

УДК 577.21

Условия агрегации мутантных белков в клеточных моделях болезни Хантингтона и амиотрофического бокового склероза

В. Ф. Лазарев*, Д. В. Сверчинский, М. В. Ипполитова, А. В. Казначеева, И. В. Гужова, Б. А. Маргулис

Институт цитологии РАН, 194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий просп., 4

*E-mail: vl.lazarev@gmail.com

Поступила в редакцию 29.09.2012

РЕФЕРАТ Большинство нейродегенеративных патологий связано с появлением цитотоксических олигомеров и агрегатов мутантных белков, вызывающих дисфункцию клеток мозга и их гибель. В представленной работе изучали функции белковых факторов, как способствующих образованию агрегатов, так и предотвращающих этот процесс. К таким белкам можно отнести глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназу (ГАФД), тканевую транслгутаминазу (тТГ) и молекулярный шаперон – белок теплового шока 70 (БТШ70). Используя технологию siРНК, мы показали, что подавление экспрессии ГАФД в модели болезни Хантингтона (БХ) вызывает снижение на 45–50% уровня агрегации мутантного хантингтина, содержащего повтор из 103 остатков глутамина, и повышение количества выживших клеток. Впервые установлено, что блокирование синтеза ГАФД снижает степень агрегации супероксиддисмутазы-1 (СОД1) с мутацией G93A в модели амиотрофического бокового склероза (АБС). Обработка клеток, имитирующих БХ и АБС, ингибитором активности ГАФД, гидроксинонналом (ГНЕ) также снижает количество агрегирующего материала. Агрегации мутантных белков способствует также тканевая транслгутаминаза. Подавление активности этого фермента с помощью цистамина препятствует образованию агрегатов мутантной СОД1 и хантингтина. Роль БТШ70 в контроле агрегации мутантного хантингтина изучали с использованием линии клеток с индуцибельной экспрессией шаперона. Увеличивая содержание БТШ70, мы добились снижения числа и размеров растущих агрегатов мутантного хантингтина. Таким образом, модуляция функции/количества трех белков (ГАФД, транслгутаминазы и БТШ70) влияет на патогенез таких распространенных нейродегенеративных заболеваний, как болезнь Хантингтона и амиотрофический боковой склероз.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА нейродегенеративные заболевания, глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназа, шапероны, мутантные белки, агрегация.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ EGFP – усиленный зеленый флуоресцентный белок (Enhanced Green Fluorescence Protein); АБС – амиотрофический боковой склероз; БТШ – белок теплового шока; БХ – болезнь Хантингтона; ГАФД – глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназа; ГНЕ – гидроксинонналом; ДСН – додецилсульфат натрия; ПААГ – полиакриламидный гель; СОД – супероксиддисмутаза; тТГ – тканевая транслгутаминаза; ФСБ – фосфатно-солевой буфер.

ВВЕДЕНИЕ

Причиной большинства нейродегенеративных заболеваний является прогрессирующая гибель нейронов в определенных отделах головного мозга. Развитие подобных патологий начинается с накопления внутри клетки (болезнь Паркинсона, Хантингтона) или вне ее (болезнь Альцгеймера) агрегатов мутантных белков или их олигомеров [1]. Такие структуры токсичны для клеток мозга, они могут приводить к немедленной гибели нейронов, хотя есть сведения о том, что они могут существовать в нейронах десятки лет

и лишь в определенный момент становятся активным токсическим фактором [2].

В настоящее время предложены две гипотезы формирования агрегатов мутантных белков. Согласно первой из них, агрегаты могут формироваться в результате образования водородных связей между β -слоями молекулы поврежденного или мутантного белка [3]. Подобные структуры недоступны для сильных диссоциирующих растворителей, в частности для додецилсульфата натрия (ДСН). По-видимому, высокая плотность агрегирующего материала не по-

зволяет клетке использовать протеолитические системы, протеасомы и фагосомы в борьбе с агрегатами [4]. Согласно второй гипотезе, амилоидные агрегаты могут образоваться за счет ковалентных сшивок между молекулами мутантного белка и другими клеточными белками. Формирование таких сшивок характерно для так называемых полиглутаминовых патологий, в основе которых лежат мутации, приводящие к появлению аномально длинных глутаминовых повторов в молекулах хантингтина, атаксинов разных типов, рецептора андрогенов [5–7]. Полиглутаминовые повторы могут вырезаться и в реакции, катализируемой тканевой трансклутаминазой (тТГ), образовывать ковалентные связи с донорами ϵ -аминогрупп лизинов. Гипотеза о ключевой роли тТГ в формировании нерастворимых агрегатов мутантного хантингтина подтверждается данными о том, что полиглутаминовые домены хантингтина являются активным субстратом для этого фермента, в отсутствие тТГ агрегация практически прекращается [8].

Донором лизинов в реакции, катализируемой тТГ, может служить гликолитический фермент глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназа (ГАФД) [9]. Недавно мы показали, что ГАФД действительно способна формировать агрегаты с мутантным хантингтином [10]. Данные о том, что ГАФД обнаруживается в агрегатах или отложениях других мутантных белков, например, амилоидного предшественника и α -синуклеина [11, 12], приводят к мысли о ГАФД как о некоем универсальном субстрате для процессов агрегации [13]. Одна из задач нашей работы состояла в том, чтобы понять, могут ли ГАФД, а также тТГ не только участвовать в агрегации мутантного хантингтина, но и играть роль в патогенезе совершенно иного заболевания – амиотрофического бокового склероза (АБС).

АБС – одно из наиболее распространенных нейродегенеративных заболеваний, при котором наблюдается дегенерация нейронов спинного мозга, ствола мозга и коры [14]. Приблизительно 10% случаев АБС являются наследственными, из них 20% обусловлены мутациями в гене супероксиддисмутазы-1 (СОД1). Мутации встречаются во всех экзонах гена *СОД1*, некоторые из них вызывают нарушения фолдинга и агрегацию белкового продукта. К таким мутациям относится замена глицина в положении 93 на аланин, G93A [15]. Таким образом, первая часть нашей работы посвящена анализу функций ГАФД и тТГ в клетках, имитирующих БХ и АБС.

Кроме белков, вовлеченных в образование цитотоксических олигомеров и агрегатов, в клетке имеются факторы, препятствующие этому процессу. К таким факторам в первую очередь относятся

молекулярные шапероны, особенно белки класса БТШ70 и кошапероны группы Hdj1/2 [16, 17]. Повышенная экспрессия генов этих факторов в клетке или в трансгенном организме приводит к торможению агрегации и снижению патогенных проявлений [18]. Предполагается, что на начальных этапах формирования агрегатов шаперон БТШ70 связывает их компоненты и поэтому тормозит процесс агрегации [10, 19, 20]. Во второй части нашей работы рассмотрены особенности функций БТШ70 в процессе агрегации мутантного хантингтина в клеточной модели БХ.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Клетки

Клетки нейробластомы человека SK-N-SH и SH-SY-5Y получены от Д. Рубинштейна (D. Rubinstein) из Университета Кембриджа (Великобритания); культура нейрональных эмбриональных клеток HNSC3148 – от Л.И. Корочкина (Институт биологии гена РАН, Москва). В работе также использовали клон линии SK-N-SH/hsp70, полученный ранее в лаборатории защитных механизмов клетки Института цитологии РАН с помощью трансфекции клеток плазмидой со вставкой гена *hsp70* под контролем металлотионеинового промотора [10, 21]. Клетки культивировали в среде ДМЕМ («Биолот», Санкт-Петербург) с добавлением *L*-глутамина, 10% фетальной сыворотки крупного рогатого скота и 50 мг/мл гентамицина («ПанЭко», Москва) при температуре 37°C в атмосфере 5% CO₂. Клетки SK-N-SH/hsp70 растили в присутствии 100 мкМ генецитина.

Трансфекция клеток

В работе использовали плазмиды, содержащие экзон 1 гена, кодирующего хантингтин с нормальным (Q25) и патогенным (Q103) числом остатков глутамина (далее гены Q25 и Q103 соответственно), сшитый с геном *EGFP*, кодирующим усиленный зеленый флуоресцентный белок (плазмиды предоставлены Д. Рубинштейном), и плазмиды, содержащие ген супероксиддисмутазы-1 дикого типа (СОД1_{wt}) и мутантного варианта СОД1_{G93A}, также сшитые с геном *EGFP* (получены от М. Читэм (M. Cheetham), Колледж Университета Лондона, Великобритания). Малая интерферирующая РНК (siРНК), специфичная к ГАФД, получена из Ambion (Ambion/Life Technology/Invitrogen, США).

Клетки высевали в лунки 24- или 6-луночного планшета за 24 ч до трансфекции в концентрации 3×10^5 кл./мл. Трансфекцию осуществляли с помощью реагента Lipofectamine-PLUS (Invitrogen, США) согласно рекомендациям производителя.

Клетки трансфицировали siРНК *GAPDH* за 1 сут до трансфекции генами *Q103* и *Q25* или одновременно с генами *СОД1_{G93A}* или *СОД1_{wt}*.

Конфокальная микроскопия

Клетки высевали на покровные стекла, помещенные в лунки 24-луночного планшета, в концентрации 3×10^5 кл./мл. Для определения колокализации ГАФД и тТГ с *Q103* клетки через 48 ч после трансфекции фиксировали 4% формальдегидом (Sigma, США) в фосфатно-солевом буфере (ФСБ) в течение 30 мин, промывали чистым ФСБ и пермеабелизовали с помощью холодного 96% этанола в течение 5 мин при температуре -20°C . Клетки инкубировали со специфическими антителами против ГАФД (Abcam, Великобритания) или тТГ (Sigma, США) в течение ночи, после промывок в ФСБ инкубировали с вторичными антителами, конъюгированными с флуоресцентной меткой CY3 (JacksonLab., США). Препараты исследовали с помощью конфокального микроскопа Leica TCS SL (Германия). Чтобы избежать неспецифической интерференции флуорохромов применяли последовательный режим сканирования. Размер агрегатов определяли с помощью конфокального микроскопа LSM510 Zeiss и программы Zeiss LSM Image Examiner, версия 2.80.1123 (Carl Zeiss, Германия).

Определение жизнеспособности клеток

Для проверки выживаемости клеток, синтезирующих патогенные пептиды на фоне подавленной экспрессии ГАФД, использовали метод оценки жизнеспособности по Мосману [22]. Клетки нейробластомы SK-N-SH помещали в лунки 96-луночного планшета, трансфицировали siРНК, а затем геном *Q103* как описано выше. Через 72 ч после начала эксперимента из лунок удаляли среду, в каждую лунку добавляли по 90 мкл свежей среды и 10 мкл раствора МТТ (бромид 3-4,5-диметилтиазол-2-ил-2,5-тетразолия, Sigma, США), 5 мг/мл, в стерильном ФСБ. Клетки инкубировали с МТТ в течение 4 ч при 37°C , после чего среду с МТТ удаляли, и в лунки вносили по 100 мкл закисленного изопропанола (0.04 н. HCl) для того, чтобы растворить синие кристаллы формазана в живых клетках. Сигнал измеряли на иммунохимическом анализаторе Флюорофот (ООО «ПРОБАНАУЧПРИБОР», Россия) при длине волны 570 и 630 нм.

Анализ агрегации белков

Агрегацию белков анализировали с использованием двух систем: *ex vivo* и *in vitro*. В системе *ex vivo* клетки нейробластомы SK-N-SH трансфицировали плазмидами, содержащими экзон 1 гена хантингтина с нормальным (*Q25*) и патогенным (*Q103*) числом остатков глутамина. По истечении 8 ч клет-

ки, когда в них уже накапливается достаточное для анализа количество мутантного белка, но еще не происходит образования агрегатов, лизировали в буфере следующего состава: 25 мМ Трис-HCl pH 8.0, 20 мМ NaCl, 1 мМ EDTA. После трехкратного цикла замораживания-оттаивания на льду лизаты центрифугировали при 10000 *g*, измеряли концентрацию общего белка в супернатанте по методу Брэдфорд [23]. Лизаты инкубировали в течение 48 ч при 37°C , после чего анализировали с помощью метода ловушки на фильтре.

В системе *in vitro* клетки нейробластомы SK-N-SH трансфицировали плазмидами, кодирующими экзон 1 гена *Q25* и *Q103* или генами *СОД1_{wt}* и *СОД1_{G93A}*. Через 24 ч после трансфекции клеток *Q25* либо *Q103* или через 48 ч после трансфекции *СОД1* клетки собирали, трижды промывали холодным ФСБ, осаждали центрифугированием при 800 *g* в течение 5 мин. К сухому клеточному осадку добавляли лизирующий буфер следующего состава: 10 мМ Трис-HCl pH 8.0, 150 мМ NaCl, 2% ДСН. После обработки ультразвуком в течение 1 мин и инкубации при 98°C в течение 2 мин лизаты использовали для изучения образования агрегатов с помощью методов ловушки на фильтре или электрофореза с задержкой в геле.

Метод ловушки на фильтре (Filter trap assay)

Мы использовали метод Filter trap assay, описанный в статье Новоселовой и соавт. [24]. Лизаты трансфицированных клеток нейробластомы SK-N-SH, полученные как описано выше, наносили на ацетатную нитроцеллюлозную мембрану, помещенную в присоединенный к вакуумному насосу аппарат для дот-блоттинга (Hemel Hempstead, Великобритания). До и после нанесения лизатов мембрану промывали под давлением буфером следующего состава: 10 мМ Трис-HCl pH 8.0, 150 мМ NaCl, 0.1% ДСН. Наличие в агрегатах *Q103* или *СОД1* определяли с помощью антител к EGFP.

ДСН-ПААГ-электрофорез и иммуноблоттинг

Для приготовления проб клетки собирали, трижды промывали холодным ФСБ, центрифугировали при 800 *g* в течение 5 мин. К сухому клеточному осадку добавляли лизирующий буфер следующего состава: 20 мМ Трис-HCl pH 7.5, 150 мМ NaCl, 0.5% Тритон X-100, 2 мМ EDTA. Лизаты центрифугировали при 10000 *g*, концентрацию суммарного белка в супернатантах определяли по методу Брэдфорд. Для анализа использовали по 50 мкг белка на пробу. После электрофореза белки из геля переносили на нитроцеллюлозную мембрану (Immobilon-P (PVDF), размер пор 0.45 мкм, фирма Millipore Corporation, США) с помощью аппарата TransBlot (BioRad, США).

Зоны интересующих белков выявляли при помощи первичных моноклональных или поликлональных антител и вторичных антител против иммуноглобулина мыши или кролика, меченных пероксидазой хрена. Пероксидазную реакцию выявляли методом усиленной хемилюминесценции с использованием системы для визуализации Chemidoc XRC (Bio-Rad, США).

Иммуноблоттинг проводили с использованием моноклональных мышечных антител против EGFP (Abcam, Великобритания) и против ГАФД (Abcam, Великобритания); поликлональных кроличьих антител против БТШ70 (R22) и против тканевой трансглутаминазы (Sigma, США). В качестве вторичных антител использовали антитела против иммуноглобулинов мыши или кролика, меченные пероксидазой хрена (Sigma, США).

Модификация ДСН-ПААГ-электрофореза для анализа ДСН-нерастворимой клеточной фракции (электрофорез с задержкой в геле, Electrophoretic retardation)

Для анализа уровня исследуемых белков в ДСН-нерастворимой клеточной фракции использовали модификацию ДСН-ПААГ-электрофореза, при которой нерастворимые комплексы задерживались в концентрирующем геле. Клеточные осадки растворяли в буфере следующего состава: 62.5 мМ Трис-НСl pH 8.0, 2.5% ДСН, 10% глицерин, 0.1 мМ EDTA, 0.02% бромфеноловый синий. Пробы обрабатывали при помощи ультразвука в течение 30 с, инкубировали при 98°C 5 мин.

Концентрирующий гель имел следующий состав: 2% акриламид, 0.17% бисакриламид, 0.125 мМ Трис-НСl pH 6.8, 0.1% ДСН, 0.06% персульфат аммония, 0.06% N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин. Иммуноблоты получали как с разделяющего, так и с концентрирующего геля.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

ГАФД влияет на процессы агрегатообразования в клеточных моделях болезни Хантингтона

В нашей работе анализировали функции трех белков – ГАФД, тТГ и БТШ70, в процессе агрегации мутантного хантингтина (модель БХ) и мутантной СОД1 (модель АБС). В качестве модели БХ использовали три клеточные линии – нейробластомы человека SK-N-SH, SH-SY-5Y и клетки эмбрионального мозга человека HNSC3148 [25]. Клетки трансфицировали плазмидой, содержащей экзон 1 гена Q103, слитый с геном EGFP. Через 12 ч после трансфекции в клетках появлялись небольшие, яркие пятна, которые в последующие 36 ч сливались в крупные флуоресцирующие комплексы размером более 100 нм (рис. 1А). Следу-

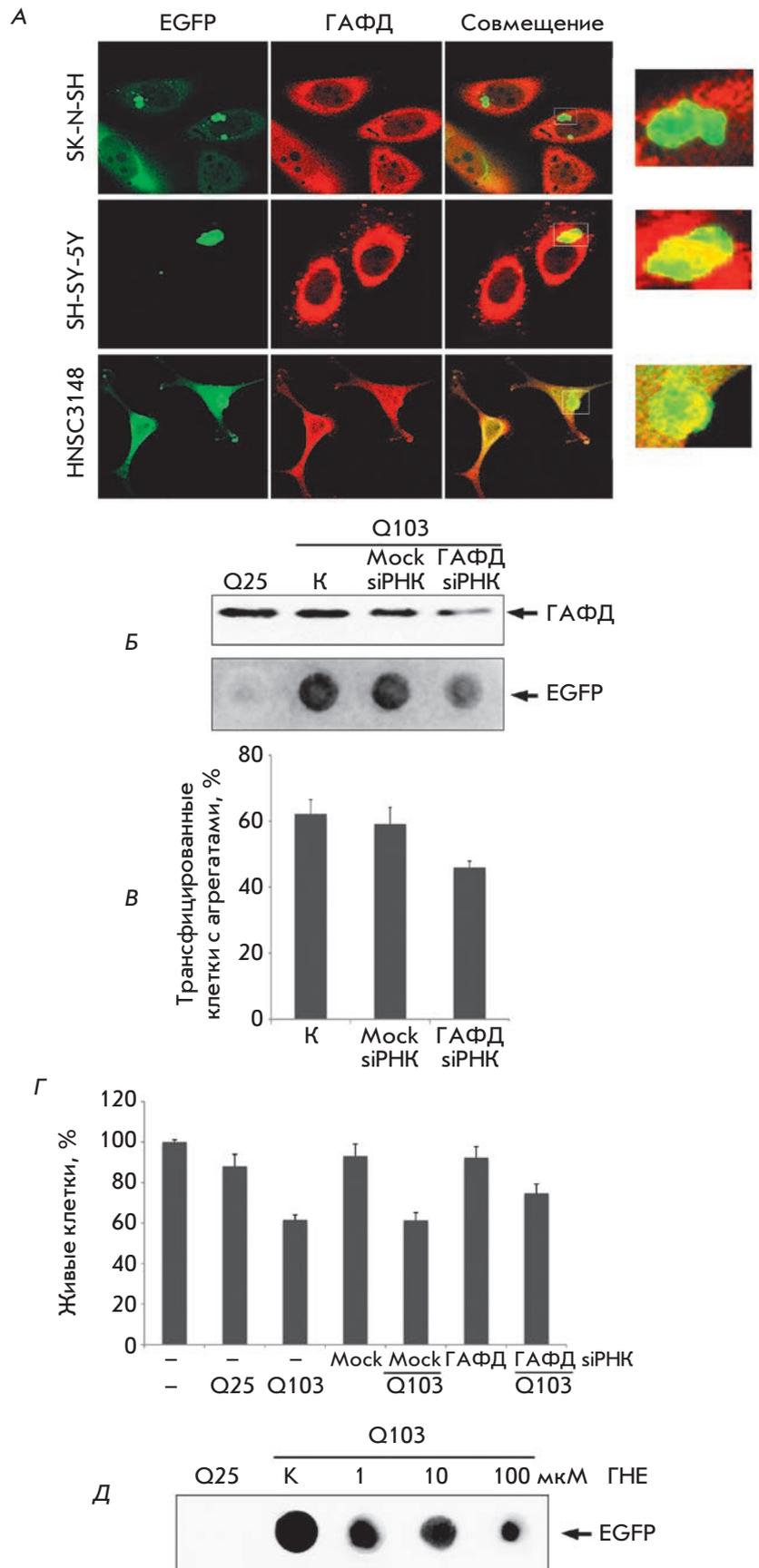
ет отметить, что картина формирования агрегатов была, несмотря на небольшие временные расхождения, одинаковой в клетках всех трех типов. Применяя специфические антитела, узнающие ГАФД, мы показали, что фермент локализуется с агрегированными цепями полиглутамина (рис. 1А).

Ранее было установлено, что в клетках нейробластомы SK-N-SH ГАФД концентрируется в местах появления олигомеров, а затем крупных агрегатов мутантного хантингтина [10]. Кроме того, этот фермент обнаружен в отложениях мутантного хантингтина на срезах мозга больных БХ [26]. Эти данные и тот факт, что подобная локализация наблюдается в эмбриональных клетках человека, говорят о распространенности явления и о том, что ГАФД, доля которого в составе клеточного белка достигает 2–4%, может влиять на формирование агрегатов в ходе развития БХ.

Влияние ГАФД на размер растущих агрегатов мутантного хантингтина мы оценивали с использованием снижения уровня этого белка с помощью siРНК. С этой целью клетки SK-N-SH за 1 сут до запуска процесса агрегации мутантного белка Q103 трансфицировали соответствующей siРНК. После подтверждения снижения уровня ГАФД определяли количество агрегированного материала. Согласно данным иммуноблоттинга применение такой технологии позволило на 50–60% уменьшить количество ГАФД в клетках нейробластомы человека SK-N-SH (рис. 1Б). Для изучения процесса агрегации мы использовали метод ловушки на фильтре. Этот метод позволяет определить, какое количество агрегированного материала, основную часть которого составляет полиглутаминовый повтор Q103 (модель БХ), остается на ацетат-целлюлозной мембране после пропускания через нее клеточных экстрактов, полученных с применением ДСН. Очевидно, что в экстракте контрольных клеток, не обработанных siРНК, обнаруживается значительное количество агрегатов (рис. 1Б). Действие неспецифической siРНК (Mock siРНК) не вызывало никаких изменений в процессе агрегации, тогда как специфическая siРНК, напротив, снижала количество агрегированных, нерастворимых в ДСН мутантных белков (рис. 1Б). Более того, подсчет числа трансфицированных клеток с агрегатами и диффузно распределенным белком показал, что при подавлении синтеза фермента число клеток, в которых сформировались агрегаты мутантного белка, снижается на 10% (рис. 1Б).

Предполагается, что между агрегацией мутантных белков и снижением жизнеспособности нейрональных клеток существует прямая связь. Поэтому мы оценили, как влияет подавление синтеза ГАФД и соответственно снижение уровня агрегации му-

Рис. 1. Влияние ГАФД на процесс агрегации мутантного хантингтина в клетках-моделях болезни Хантингтона. **А** – ГАФД локализуется в агрегатах мутантного хантингтина. Клетки нейробластомы SK-N-SH, SH-SY-5Y и эмбриональные клетки мозга человека, HNSC3148, трансфицировали плазмидой, содержащей ген мутантного хантингтина с повтором из 103 остатков глутамина, Q103, сшитый с геном зеленого флуоресцентного белка (EGFP). Через 48 ч клетки окрашивали антителами к ГАФД (вторичные антитела дают красную окраску). На вынесенном поле желтым окрашены места колокализации ГАФД и Q103 (изображения совмещены по каналам 488 и 543 нм). **Б** – Специфическое подавление экспрессии фермента с помощью siРНК (верхняя панель, siРНК ГАФД) приводит к снижению уровня агрегации Q103 в тесте ловушка на фильтре (нижняя панель), а также к (**В**) уменьшению доли трансфицированных клеток, содержащих агрегаты, и к (**Г**) повышению выживаемости клеток, трансфицированных Q103, по сравнению с контролем (**Б**, **В** – К – нетрансфицированные клетки). **Д** – Гидроксиноннаенал, ГНЕ, инактивирующий ГАФД, снижает количество агрегированного полиглутамина.



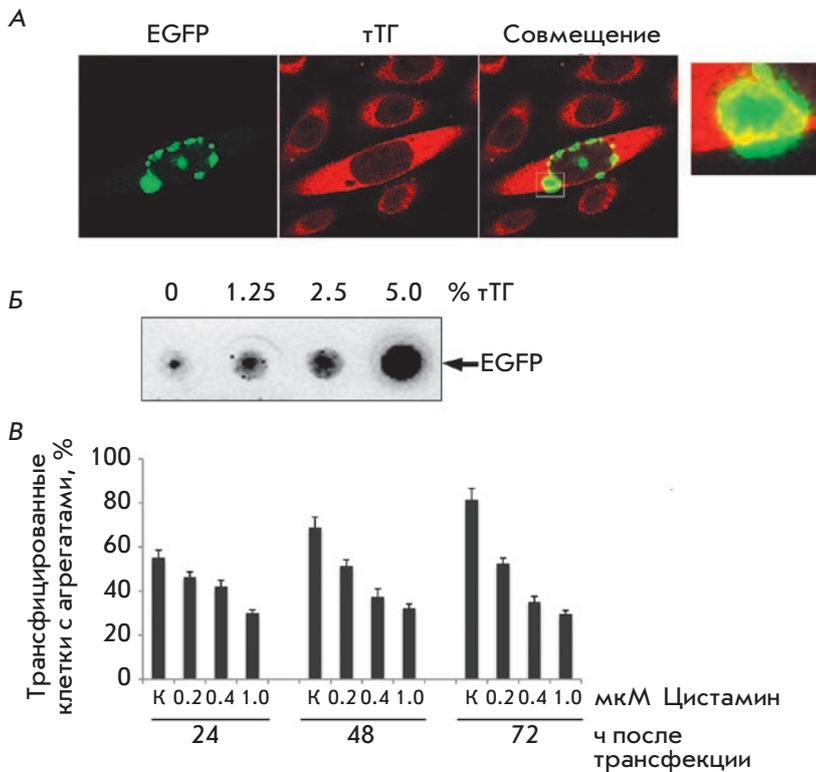


Рис. 2. Тканевая трансглутаминаза усиливает агрегацию мутантного хантингтина. **А** – тТГ локализуется в агрегатах мутантного хантингтина. Q103, конъюгированный с EGFP, окрашен зеленым цветом, тТГ – красным. На вынесенной панели область колокализации Q103 и тТГ окрашена желтым. **Б** – Добавление тТГ к экстракту клеток с полиглутамином увеличивает количество агрегированного материала в тесте ловушка на фильтре (количество тТГ выражено в процентах от общего количества белка в экстракте). **В** – Ингибитор тТГ, цистамин, подавляет процесс агрегации мутантного хантингтина в зависимости от концентрации ингибитора (К – цистамин не добавляли); по оси ординат отложено количество клеток с агрегатами, измеренное в определенный момент времени.

тантного белка на количество выживших клеток. Эти эксперименты были поставлены так же, как и описанные выше, но жизнеспособность клеток оценивали с помощью метода Мосмана через 48 ч после трансфекции siРНК, а затем конструкции, кодирующей полиглутаминовую последовательность (рис. 1Г). Показано, что экспрессия мутантного хантингтина действительно приводит к снижению числа жизнеспособных клеток на 40%. Предварительная трансфекция плазмидой с контрольной siРНК не влияет на выживаемость как контрольных, так и несущих Q103 клеток. Подавление синтеза ГАФД с помощью специфичной siРНК приводит к увеличению на 18% количества выживших клеток, экспрессирующих Q103, по сравнению с клетками с нормальным уровнем ГАФД (рис. 1Г).

Чтобы доказать значимость ГАФД как фармакологической мишени, мы провели литературный поиск низкомолекулярных соединений, обладающих сродством к ГАФД, и выявили несколько таких соединений, включая гидроксиноннал (ГНЕ). Известно, что ГНЕ способен реагировать с цистеиновыми и гистидиновыми остатками в молекуле фермента и вызывать его инактивацию [27]. ГНЕ вводили в культуру клеток нейробластомы человека SK-N-SH, экспрессирующих Q103, слитый с маркерным геном EGFP, после чего получали клеточный лизат и анализировали его с помощью метода ловушки на филь-

тре. Результаты таких опытов позволяют считать, что ГАФД действительно служит мишенью для малых молекул: степень агрегации комплекса мутантного хантингтина с ГАФД снижалась на 45–50% при воздействии ГНЕ в фармакологически релевантной концентрации (1 мкМ). Эта величина является удовлетворительным терапевтическим показателем, причем при увеличении концентрации соединения степень агрегации уменьшалась еще значительно (рис. 1Д). Эффект ГНЕ, с нашей точки зрения, основан на его способности отбирать часть молекул ГАФД из комплекса с мутантным хантингтином; процесс агрегации при этом должен затухать.

Таким образом, ГАФД локализуется в патогенных агрегатах вместе с мутантным хантингтином и, по-видимому, принимает активное участие в процессе агрегации на ее ранних этапах. В пользу такой трактовки результатов говорит тот факт, что специфическое снижение количества доступных для агрегации молекул фермента, достигаемое с помощью siРНК или высокоаффинного соединения, приводит к подавлению агрегации комплекса Q103–ГАФД.

Исследование влияния тканевой трансглутаминазы на агрегацию мутантного хантингтина

Агрегаты мутантного хантингтина, атаксина и некоторых других патогенных белков могут формиро-

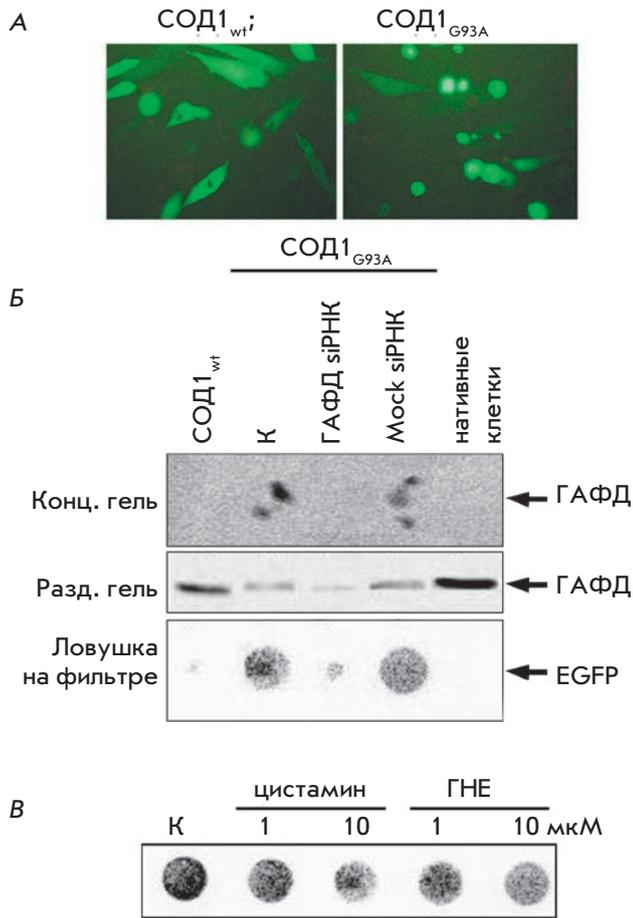


Рис. 3. Роль ГАФД в формировании агрегатов в клеточной модели амиотрофического бокового склероза. **А** – Клетки линии SK-N-SH через 48 ч после трансфекции геном *СОД1* дикого (WT) либо мутантного (G93A) типа, слитого с геном *EGFP*. На правой панели видно, что *СОД1*_{G93A} формирует нерастворимые агрегаты. **Б** – Снижение уровня экспрессии ГАФД с помощью специфической siРНК (siРНК ГАФД) предотвращает образование агрегатов мутантной *СОД1*, что следует из данных, полученных методом задержки электрофоретической подвижности в геле (верхние две панели) и методом ловушки на фильтре (нижняя панель). **В** – Ингибитор тТГ, цистамин, и препарат ГНЕ, снижающий активность ГАФД, подавляют рост агрегатов *СОД1*_{G93A} дозозависимым образом. **Б, В** – К – клетки, трансфицированные *СОД1*_{G93A}.

ваться в результате сшивания аномально длинных полиглутаминовых цепей с белками-донорами реактивных лизинов, в частности ГАФД, в процессе, катализируемом тТГ [9, 28]. С помощью иммунофлуоресцентной микроскопии мы определили локализацию тТГ в клетках, экспрессирующих *Q103*, чтобы понять роль этого фермента в нашей клеточной мо-

дели. Оказалось, что молекулы тТГ равномерно распределены по цитоплазме клетки, а вокруг агрегатов *Q103*–ГАФД наблюдаются скопления фермента. Можно видеть, что тТГ колокализуется с мутантным хантингином (рис. 2А). Участие тТГ в образовании агрегатов мы подтверждали, вводя очищенный фермент в экстракт клеток, трансфицированных конструкцией *Q103*–*EGFP*, до того, как началось формирование агрегатов. Как показывает анализ агрегации *ex vivo* (см. «Экспериментальную часть»), проведенный с применением метода ловушки на фильтре, добавление тТГ дозозависимым образом увеличивает количество *Q103*, нерастворимого в ДСН и остающегося на мембране (рис. 2Б).

Насколько подавление активности тТГ отразится на процессе образования агрегатов? Чтобы ответить на этот вопрос, мы инкубировали клетки SK-N-SH с известным ингибитором фермента, цистамином, начиная с момента начала агрегации, т.е. через 5 ч после трансфекции геном *Q103*–*EGFP*. Подсчет числа клеток с агрегатами показал, что действие цистамина проявляется уже через 24 ч после начала инкубации; через 1 сут влияние ингибитора становится еще более выраженным. Наконец, подсчет числа клеток через 3 сут после внесения ингибитора в среду показывает, что цистамин в концентрации 0.4 мкМ снижает число клеток с агрегатами *Q103*–*EGFP* более чем наполовину, а дальнейшее увеличение концентрации ингибитора подавляет агрегацию еще сильнее (рис. 2В). Интересно, что при использовании цистамина в концентрации 1 мкМ доля клеток с агрегатами не изменялась с течением времени и составляла 25–28% от всего количества трансфицированных клеток. В популяции необработанных клеток доля клеток, содержащих агрегаты, росла и через 72 ч после трансфекции составляла 82%. Это может говорить о том, что образование полиглутаминовых агрегатов обусловлено не только действием тТГ, но, возможно, и другим механизмом, таким, например, как в модели «polar zipper» [3].

Участие ГАФД и тТГ в процессах формирования агрегатов мутантной *СОД1*

Предполагая, что ГАФД и тТГ способствуют агрегации не только хантингина, но и других мутантных белков, мы провели анализ функций этих ферментов в формировании агрегатов на примере клеточной модели АБС. С этой целью использовали плазмиды, содержащие гены *СОД1*_{G93A} и *СОД1*_{wt}, слитые с геном зеленого флуоресцентного белка. Микроскопический анализ клеток нейробластомы SK-N-SH, трансфицированных этими плазмидами, показал, что мутантная *СОД1*_{G93A}, в отличие от *СОД1*_{wt}, способна формировать агрегаты в течение 36–48 ч (рис. 3А).

Играет ли ГАФД в формировании агрегатов мутантной СОД1 такую же роль, как и в модели БХ? Чтобы понять это, мы применили технологию специфических малых интерферирующих РНК. Лизаты клеток SK-N-SH, трансфицированных одновременно специфической или контрольной siРНК и СОД1_{wt} или СОД1_{G93A}, анализировали методом задержки электрофоретической подвижности в геле и иммуноблоттинга, а также методом ловушки на фильтре (рис. 3Б).

Как следует из результатов электрофоретического анализа, лизат клеток, обработанных специфической siРНК, содержит значительно меньше ГАФД, способной проходить в разделяющий гель, чем лизаты контрольных (интактных) клеток, и клеток, несущих СОД1_{wt} (рис. 3Б, средняя панель). Как в контрольных, так и в трансфицированных Mock siРНК клетках, несущих мутантную СОД1, уровень ГАФД, проходящей в разделяющий гель, понижен. Однако именно в лизатах из таких клеток содержится значительное количество агрегатов, задерживающихся в концентрирующем геле, (рис. 3Б, верхняя панель). Эти результаты подтверждаются и в опыте с применением метода ловушки на фильтре; в лизатах таких клеток выявлены агрегаты мутантной СОД1 (рис. 3Б, нижняя панель), в состав которых, видимо, входит и ГАФД.

Кроме специфической siРНК, для подавления ГАФД использовали ГНЕ. Как показано методом ловушки на фильтре, ГНЕ в концентрации 1 мкМ подавлял агрегацию мутантной СОД1; повышение концентрации ГНЕ до 10 мкМ приводило к еще более выраженному эффекту (рис. 3В). Влияние ГНЕ можно объяснить тем, что при АБС, как и при многих других патологических процессах, усиливается образование свободных радикалов, а окислительный стресс вызывает нарушение структуры ГАФД. При этом экспонируются участки молекулы фермента, которые связываются с мутантными белками, что приводит к образованию крупных комплексов [29]. Мы предполагаем, что ГНЕ препятствует формированию подобных комплексов, т.е. ингибирует агрегацию СОД1.

Участие тТГ в формировании агрегатов СОД1-ГАФД показано также с помощью ингибиторного анализа. Используя цистамин, мы установили, что подавление активности тТГ уменьшает массу агрегирующего материала на фильтре. Однако такой эффект достигается при высоких концентрациях цистамина (не ниже 10 мкМ), превышающих фармакологические значения (рис. 3В). Подавление агрегации мутантной СОД1 при использовании цистамина объяснить труднее. Возможно, ингибирование тТГ предотвращает образование ковалентных связей как между молекулами ГАФД, так и между ГАФД и другими белками.

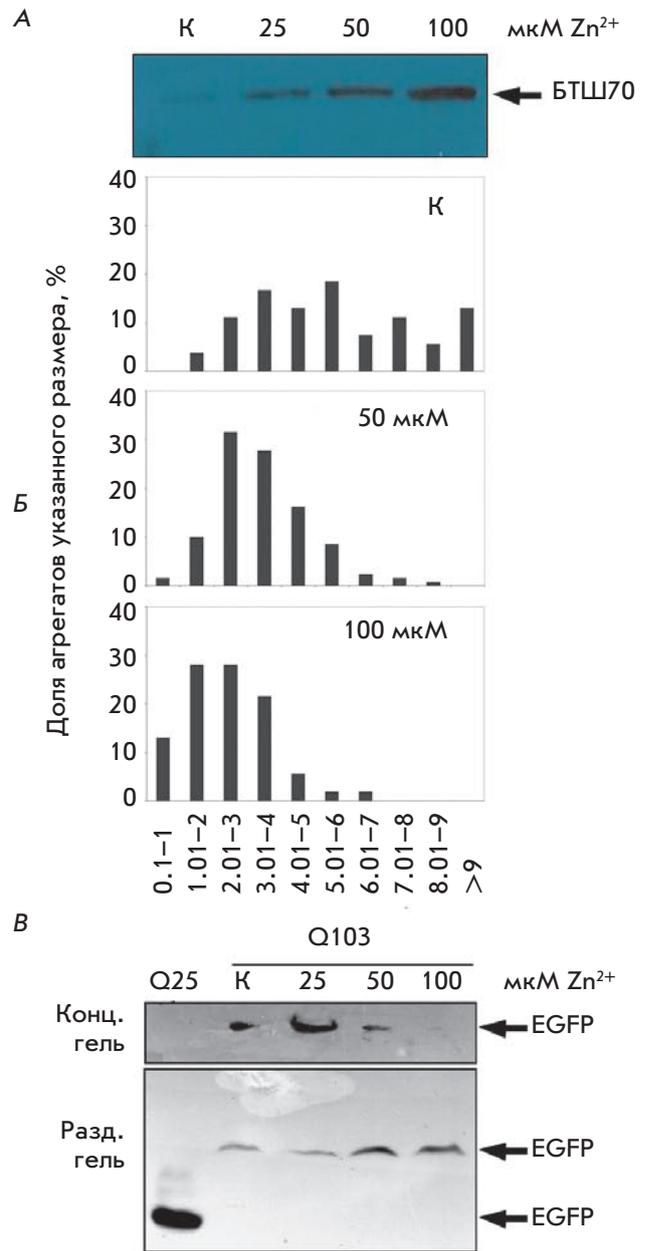


Рис. 4. БТШ70 препятствует формированию агрегатов мутантного хантингтина в клеточной модели болезни Хантингтона. А – Содержание шаперона в клетках SK-N-SH увеличивается в зависимости от концентрации сульфата цинка (К – без сульфата цинка). Б – Гистограммы распределения агрегатов Q103 по размеру (в мкм) в зависимости от концентрации сульфата цинка и соответственно количества БТШ70 в клетках. В – Дробное увеличение экспрессии БТШ70 в клетках нейробластомы SK-N-SH, трансфицированных Q103, приводит к снижению агрегированного полиглутамина в тесте ловушка на фильтре. На Б и В: К – сульфат цинка не добавляли.

Шаперон БТШ70 подавляет агрегацию мутантного хантингтина в клеточной модели БХ

В предотвращении образования комплексов поврежденных или мутантных полипептидов значительную роль играет шаперон БТШ70 [30]. Влияние БТШ70 на агрегацию мутантного хантингтина мы изучали с использованием в качестве модели клеток нейробластомы человека SK-N-SH, трансфицированных геном *BTSH70* под контролем индуцибельного металлотионеинового промотора. Экспрессию *BTSH70* индуцировали солью цинка ($ZnSO_4$), при помощи которой можно дозозависимым образом повышать уровень белка (рис. 4А), за 6 ч до трансфекции клеток SK-N-SH плазмидой, несущей ген *Q103*. Диаметр агрегатов мутантного хантингтина определяли через 48 ч после трансфекции. Средний диаметр агрегатов в трансфицированных клетках, обработанных 50 мкМ $ZnSO_4$, составил 3.15 ± 0.69 мкм, в то время как в контрольных клетках диаметр агрегатов был равен 6.82 ± 0.98 мкм. При повышении концентрации $ZnSO_4$ до 100 мкМ наблюдалось дальнейшее снижение и числа клеток, несущих агрегаты, и размеров агрегатов (средний диаметр равен 1.52 ± 0.19 мкм, рис. 4Б). Влияние БТШ70 на количество агрегирующего материала мы анализировали с помощью метода ловушки на фильтре. Оказалось, что при повышении концентрации $ZnSO_4$ и соответственно уровня БТШ70 снижается количество задержанного на поверхности фильтра материала, содержащего EGFP-маркер (рис. 4В).

Участие молекулярных шаперонов, особенно БТШ70, в предотвращении формирования агрегатов патогенных или поврежденных белков известно, однако, механизмы этого эффекта до сих пор остаются невыясненными. В этой связи интересны данные о том, что шаперон образует комплекс с агрегирующими моно- и олигомерами мутантного хантингтина [31]. Этот комплекс носит динамический характер. Предполагается, что БТШ70 препятствует включению

полиглутаминовых молекул в образующиеся агрегаты мутантного хантингтина. Однако результаты нашей недавно опубликованной работы [10] говорят о том, что БТШ70 действует не только на мутантный хантингтин, но и на молекулы ГАФД, которые многократно усиливают агрегацию. Исходя из представленных результатов, можно предположить, что, по крайней мере в клетках-моделях БХ, БТШ70 способен препятствовать образованию комплекса полиглутамин-ГАФД, защищая фермент от сшивающего действия тТГ. Эта гипотеза не противоречит теориям о роли шаперонов в защите клеток от нейропатогенных стимулов, однако, безусловно нуждается в тщательной проверке.

ВЫВОДЫ

В настоящей работе с использованием клеточных моделей болезни Хантингтона и амиотрофического бокового склероза установлено, что помимо самих патогенных белков, специфичных для указанных заболеваний, большое значение имеют два фермента – глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназа и тканевая транслугтаминаза. Первый фермент участвует в формировании комплексов с патогенными белками в обеих моделях данных заболеваний; его блокада приводит к снижению темпов агрегации. Транслугтаминаза, по-видимому, катализирует образование комплекса ГАФД с патогенными клеточными белками. Фактором, предотвращающим агрегацию, является шаперон БТШ70, повышение экспрессии которого дозозависимым образом снижает патогенные проявления. На основании полученных данных мы утверждаем, что все три белка могут рассматриваться в качестве перспективных фармакологических мишеней. ●

Работа поддержана программой Президиума РАН «Фундаментальные науки – медицине» и РФФИ (гранты № 11-04-12047-офи_м и 12-08-31523).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Margulis B., Kinev A., Guzhova I. Heat Shock Proteins in Biology and Medicine. Kerala, India: Research Signpost, 2006. P. 305–329.
- Evert B.O., Wüllner U., Klockgether T. // Cell Tissue Res. 2000. V. 301. № 1. P. 189–204.
- Perutz M.F., Johnson T., Suzuki M., Finch J.T. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1994. V. 91. № 12. P. 5355–5358.
- Bence N.F., Sampat R.M., Kopito R.R. // Science. 2001. V. 292. № 5521. P. 1552–1555.
- Kahlem P., Terre C., Green H., Djian P. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1996. V. 93. № 25. P. 14580–14585.
- Fischbeck K.H. // Brain Res. Bull. 2001. V. 56. P. 161–163.
- Cooper A.J., Sheu K.R., Burke J.R., Strittmatter W.J., Gentile V., Peluso G., Blass J.P. // J. Neurochem. 1999. V. 72. P. 889–899.
- Lai T.S., Tucker T., Burke J.R., Strittmatter W.J., Greenberg C.S. // J. Neurochem. 2004. V. 88. № 5. P. 1253–1260.
- Orru S., Ruoppolo M., Francese S., Vitagliano L., Marino G., Esposito C. // Protein Sci. 2002. V. 11. P. 137–146.
- Guzhova I.V., Lazarev V.F., Kaznacheeva A.V., Ippolitova M.V., Muronetz V.I., Kinev A.V., Margulis B.A. // Hum. Mol. Genet. 2011. V. 20. № 20. P. 3953–3963.
- Wang Q., Woltjer R.L., Cimino P.J., Pan C., Montine K.S., Zhang J., Montine T.J. // FASEB J. 2005. V. 19. P. 869–871.
- Tsuchiya K., Tajima H., Kuwae T., Takeshima T., Nakano T., Tanaka M., Sunaga K., Fukuhara Y., Nakashima K., Ohama E., et al. // Eur. J. Neurosci. 2005. V. 21. № 2. P. 317–326.
- Butterfield D.A., Hardas S.S., Lange M.L. // J. Alzheimers

- Dis. 2010. V. 20. № 2. P. 369–393.
14. Oster C., Pagnini F. // *Front. Psychol.* 2012. V. 3. A. 530.
15. Al-Chalabi A., Jones A., Troakes C., King A., Al-Sarraj S., van den Berg L.H. // *Acta Neuropathol.* 2012. V. 124. № 3. P. 339–352.
16. Kobayashi Y., Kume A., Li M., Doyu M., Hata M., Ohtsuka K., Sobue G. // *J. Biol. Chem.* 2000. V. 275. № 12. P. 8772–8778.
17. Muchowski P.J., Wacker J.L. // *Nat. Rev.* 2005. V. 6. P. 11–22.
18. Jana N.R., Tanaka M., Wang G. // *Hum. Mol. Genet.* 2000. V. 9. № 13. P. 2009–2018.
19. Hartl F.U., Hayer-Hartl M. // *Science.* 2002. V. 295. № 5561. P. 1852–1858.
20. Ben-Zvi A., De Los Rios P., Dietler G., Goloubinoff P. // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. № 36. P. 37298–37303.
21. Тихонова Н.С., Москалева О.С., Маргулис Б.А., Гужова И.В. // *Цитология.* 2008. Т. 50. № 5. С. 467–472.
22. Mosmann T. // *J. Immunol. Meth.* 1983. V. 65. № 1–2. P. 55–63.
23. Bradford M.A. // *Anal. Biochem.* 1976. V. 72. P. 248–254.
24. Novoselova T.V., Margulis B.A., Novoselov S.S., Sapozhnikov A.M., van der Spuy J., Cheetham M.E., Guzhova I.V. // *J. Neurochem.* 2005. V. 94. № 3. P. 597–606.
25. Poltavtseva R.A., Marey M.V., Aleksandrova M.A., Revishchin A.V., Korochkin L.I., Sukhikh G.T. // *Brain Res. Dev. Brain Res.* 2002. V. 134. № 1–2. P. 149–154.
26. Kish S.J., Lopes-Cendes I., Guttman M., Furukawa Y., Pandolfo M., Rouleau G.A., Ross B.M., Nance M., Schut L., Ang L., et al. // *Arch. Neurol.* 1998. V. 55. № 10. P. 1299–1304.
27. Uchida K., Stadtman E.R. // *J. Biol. Chem.* 1993. V. 268. № 9. P. 6388–6393.
28. Cooper A.J., Sheu K.R., Burke J.R., Onodera O., Strittmatter W.J., Roses A.D., Blass J.P. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1997. V. 94. № 23. P. 12604–12609.
29. Naletova I., Schmalhausen E., Kharitonov A., Katrukha A., Saso L., Caprioli A., Muronetz V. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2008. V. 1784. № 12. P. 2052–2058.
30. Meriin A.B., Sherman M.Y. // *Int. J. Hyperthermia.* 2005. V. 21. № 5. P. 403–419.
31. Muchowski P.J., Schaffar G., Sittler A., Wanker E.E., Hayer-Hartl M.K., Hartl F.U. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000. V. 97. № 14. P. 7841–7846.