способность к взаимодействию: белок PrP в растворимой изоформе специфично связывает олигомеры амилоида-бета, т.е. является его рецептором, и, таким образом, способен влиять на проявление болезни [8]. Недавние исследования также показали, что процессы, связанные с неправильной укладкой одного из этих белков, являются серьезным фактором риска для аналогичных процессов и агрегации другого [9]. Поэтому интересным представляется изучение возможности взаимодействия и взаимного влияния агрегатов PrP и амилоида-бета.

Большое количество работ убедительно доказывает, что дрожжи представляют собой адекватную модель для исследования амилоидных белков млекопитающих [10].

Важной особенностью использования дрожжевых моделей является возможность визуализировать агрегацию белков с помощью создания химерных конструкций, в которых изучаемый белок слит с репортерной последовательностью, например с флуоресцирующими белками, широко используемыми сейчас в молекулярно-биологических исследованиях [11]. Целью нашей работы является анализ взаимодействия белка PrP и пептида амилоида-бета в дрожжах *Saccharomyces cerevisiae*.

К настоящему моменту мы получили дрожжевые штаммы, продуцирующие мышинный белок PrP или пептид A β , слитые с разными флуоресцирующими белками, – GFP, CFP и YFP.

Методом флуоресцентной микроскопии мы показали, что продукция белков A β -GFP и PrP-GFP приводит к формированию в дрожжевых клетках флуоресцирующих агрегатов, которые имеют цитоплазматическую локализацию и не колокализуются с клеточными компартментами. Продукция белка с плазмиды, содержащей только ген GFP, не ведет к образованию агрегатов. Мы также провели биохимический анализ белков PrP-GFP и A β -GFP. Белковые экстракты, выделенные из дрожжевых клеток, были разделены методом дифференциального центрифугирования на осадочную (нерастворимую) и надосадочную фракции. Результаты Вестерн-блот гибридации показали, что большая часть белков PrP-GFP и A β -GFP представлена в осадочной фракции, тогда как в контроле, содержащем GFP, сигнал детектировался только в растворимой фракции. Это свидетельствует о том, что белки PrP-GFP и A β -GFP формируют в дрожжах крупные агрегаты. Анализ устойчивости агрегатов PrP-GFP и A β -GFP к действию протеиназы К свидетельствует, что они устойчивы к ее действию даже в концентрации протеиназы 40 мкг/мл, тогда как GFP является чувствительным к действию протеиназы К уже при низких концентрациях. Сходной устойчивостью к протеиназе К обладают агрегаты амилоидных белков из мозга больных млекопитающих. Кроме того, с помощью метода полуденатурирующего электрофореза в агарозном геле и Вестерн-блот гибридации мы показали, что агрегаты PrP-GFP и A β -GFP состоят из высокомолекулярных полимеров, устойчивых к действию 2 % SDS.

Таким образом, биохимический анализ подтверждает, что химерные белки PrP-GFP и A β -GFP формируют в дрожжевых клетках агрегаты, проявляющие свойства амилоидных белков, сходные с агрегатами из мозга больных млекопитающих.

В дальнейшей работе планируется исследование возможности взаимодействия гибридных белков A β и PrP методом FRET с использованием штаммов дрожжей, продуцирующих эти белки, слитые с флуоресцентными – CFP и YFP.

Метод FRET (fluorescence resonance energy transfer, или Förster resonance energy transfer) позволяет изучать взаимодействие белков *in vivo*. FRET – это физическое явление, обусловленное передачей энергии между двумя хромофорами с помощью с безызлучательного диполь-дипольного спаривания. Для этого получают конструкции, в которых изучаемые белки слиты с донором, а другой с акцептором, в качестве которых выступают флуоресцирующие белки. При использовании CFP и YFP, CFP является акцептором, а YFP – донором, т.к. пик эмиссии YFP совпадает с пиком поглощения CFP. Если исследуемые белки тесно взаимодействуют, происходит достаточно эффективная передача энергии. Эффективность передачи и, соответственно, степень взаимодействия белков может быть оценена через скорость фотовыгорания акцептора в присутствии и в отсутствие донора или по увеличению интенсивности флуоресценции акцептора [12–14].

Результаты проведенных исследований помогут не только изучить возможные взаимодействия агрегатов белков A β и PrP, но и оценить возможность их влияния на агрегацию друг друга в живых клетках, а также патогенез вызываемых ими заболеваний. Полученные данные в свою очередь расширят возможности для развития терапевтических подходов.

Литература

1. Soto C. Protein misfolding and disease; protein refolding and therapy // FEBS Lett. 2001. Vol. 498. P. 204–207.
2. Morishima-Kawashima M., Inara Y. Alzheimer's disease: β -amyloid protein and tau // J. of Neuroscience Research. 2002. Vol. 70. P. 392–401.
3. Bayer T., Wirths O.P. Intracellular accumulation of amyloid-beta – a predictor for synaptic dysfunction and neuron loss in Alzheimer's disease // Frontiers in Aging Neuroscience. 2010. Vol. 2. P. 1–10.
4. Prusiner S.B. Early evidence that a protease-resistant protein is an active component of an infectious prion // Cell. 2004. Vol. 116. P. 109.
5. Leuba G., Saini K., Savioz A., Charnay Y. Early-onset familial Alzheimer disease with co-existing beta-amyloid and prion pathology // JAMA. 2000. Vol. 283. P. 1689–1691.
6. Hainfellner J.A., Wanschitz J., Jellinger K. et al. Coexistence of Alzheimer-type neuropathology in Creutzfeldt-Jacob disease // Acta Neuropathol. 1988. Vol. 96. P. 116–122.
7. Parkin E.T., Watt N.T., Hussain I. et al. Cellular prion protein regulates β -secretase cleavage of the Alzheimer's amyloid precursor protein // PNAS. 2007. Vol. 104. P. 11062–11067.
8. Gunther E.C., Strittmatter S.M. β -amyloid oligomers and cellular prion protein in Alzheimer's disease // J. Mol Med. 2009. Vol. 88(4). P. 331–338.
9. Morales R., Estrada L.D., Diaz-Espinoza R. et al. Molecular cross talk between misfolded proteins in animal models of Alzheimer's and prion diseases // J. of Neuroscience Research. 2010. Vol. 30. P. 4528–4535.
10. Галкин А.П., Миронова Л.Н., Журавлева Г.А., Инге-Вечтомов С.Г. Прионы дрожжей, амилоидозы млекопитающих и проблема протеомных сетей // Генетика. 2006. Т. 42. С. 1–13.
11. Green L.E., Park Y., Masison D., Eisenberg E. Application of GFP-labeling to study prions in yeast // Protein Pept Lett. 2009. Vol. 16(6). P. 635–641.
12. You X., Nguyen A.W., Jabaiah A. et al. Intracellular protein interaction mapping with FRET hybrids // PNAS. 2006. Vol. 103. P. 18458–18463.
13. Raicu V., Jansma D.B., Miller R.J.D., Friesen J.D. Protein interaction quantified *in vivo* by spectrally resolved fluorescence resonance energy transfer // Biochem J. 2005. Vol. 385. P. 265–277.
14. Mallik S., Yang W., Norstrom E.M., Matrianni J.A. Live cell FRET predicts an altered molecular association of heterologous PrP^{Sc} with PrP^C // J. Biol. Chem. 2010. Vol. 285(12). P. 8967–8975.