

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

На правах рукописи

БАРИНОВА Ксения Вячеславовна

**ИЗУЧЕНИЕ АМИЛОИДОГЕННОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ
АЛЬФА-СИНУКЛЕИНА**

03.01.08 - Биоинженерия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва – 2017

Работа выполнена на факультете биоинженерии и биоинформатики и в отделе биохимии животной клетки Научно-исследовательского института физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

Научный руководитель:

Муронец Владимир Израилевич, доктор биологических наук, профессор, заведующий отделом биохимии животной клетки Научно-исследовательского института физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова».

Официальные оппоненты:

Вартапетян Андрей Борисович, доктор химических наук, профессор, заведующий отделом химии и биохимии нуклеопротеидов Научно-исследовательского института физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова».

Чеботарева Наталья Александровна, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории структурной биохимии белка Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук».

Козин Сергей Александрович, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории конформационного полиморфизма белков в норме и патологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук.

Защита состоится 4 декабря 2017 г. в 16 часов 00 минут на заседании Совета МГУ.03.04 по защите докторских и кандидатских диссертаций по специальностям 03.01.08 - Биоинженерия (биологические науки); 03.01.09 - Математическая биология, биоинформатика (биологические науки) при Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова» по адресу: 119234, Москва, Ленинские горы, дом 1, стр. 73, Факультет биоинженерии и биоинформатики, аудитория 406.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке МГУ имени М.В. Ломоносова (Москва, Ломоносовский просп., д. 27, Фундаментальная библиотека, отдел диссертаций) и на сайте ИАС «ИСТИНА»: <http://istina.msu.ru>.

Автореферат разослан «__» октября 2017 года

Ученый секретарь диссертационного совета,

кандидат химических наук

 И.В. Шаповалова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Важность изучения биохимических и биофизических особенностей α -синуклеина, процессов его агрегации и влияния различных факторов на эти процессы методами биоинженерии обусловлена его связью с целым рядом заболеваний, в том числе социально-значимых, объединенных общим термином «синуклеинопатии». Синуклеинопатии включают в себя болезнь Паркинсона, деменцию с тельцами Леви, вариант болезни Альцгеймера с тельцами Леви, а также множественную системную атрофию. Все эти заболевания характеризуются наличием в нейронах амилоидных включений, основным компонентом которых является α -синуклеин. Невзирая на то, что количество работ, посвященных α -синуклеину, очень велико, по ряду аспектов (например, роль гликирования в амилоидогенной трансформации α -синуклеина, токсичность разных форм α -синуклеина и др.) имеется противоречивая информация. При этом, несмотря на косвенные данные об участии глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы в развитии болезни Паркинсона, прямые доказательства взаимодействия α -синуклеина с этим ферментом отсутствуют. Изучение неизвестных или недостаточно ясных молекулярных механизмов, связанных с синуклеинопатиями, с помощью современных методов биоинженерии позволит не только понять природу этих заболеваний, но и найти новые белки-мишени для лекарственных препаратов, пригодных для их профилактики и лечения.

В представленной работе имеется и важный фундаментальный аспект. Центральная догма структурной биологии состоит в том, что правильное сворачивание белков необходимо для выполнения их биологической функции. Соответственно, отсутствие стабильной конформации является отрицательным фактором, поскольку неструктурированные белки в пределах догмы рассматривались как нестабильные компоненты, лишённые физиологической активности и склонные к агрегации (Frimpong et al., 2010). Хотя нет сомнений в том, что структура белка и его функции тесно связаны, растёт осознание того, что не все биологически функциональные белки самопроизвольно сворачиваются в стабильные структуры. Примером неструктурированных белков является семейство синуклеинов, экспрессируемых преимущественно в нейронах млекопитающих. В семейство входят α -, β - и γ -синуклеины, однако наибольший интерес вызывает изучение α -синуклеина, являющегося основным объектом данной работы.

Целью данной работы является исследование амилоидогенной трансформации рекомбинантного α -синуклеина человека и влияния различных факторов на этот процесс.

Для реализации этой цели были поставлены следующие **задачи**:

- 1) разработка методики для выделения α -синуклеина человека без дополнительных мотивов из клеток-продуцентов;
- 2) получение и очистка поликлональных антител кролика против α -синуклеина;
- 3) выделение рекомбинантной глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы человека без дополнительных мотивов;
- 4) изучение агрегации различных форм α -синуклеина;
- 5) определение влияния гликирования на амилоидогенную трансформацию α -синуклеина;
- 6) исследование взаимодействия глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы и α -синуклеина различными методами;
- 7) изучение влияния глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы на амилоидогенную трансформацию α -синуклеина.

Научная новизна и практическая значимость работы. Обнаружено влияние цистеиновых мутантов α -синуклеина, образующихся в результате ошибок трансляции при экспрессии белка в бактериальной системе, на его амилоидную трансформацию. Показано, что содержание мутантного белка может достигать 50% в зависимости от условий инкубации. Присутствие таких мутантов в исследуемых препаратах рекомбинантных α -синуклеинов, экспрессированных в бактериальных системах, может существенно исказить результаты экспериментов. Кроме того, сходные процессы могут происходить в клетках эукариот, в том числе человека, что может изменять амилоидогенную трансформацию α -синуклеина.

Впервые показана возможность гликирования α -синуклеина глицеральдегид-3-фосфатом, промежуточным метаболитом гликолиза. Показано, что амилоидная трансформация α -синуклеина полностью предотвращается не только метилглиоксалем, но и глицеральдегид-3-фосфатом, однако процесс агрегации происходит во всех трех случаях, независимо от наличия или отсутствия модификации белка.

Впервые предложен метод очистки рекомбинантной соматической глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы человека без дополнительных тэгов из бактериальных клеток штамма-продуцента. Метод позволяет выделить

нативную ГАФД человека с высокой удельной активностью (117 ± 5 мкмоль NADH / мин*мг белка) без посторонних белковых форм.

С помощью современных методов биоинженерии обнаружено взаимодействие α -синуклеина и глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы, а также инактивация фермента, играющего важную роль в гликолизе, в результате этого взаимодействия. Добавление ГАФД человека не предотвращает агрегацию α -синуклеина, но подавляет образование амилоидных структур. Поскольку взаимодействие ГАФД человека с α -синуклеином сохраняется при физиологических условиях, это может влиять на развитие синуклеинопатий.

Положения, выносимые на защиту:

1. Экспрессия рекомбинантного α -синуклеина человека в бактериальной системе приводит к появлению белка с заменой тирозинового остатка на цистеиновый в 136 положении (Tyr136Cys). Содержание мутантного белка может достигать 50% при pH культуральной среды 6,6.
2. Окисление кислородом воздуха приводит к димеризации мутантного α -синуклеина с заменой Tyr136Cys за счет образования дисульфидных связей, что, в свою очередь, приводит к появлению в структуре альфа-спиральных участков в процессе агрегации белка.
3. Димерные формы мутантного белка Tyr136Cys не индуцируют амилоидную агрегацию белка и предотвращают амилоидную трансформацию α -синуклеина дикого типа.
4. Альфа-синуклеин может быть гликирован различными сахарами и альдегидами, но наиболее эффективно происходят модификации при использовании 1 мМ метилглиоксаля или 1 мМ промежуточного метаболита гликолиза, глицеральдегид-3-фосфата.
5. Гликирование не препятствует агрегации α -синуклеина, но предотвращает его амилоидную трансформацию. В гликированных препаратах наблюдается образование коротких неамилоидных «фибрилл».
6. Впервые выделен гомогенный препарат рекомбинантной соматической глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы человека, обладающий высокой удельной активностью, без дополнительных «тэгов».
7. Различными методами показано взаимодействие α -синуклеина и глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы.

8. В результате взаимодействия α -синуклеина и глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы происходит инактивация фермента, играющего важную роль в гликолизе.
9. Добавление глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы не предотвращает агрегацию α -синуклеина, но подавляет образование амилоидных структур.

Апробация работы. Результаты работы были представлены на конференциях: International Conference "Biocatalysis-2017: Fundamentals and Applications", Московская обл., Истра, Россия; XXIV Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2017», Москва, Россия; V Съезд физиологов СНГ, V Съезд Биохимиков России, 2016, Сочи, Россия; Biomembranes 2016, Долгопрудный, Россия; International Conference "Biocatalysis-2015: Fundamentals and Applications", Московская обл., Истра, Россия, а также на совместном научном семинаре отдела биохимии животной клетки, отдела электронной микроскопии и отдела биокинетики НИИ ФХБ имени А.Н. Белозерского (5 сентября 2017 года).

Личный вклад автора. Основные результаты работы были получены самим автором. Личный вклад заключается в анализе данных литературы, планировании и проведении экспериментов, а также в обработке и анализе полученных данных, подготовке публикаций.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 10 работ, среди которых 5 статей и 5 тезисов.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из следующих разделов: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и их обсуждение», «Заключение», «Основные результаты и выводы», а также «Список литературы». Работа содержит 233 страницы машинописного текста, 10 таблиц и 60 рисунков. Список литературы включает 245 отечественных и зарубежных источников.

В работе приняты следующие **сокращения**:

ДЛС – динамическое лазерное светорассеяние, ДСК – дифференциальная сканирующая калориметрия, ДСН - додецилсульфат натрия, ДТТ – дитиотреитол, КД – спектроскопия кругового дихроизма, **3-ФГА** – глицеральдегид-3-фосфат; **ELISA** – твердофазный иммуноферментный анализ, **IPTG** – изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид, **MALDI-TOF** – матрично-активированная лазерная десорбционная ионизационная времяпролетная масс-спектрометрия, **PBS** – фосфатно-солевой буфер, **PBST** – фосфатно-солевой буфер с добавлением 0,05% Tween-20, **SD** – стандартное отклонение, **ThT** – тиофлавин Т.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектами исследования были рекомбинантные α -синуклеин и глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа человека, полученные с помощью методов биоинженерии.

Экспрессию рекомбинантных белков проводили в бактериальных клетках *E. coli*. Для очистки α -синуклеина использовали метод кислотного осаждения примесных белков с последующей очисткой на тиол-сефарозе.

Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу человека выделяли с помощью фракционирования сульфатом аммония и гель-фильтрации на сефадексе G100.

Получение агрегатов α -синуклеина проводили в буфере PBS, pH 4,0 при 37°C и интенсивном встряхивании. Концентрация белка составляла 0,4 мг/мл, максимальный объем пробы – 300 мкл. О появлении амилоидных структур судили по увеличению флуоресценции тиофлавина Т.

Для гликирования использовали 1 мМ метилглиоксаля или 1 мМ 3-ФГА в буфере PBS, pH 7,4. Пробы инкубировали при 37°C в течение 24 часов без перемешивания. Ранние продукты гликирования отслеживали с помощью фруктозаминового метода, поздние продукты определяли флуориметрически.

Мутность раствора определяли по поглощению пробы при $\lambda=320$ нм.

Гидродинамический диаметр и интенсивность светорассеяния измеряли на приборе Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Великобритания).

Спектры кругового дихроизма записывали в диапазоне длин волн от 190 до 240 нм (дальняя УФ область) при температуре 25°C в кювете с длиной оптического пути 0,1 мм на КД спектрометре Chirascan (Applied Photophysics, UK). Скорость изменения длины волны составляла 1 нм/сек.

Спектры флуоресценции снимали на спектрофлуориметре FluoroMax-3 (Horiba Scientific, Япония). Препарат белка находился в кварцевой кювете 1×1 см. Длина волны возбуждения $\lambda = 335$ нм, спектры снимали в пределах 350-600 нм.

Трансмиссионную электронную микроскопию проводили с помощью электронного микроскопа LEO912 AB Omega (Carl Zeiss, Германия) при ускоряющем напряжении 100 кВ. **Ультрацентрифугирование** проводили с помощью аналитической ультрацентрифуги Beckman (модель E), оснащенной фотоэлектрической сканирующей оптической системой абсорбции при длине волны 280 нм, при 60000 rpm и 22°C.

Дифференциальную сканирующую калориметрию проводили на микрокалориметре DASM-4 (Biopribor, Russia) в 0,47 мл спиральной ячейке со скоростью нагрева раствора белка 1°C/мин.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Выделение альфа-синуклеина из клеток *E.coli*

Наработку белкового продукта в клетках *E.coli* штамма BL21(DE3) индуцировали добавлением IPTG до конечной концентрации 1 мМ и инкубацией в течение 5 часов при 37°C (рис.1А, дорожка 1). Рекombинантный α -синуклеин человека выделяли кислотным осаждением примесных белков. Полученный препарат был проанализирован методом ДСН-электрофореза в восстанавливающих условиях (в присутствии β -меркаптоэтанола) (рис.1А, дорожка 5).

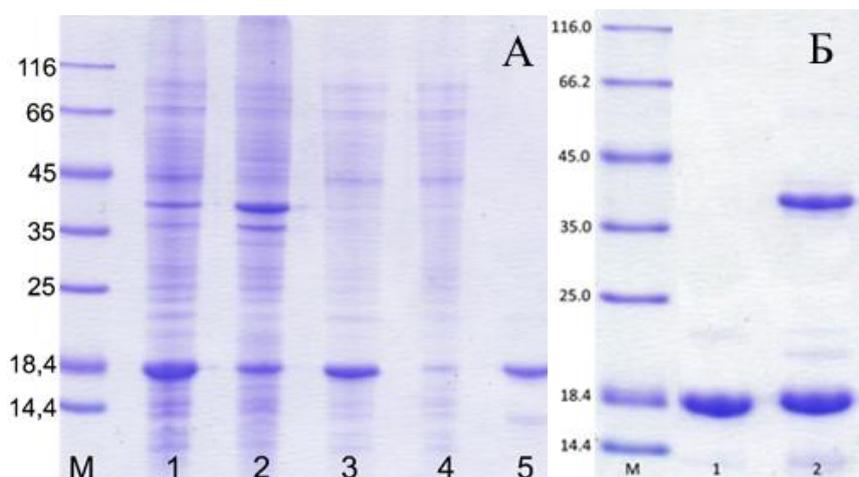


Рис.1 Анализ препарата α -синуклеина на разных стадиях очистки методом ДСН-электрофореза в восстанавливающих (А) и невосстанавливающих (Б) условиях.

А) М - маркеры (116-14,4 кДа); 1 - клетки *E.coli* после индукции в течение 5 часов добавлением 1 мМ IPTG; 2 - обломки клеток после ультразвуковой обработки; 3 - клеточный экстракт; 4 – осадок из примесных белков после кислотного осаждения; 5 – фракция α -синуклеина после высаливания сухим сульфатом аммония до 40%-ого насыщения. Б) М – маркеры (116-14,4 кДа); 1 – очищенный препарат α -синуклеина с β -меркаптоэтанолом; 2 – этот же препарат α -синуклеина без β -меркаптоэтанола.

Однако при анализе в невосстанавливающих условиях (без β -меркаптоэтанола) тот же самый препарат давал две полосы (Рис. 1Б, дорожка 2), что, вероятно, свидетельствовало об образовании дисульфидных мостиков между мономерами α -синуклеина.

Результат был неожиданным, поскольку молекула α -синуклеина, как известно, не содержит остатков цистеина. При секвенировании плазмидной ДНК, которую использовали для трансформации клеток *E.coli*, не было обнаружено никаких мутаций.

1.1 Отделение цистеин-содержащей фракции альфа-синуклеина на колонке с тиол-сефарозой

При пропускании препарата рекомбинантного α -синуклеина через колонку с тиол-сефарозой удалось получить 2 фракции: фракцию,

связавшуюся с носителем, и фракцию, не связавшуюся с носителем (белок дикого типа) (рис.2А).

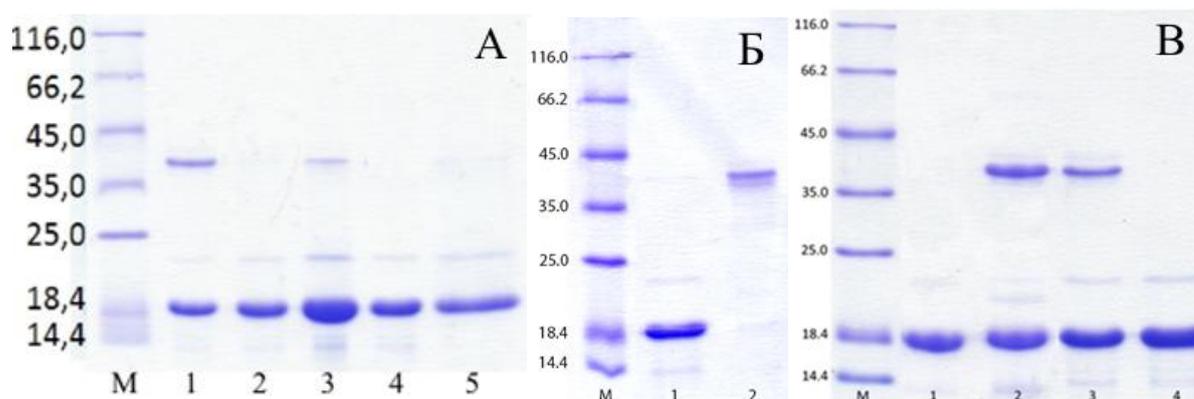


Рис.2 А - Электрофореграмма очистки двух изоформ α -синуклеина на тиол-сефарозе. Маркеры (116-14,4 кДа); 1 – α -синуклеин до восстановления 5 мМ ДТТ; 2 – α -синуклеин после восстановления 5 мМ ДТТ в течение часа при 20°C; 3 – α -синуклеин после диализа в течение 2 часов при 4°C; 4 – фракция, не связавшаяся с тиол-сефарозой (белок дикого типа); 5 – фракция после элюции 10 мМ ДТТ (мутантный α -синуклеин с заменой Tyr136Cys, как будет доказано далее).

Б - Отделение Cys-содержащей фракции α -синуклеина на тиол-сефарозе. ДСН-электрофорез в невосстанавливающих условиях через месяц после разделения. Дорожки: М – маркеры (116-14,4 кДа); 1 – фракция, не связавшаяся с носителем (белок дикого типа); 2 – фракция, связавшаяся с носителем (после инкубации в отсутствие ДТТ).

В - ДСН-электрофорез очищенного препарата α -синуклеина в восстанавливающих (дорожки 1, 4) и невосстанавливающих (дорожки 2, 3) условиях. Клетки выращивали при рН 6,6 (1, 2) или 7,4 (3, 4).

Через месяц после разделения фракция, не связавшаяся с носителем, даёт только полосу 18 кДа (рис.2Б, дорожка 1), в то время как фракция, связавшаяся с носителем, даёт только полосу 40 кДа, что означает, что весь белок перешел в форму димера (рис.2Б, дорожка 2). MALDI масс-спектрометрический анализ показал, что фракция α -синуклеина, связавшаяся с тиол-сефарозой, соответствует α -синуклеину с заменой Tyr136Cys, а полученный нами рекомбинантный α -синуклеин представляет собой смесь α -синуклеинов дикого типа (Tyr136) и α -синуклеина с заменой (Tyr136Cys).

Похожие результаты были получены ранее в работе Masuda et al (Masuda et al., 2006): около 20% молекул рекомбинантного α -синуклеина содержали замену Tyr136Cys. Авторы объясняют данное явление тем, что при экспрессии α -синуклеина в клетках *E.Coli* происходит ошибочное узнавание кодона ТАС цистеинил-тРНК, в результате чего в части молекул происходит замена Tyr136Cys. Замена кодона 136-го тирозинового остатка с ТАС на ТАТ предотвращает включение Cys в положении 136. В нашем случае включение цистеина зависело от рН среды, в которой выращивали бактерии: доля белка Tyr136Cys увеличивалась при понижении рН среды, достигая почти 50% при рН 6,6 (рис. 2В, дорожка 2).

2. Получение поликлональных антител против альфа-синуклеина

Следующей задачей после выделения α -синуклеина дикого типа стало получение поликлональных антител на этот белок. Для ее решения провели подкожную иммунизацию кролика чистым препаратом α -синуклеина с гистиридиновым тэгом, смешанным с полным адьювантом Фрейнда в соотношении 1:1. Фракцию иммуноглобулинов сначала очищали на колонке с белком G, а затем - на CNBr-активированной сефарозе с ковалентно иммобилизованным α -синуклеином.

Специфичность очищенных антител проверяли с помощью точечного и стандартного иммуноблоттинга. Антитела в дальнейшем были использованы для проведения твердофазного иммуноферментного анализа и экспериментов по иммунопреципитации α -синуклеина и соматической ГАФД человека.

3. Выделение рекомбинантной ГАФД человека

Выделение белка проводили из клеток *E.coli* штамма Rosetta 2 (DE3). После ультразвуковой обработки и осаждения обломков клеточный экстракт фракционировали сухим сульфатом аммония и анализировали полученные фракции электрофоретически в восстанавливающих условиях. Было показано, что большая часть рекомбинантной ГАФД человека с минимальным количеством примесей содержится во фракции 70-80% насыщения (рис.3А, дорожка 5). Эта фракция также обладала максимальной дегидрогеназной активностью (109 ± 5 мкмоль NADH / мин*мг белка).

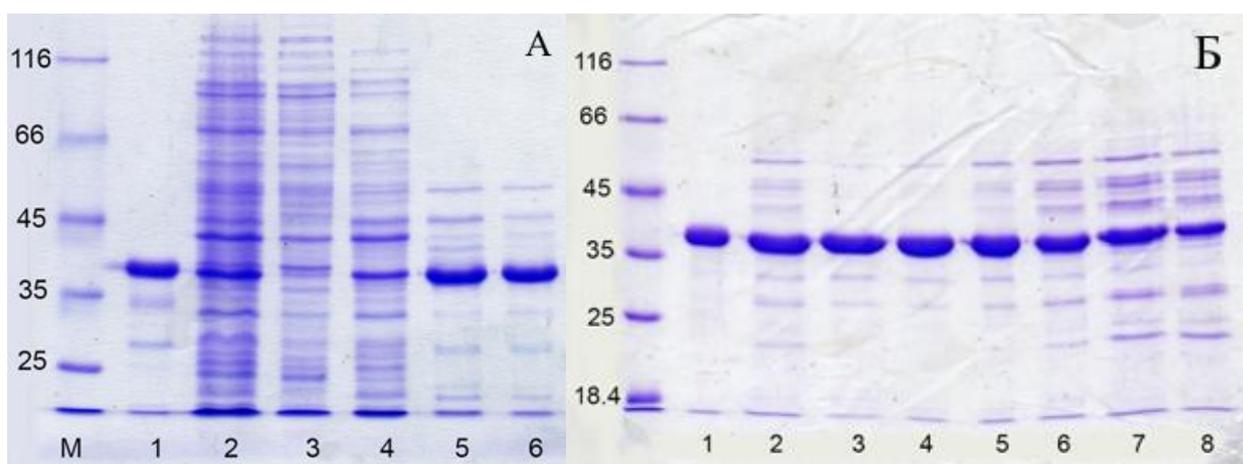


Рис.3 А - Электрофоретический анализ фракций при выделении рекомбинантной ГАФД человека. М – маркеры; 1 – мышечная ГАФД кролика (36 кДа, контроль); 2 – клеточный экстракт; 3 – 5 – фракции 0-50%, 50-70% и 70-80% насыщения сульфатом аммония, соответственно; 6 – осадок после кристаллизации фермента.

Б - Очистка рекомбинантной ГАФД человека на колонке с сефадексом G-100. М – маркеры; 1 – мышечная ГАФД кролика (36 кДа, контроль); 2 – раствор до нанесения на колонку; 3 – 8 – фракции элюции.

Дальнейшую очистку препарата проводили с использованием гель-хроматографии на сефадексе G-100. Как видим, фракции, соответствующие началу и середине пика элюции белка, содержат минимальное количество примесных белков (рис.3Б, дорожки 3 - 5). Фракции 3-5 были высолены сухим сульфатом аммония (0,52 г на 1 мл) с последующим доведением рН до 8,0 10% раствором аммиака. Удельная активность рекомбинантной ГАФД человека при 22°C составила $105-117 \pm 5$ мкмоль NADH / мин*мг белка.

Выделенный препарат ГАФД человека проанализировали масс-спектрометрически и окрасили его моноклональными антителами мыши против мышечной ГАФД кролика (клон 6С5). Активность выделенного фермента превышала удельную активность коммерческих и выделенных другими исследователями препаратов рекомбинантной ГАФД человека в несколько раз, вероятно, благодаря отсутствию тэгов и других дополнительных мотивов.

4. Влияние различных факторов на фибриллизацию альфа-синуклеина

4.1 Анализ тиофлавиновой флуоресценции при фибриллизации различных форм α -синуклеина

Для оценки способности различных форм α -синуклеина к формированию амилоидных структур нами была определена интенсивность флуоресценции ThT в присутствии белковых агрегатов (рис.4). Наиболее сильно флуоресценция ThT возрастает при инкубации очищенного α -синуклеина дикого типа, то есть с остатком тирозина в 136 положении, достигая своего максимума через 63 часа (рис.4, кривая 1). Существенно меньше возрастает флуоресценция ThT при длительной инкубации мономерных (восстановленных 5 мМ ДТТ) и окисленных димерных (без ДТТ) форм мутантного α -синуклеина, содержащего замену Tyr136Cys (кривые 3 и 2, соответственно). Статистически значимых отличий в процессе агрегации мономерной и димерной форм α -синуклеина обнаружено не было. Вероятно, в первые часы инкубации мономера белка происходит окисление восстанавливающего агента ДТТ и формирование димеров. Важно отметить практически полное отсутствие β -складчатых структур в неочищенном препарате α -синуклеина, содержащего белок дикого типа и димерную форму цистеинового мутанта (кривая 4).

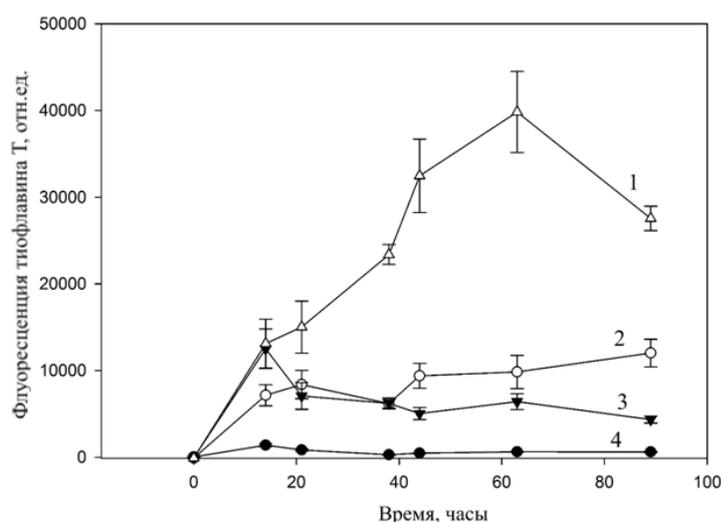


Рис.4 Изменение интенсивности флуоресценции тиофлавина Т в присутствии белковых агрегатов α -синуклеина. Кривая 1 – белок дикого типа Tyr136; 2 – димеры цистеинового мутанта Tyr136Cys; 3 – мономеры цистеинового мутанта Tyr136Cys; 4 – смесь α -синуклеинов дикого типа и мутантной формы Tyr136Cys. Агрегаты были образованы в буфере PBS, pH 4,0 при 37°C и постоянном интенсивном встряхивании. Данные представлены как среднее трех измерений \pm SD.

Табл.1 Изменения в интенсивности светорассеяния и мутности (поглощение при 320 нм) проб α -синуклеина. Пробы инкубировали при 37°C и постоянном интенсивном перемешивании в буфере PBS, pH 4,0 или 10 mM калий-фосфатном буфере, pH 4,0.

Проба α -синуклеина	Интенсивность светорассеяния / мутность (A_{320})			
	До инкубации	PBS, pH 4,0		10 mM калий-фосфатный буфер, pH 4,0
		48 ч инкубации	140 ч инкубации	140 ч инкубации
Смесь Tyr136 и димера Cys136	180 \pm 8 / 0	6000 \pm 700 / 0,370	11000 \pm 900 / 0,375	15000 \pm 1000
Tyr136	93 \pm 4 / 0	7400 \pm 1000 / 0,344	12000 \pm 1000 / 0,420	6800 \pm 140
Мономер Cys136*	325 \pm 25 / 0	9400 \pm 800 / 0,334	12000 \pm 900 / 0,385	6200 \pm 140
Димер Cys136**	117 \pm 4 / 0	9600 \pm 1200 / 0,343	11000 \pm 1700 / 0,358	8700 \pm 300

* - в присутствии 5 mM ДТТ

** - без предварительного восстановления ДТТ.

Очевидно, что присутствие цистеинового мутанта блокирует формирование амилоидных структур, характерных для α -синуклеина дикого типа. Судя по увеличению интенсивности светорассеяния, все формы α -синуклеина склонны образовывать агрегаты в этих условиях (табл.1). Однако, только для агрегатов, сформированных гомогенным α -синуклеином дикого типа, то есть с остатком тирозина в 136 положении, характерно высокое содержание β -складчатых структур, что свидетельствует о возможном образовании амилоидных фибрилл.

Для агрегатов, полученных в условиях низкой ионной силы (без соли, в 10 mM калий-фосфатном буфере, pH 4,0), анализ тиофлавиновой флуоресценции не выявил образования β -складчатых структур.

4.2 Спектроскопия кругового дихроизма агрегатов альфа-синуклеина

Все четыре препарата α -синуклеина обладают сходной неупорядоченной структурой (рис. 5А). Инкубация препаратов в течение 4 суток в буфере PBS, pH 4,0 при 37°C и интенсивном встряхивании приводила к исчезновению или существенному уменьшению содержания неупорядоченных структур. При окислении кислородом воздуха мутантная мономерная форма Tyr136Cys переходит в димер из-за образования дисульфидной связи между цистеиновыми остатками молекул белка. Длительная инкубация димера при кислых значениях pH приводит не только к агрегации, но и к появлению большого количества α -спиральных участков (более 70%) и исчезновению неупорядоченных структур (рис. 5Б). Определенный вклад димеры мутантной формы вносят в спектры КД агрегированного неочищенного препарата α -синуклеина, поскольку при длительной инкубации в них также появляются пики, характерные для α -спиралей.

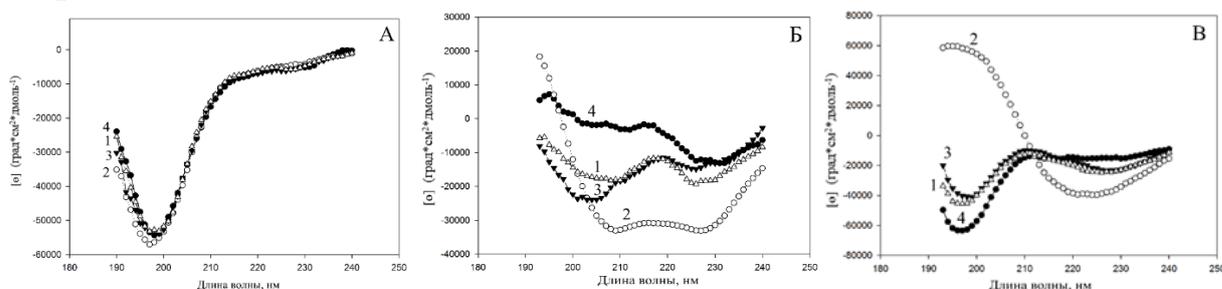


Рис.5 Спектры КД для разных форм α -синуклеина. А: растворимые формы до фибриллизации. Б: спектры агрегатов после фибриллизации в PBS, pH 4,0. В: спектры агрегатов после фибриллизации в 10 mM калий-фосфатном буфере, pH 4,0. Кривая 1 – Tyr136; 2 – димерная форма Cys136; 3 – мономерная форма Cys136; 4 – смесь белка дикого типа Tyr136 и димерной формы мутанта Cys136. Спектры были прописаны в 10 mM калий-фосфатном буфере, pH 4,0.

В случае агрегации препаратов α -синуклеина при низкой ионной силе (10 mM калий-фосфатный буфер, pH 4,0, 37°C, интенсивное встряхивание) было также показано образование агрегатов белка, однако ни в одном случае в полученных агрегатах не было найдено амилоидных структур, выявляемых с помощью тиофлавиновой флуоресценции. В агрегатах, полученных из димерной формы цистеинового мутанта α -синуклеина, полностью исчезают неупорядоченные структуры, и, наряду с α -спиральными участками, появляются β -тяги и β -повороты (рис.5В). Во всех остальных случаях в основном сохраняется неупорядоченная структура α -синуклеина (рис.5В).

Таким образом, только очищенный от других форм α -синуклеин дикого типа склонен к формированию амилоидных структур с высоким содержанием β -складчатых структур и, возможно, фибрилл. Изменение

структуры цистеиновых мутантов α -синуклеина существенно уменьшает эффективность формирования β -складчатых структур, а образование димеров α -синуклеина, соединенных дисульфидными связями, даже приводит к возникновению α -спиральных участков. При этом цистеиновые мутанты сохраняют способность к агрегации.

4.3 Гликирование альфа-синуклеина

Наиболее эффективно проходило гликирование α -синуклеина глицеральдегид-3-фосфатом и метилглиоксалем. Образование значительных количеств ранних продуктов гликирования в обоих случаях происходит уже в первые 5 мин инкубации (рис.6А). Эффективное образование конечных продуктов гликирования при модификации α -синуклеина обоими альдегидами подтверждает и флуоресцентный анализ (рис.6Б). Следует отметить, что интенсивность флуоресценции α -синуклеина, модифицированного метилглиоксалем, выше, чем белка, модифицированного глицеральдегид-3-фосфатом. Это коррелирует с присутствием большего количества ранних продуктов гликирования после модификации белка глицеральдегид-3-фосфатом.

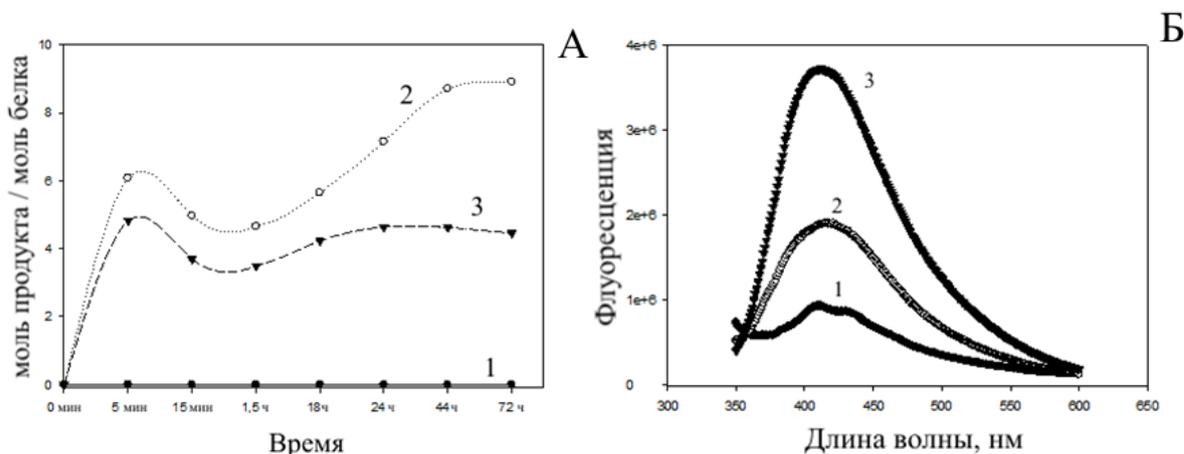


Рис.6 Образование ранних (А) и поздних (Б) продуктов гликирования α -синуклеина при гликировании 1 мМ 3-ФГА или метилглиоксаль. 1 – α -синуклеин без добавок; 2 - α -синуклеин + 1 мМ 3-ФГА; 3 - α -синуклеин + 1 мМ метилглиоксаль.

4.3.1 Анализ тиофлавиновой флуоресценции и мутности раствора при агрегации гликированного альфа-синуклеина

На протяжении всего процесса фибриллизации гликированного α -синуклеина дикого типа отбирали аликвоты и проводили анализ тиофлавиновой флуоресценции (рис.7), а также измеряли поглощение раствора при длине волны 320 нм (мутность раствора), по которой судили о начале и развитии агрегации белка.

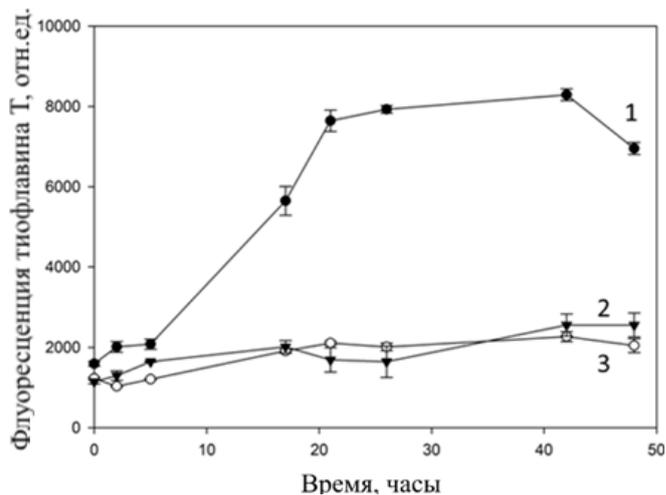


Рис. 7 Флуоресценция тιοφлавина Т при агрегации гликированного α -синуклеина. Агрегаты α -синуклеина без добавок (кривая 1) и агрегаты α -синуклеина, модифицированного 1 мМ 3-ФГА (2) и метилглиоксаля (3). Агрегаты были образованы в буфере PBS, pH 4,0 при 37°C и постоянном интенсивном встряхивании. Данные представлены как среднее трех измерений \pm SD.

Только в случае немодифицированного α -синуклеина наблюдается значительное увеличение флуоресценции ThT, достигающее максимального значения уже через 24 часа инкубации (рис.7). Хотя гликированный α -синуклеин не содержит амилоидных структур, он также склонен к агрегации в этих условиях: мутность растворов при 320 нм и интенсивность светорассеяния, измеренная методом ДЛС, увеличиваются сходным образом во всех трех исследованных препаратах.

4.3.2 Анализ спектров КД гликированного альфа-синуклеина

О предотвращении появления β -складчатых структур при агрегации гликированного α -синуклеина свидетельствуют также спектры КД. Спектры нативного и гликированных α -синуклеинов до агрегации практически не отличаются: во всех трех препаратах преобладают неупорядоченные структуры (рис.8А). Несущественно изменяются спектры гликированного α -синуклеина после проведения агрегации при pH 4,0: преобладающим типом структуры остается неупорядоченная. Однако фибриллизация нативного α -синуклеина приводит к значительному увеличению содержания β -структурных элементов (рис.8Б).

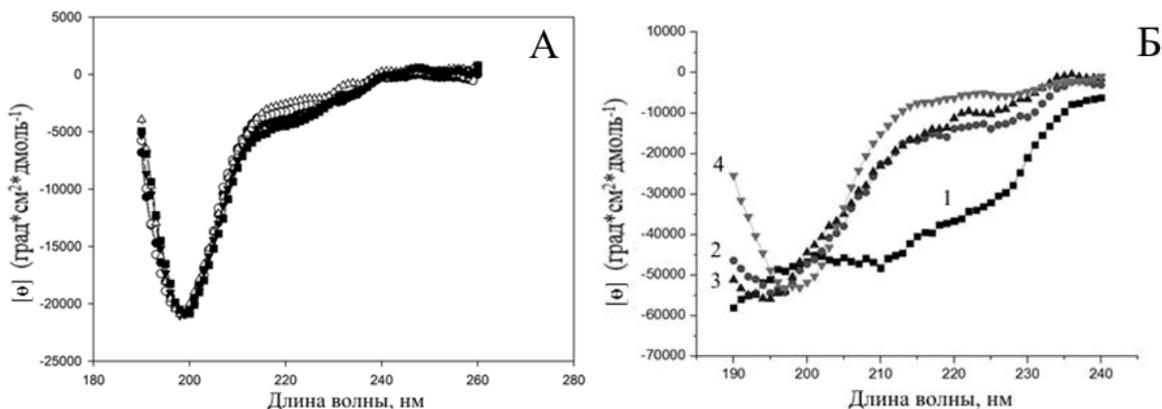


Рис. 8 Спектры КД гликированного α -синуклеина до (А) и после (Б) фибриллизации. 1 – α -синуклеин без добавок; 2 – α -синуклеин + 1 мМ 3-ФГА; 3 – α -синуклеин + 1 мМ метилглиоксаля; 4 – α -синуклеин до фибриллизации. Спектры были прописаны в 10 мМ калий-фосфатном буфере, pH 4,0.

Таким образом, было показано, что амилоидная трансформация α -синуклеина полностью предотвращается не только метилглиоксалем, но и промежуточным продуктом гликолиза – глицеральдегид-3-фосфатом, однако процесс агрегации происходит во всех трех случаях, независимо от наличия или отсутствия модификации белка.

4.3.3 Анализ агрегатов гликированного альфа-синуклеина методом электронной микроскопии

Структура агрегатов исходного и гликированного α -синуклеина, образующихся в условиях, стимулирующих фибриллизацию, была также исследована методом трансмиссионной электронной микроскопии (рис. 9). В препаратах нативного и гликированного α -синуклеина до начала фибриллизации отсутствовали какие-либо агрегаты.

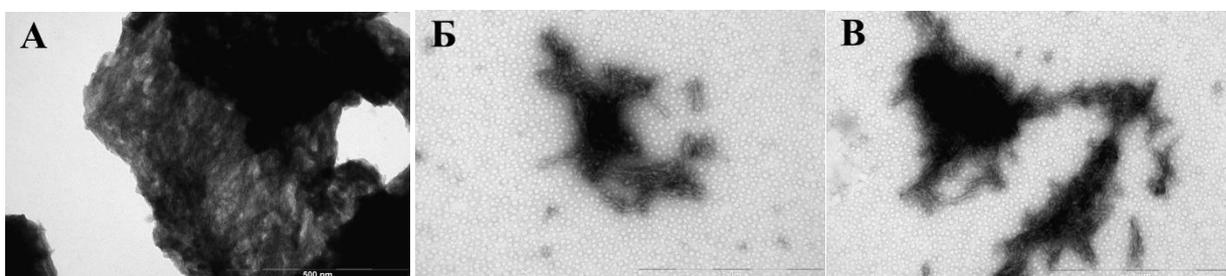


Рис. 9 Электронная микроскопия агрегатов α -синуклеина без добавок (А); α -синуклеина, модифицированного 1 мМ 3-ФГА (Б) или 1 мМ метилглиоксаля (В), через 2 суток после инициации фибриллизации.

После проведения фибриллизации в течение двух суток в препаратах α -синуклеина без модификаций образуются крупные агрегаты, представляющие собой плотно упакованные фибриллы (рис. 9А). Принципиально иная картина наблюдается для гликированного альдегидами α -синуклеина. В этом случае инициация фибриллизации приводит к образованию коротких «фибрилл» (средняя длина 170-230 нм), которые могут образовывать маленькие и менее плотные агрегаты (рис. 9 Б и В). Таким образом, гликирование α -синуклеина альдегидами, в том числе и промежуточным метаболитом гликолиза, глицеральдегид-3-фосфатом, препятствует образованию полноценных амилоидных фибрилл этого белка.

4.4 Изучение взаимодействия ГАФД и альфа-синуклеина

4.4.1 Определение связывания ГАФД и альфа-синуклеина методом твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA)

Взаимодействие рекомбинантной ГАФД человека с α -синуклеином было исследовано и подтверждено методом твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA).

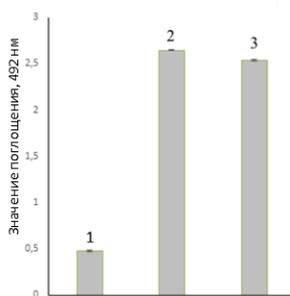


Рис. 10 Идентификация комплексов ГАФД человека с α -синуклеином методом ELISA. На микропланшет сорбировали ГАФД человека (1 и 3) или α -синуклеин (2). После отмывания буфером PBST в лунки 1 и 2 вносили соответствующий объем буфера PBS, pH 7,4, а в лунку 3 - раствор α -синуклеина. После отмывания PBST лунки окрашивали антисывороткой к α -синуклеину.

Было показано, что α -синуклеин взаимодействует с ГАФД (столбец 3). Возможно, однако, в процессе взаимодействия с планшетом ГАФД могла частично денатурировать, поэтому следующим шагом стало изучение взаимодействия ГАФД человека и α -синуклеина методом иммунопреципитации.

4.4.2 Определение связывания методом иммунопреципитации

Взаимодействие ГАФД человека и α -синуклеина было исследовано методом иммунопреципитации с использованием сефарозы с иммобилизованным белком G. ГАФД и α -синуклеин инкубировали в молярном соотношении 1:4 (в расчете на тетрамер фермента) (рис. 11).

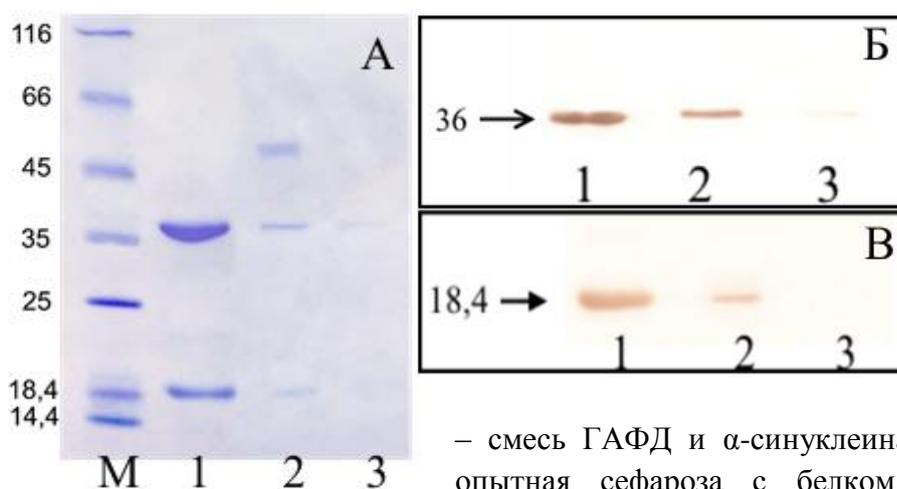


Рис. 11 Идентификация комплексов ГАФД человека с α -синуклеином методом иммунопреципитации.

А - Электрофоретический анализ проб, полученных в ходе иммунопреципитации ГАФД человека и α -синуклеина. М - маркеры; 1 - смесь ГАФД и α -синуклеина (в качестве маркеров); 2 - опытная сефароза с белком G и иммобилизованными антителами к α -синуклеину после инкубации с раствором, содержащим ГАФД человека и α -синуклеин в молярном соотношении 1:4 на тетрамер; 3 - контрольная сефароза без антител после инкубации с раствором, содержащим смесь белков. **Б** - окрашивание антителами 6C5 против ГАФД. **В** - окрашивание антисывороткой против α -синуклеина.

В осажденном комплексе белков присутствуют три полипептидные цепи, соответствующие по молекулярной массе α -синуклеину (18 кДа), ГАФД человека (36 кДа) и тяжелой цепи антител (50 кДа) (рис.11А, дорожка 2). Присутствие в выделенном комплексе α -синуклеина и ГАФД было подтверждено также с помощью иммуноблоттинга с использованием соответствующих специфических антитела (рис. 11 Б и В). Таким образом, методом иммунопреципитации также было показано взаимодействие рекомбинантной ГАФД человека и α -синуклеина.

4.4.3 Инактивация ГАФД в присутствии альфа-синуклеина

Было показано, что добавление 10-кратного и даже 40-кратного избытка α -синуклеина (в расчете на тетрамер ГАФД) вызывает лишь незначительное снижение активности свежевыделенного фермента (удельная активность 106 ± 4 мкмоль NADH/мин*мг, рис. 12А, кривые 2, 3), тогда как при добавлении α -синуклеина к препаратам ГАФД человека со сниженной из-за окисления сульфгидрильных групп активного центра активностью (44 ± 6 мкмоль NADH/мин*мг) происходила довольно быстрая инактивация фермента (рис.12Б). Причем увеличение количества α -синуклеина в пробе повышает степень инактивации дегидрогеназы: при 10-кратном избытке α -синуклеина на тетрамер инактивация проходит на 30% по сравнению с контролем, а при 40-кратном избытке α -синуклеина на тетрамер – на 70% (рис.12Б).

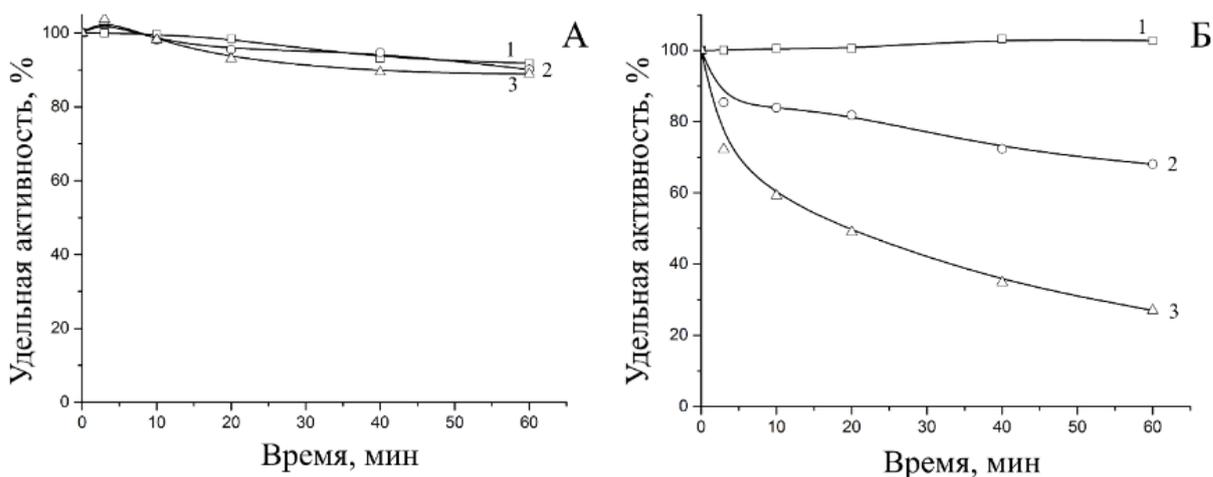


Рис. 12 Кинетика инактивации ГАФД человека в присутствии α -синуклеина. **А** (свежевыделенный препарат, активность 106 ± 4 мкмоль NADH/мин*мг) и **Б** (частично окисленный препарат, активность 44 ± 6 мкмоль NADH/мин*мг). ГАФД человека без добавок (1), в присутствии 10-кратного (2) или 40-кратного (3) избытка α -синуклеина на тетрамер.

4.4.4 Влияние окисления сульфгидрильных групп на инактивацию ГАФД в присутствии альфа-синуклеина

Через 1 час инкубации в присутствии 10-кратного избытка α -синуклеина на тетрамер фермента активность ГАФД с частично окисленными цистеиновыми остатками активных центров снижается на 32 и 65% от исходных значений, соответственно (рис. 13, столбцы 2). Предварительная инкубация препаратов окисленной ГАФД с 5 мМ ДТТ приводит не только к частичному восстановлению активности фермента (столбцы 3), но и к значительному уменьшению его чувствительности к инактивирующему воздействию α -синуклеина (столбцы 4).

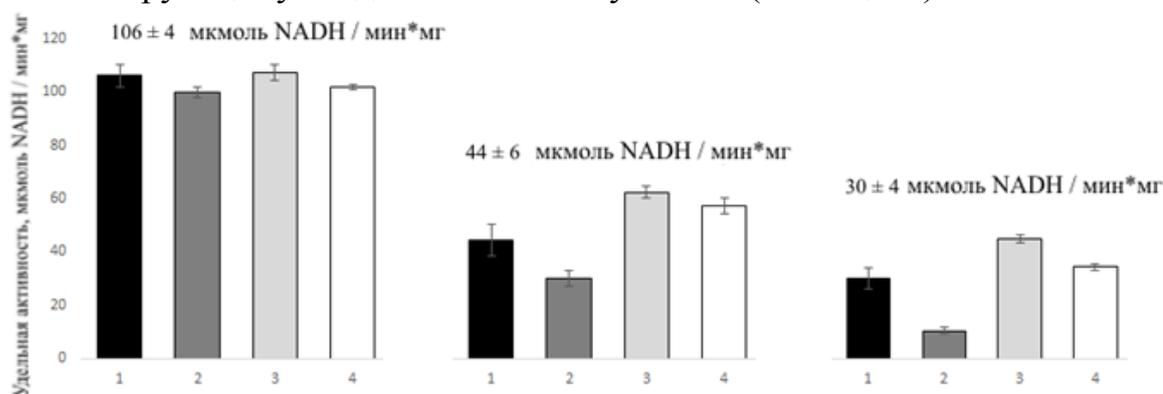


Рис.13 Влияние окисления сульфгидрильных групп ГАФД человека на инактивацию в присутствии α -синуклеина. ГАФД человека без добавок (столбец 1) или в присутствии 10-кратного избытка α -синуклеина на тетрамер (столбец 2). ГАФД человека после восстановления 5 мМ ДТТ без добавок (столбец 3) или в присутствии 40-кратного избытка α -синуклеина на тетрамер (столбец 4). Через 1 час инкубации из проб отбирали аликвоты и измеряли удельную активность дегидрогеназы. Данные представлены как среднее трех измерений \pm SD.

Таким образом, можно сделать вывод, что ГАФД с восстановленными тиольными группами цистеина активного центра устойчива к инактивации α -синуклеином (даже при 40-кратном избытке последнего на тетрамер).

4.4.5 Влияние кофактора NAD^+ , ионной силы буфера и концентрации белка на инактивацию ГАФД в присутствии альфа-синуклеина

Добавление избытка NAD^+ к ГАФД, инактивирующейся при добавлении α -синуклеина, частично предотвращает снижение активности фермента (рис. 14А). Увеличение ионной силы растворов, в которых происходило изучение взаимодействия α -синуклеина и ГАФД, хотя и снижает эффективность инактивации, но не предотвращает ее полностью (рис.14Б). Аналогичный эффект наблюдался при более чем 4-кратном увеличении концентрации ГАФД человека (увеличение концентрации с

0,7 мкМ до 3 мкМ): чувствительность фермента к инактивирующему воздействию α -синуклеина снижается (рис.14В).

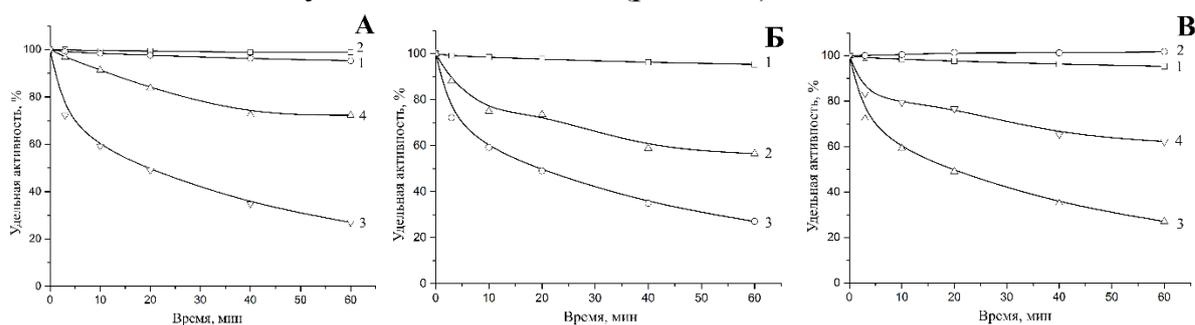


Рис. 14 Влияние NAD^+ (А), ионной силы (Б) и концентрации белка (В) на инактивацию ГАФД человека в присутствии α -синуклеина.

А – ГАФД человека без добавок (1); в присутствии 0,5 мМ NAD^+ (2); в присутствии 40-кратного избытка α -синуклеина на тетрамер без NAD^+ (3); в присутствии 0,5 мМ NAD^+ и 40-кратного избытка α -синуклеина на тетрамер (4). Б – ГАФД человека без добавок (1); в присутствии 40-кратного избытка α -синуклеина (на тетрамер) (3) или в присутствии 40-кратного избытка α -синуклеина и 0,2 М NaCl (2). В – 0,7 мкМ ГАФД человека без добавок (1); 3 мкМ ГАФД без добавок (2); 0,7 мкМ ГАФД в присутствии 28 мкМ α -синуклеина (3); 3 мкМ ГАФД в присутствии 120 мкМ α -синуклеина (4). Соотношение 1:40 на тетрамер.

Таким образом, причиной инактивации фермента при добавлении α -синуклеина является взаимодействие двух белков. Следствием такого взаимодействия может быть образование комплекса тетрамера ГАФД и α -синуклеина, индукция диссоциации фермента на неактивные димеры и мономеры или образование неактивных агрегатов. Оценка возможности образования указанных форм и комплексов была проведена с помощью методов седиментационного анализа и динамического лазерного светорассеяния (ДЛС).

4.4.6 Изучение комплексов ГАФД и альфа-синуклеина методом аналитического ультрацентрифугирования

Для рекомбинантной ГАФД человека коэффициент седиментации пика фермента составил 9,9 S. После 30-минутной инкубации фермента в присутствии 10-кратного избытка α -синуклеина (в расчете на тетрамер) при ультрацентрифугировании препарата был обнаружен только один пик с коэффициентом седиментации 9,1 S, а соответствующий α -синуклеину пик (1,7 S) исчезал.

Очевидно, образование комплекса тетрамера ГАФД (144 кДа) с одной или несколькими молекулами α -синуклеина (14,46 кДа) приводит к некоторому увеличению молекулярной массы, что должно было бы увеличить коэффициент седиментации. Однако присоединение частично неупорядоченных молекул α -синуклеина к глобулярной молекуле тетрамера

ГАФД, вероятно, приводит к изменению формы комплекса, увеличению асимметрии, повышению фрикционного отношения и, как следствие, понижению коэффициента седиментации. Таким образом, полученные данные указывают на возможность образования комплекса тетрамерных молекул ГАФД и α -синуклеина. Следует также отметить, что ни димерных, ни мономерных форм ГАФД, а также их комплексов с α -синуклеином не было обнаружено.

4.4.7 Изучение комплексов ГАФД и альфа-синуклеина методом динамического лазерного светорассеяния (ДЛС)

При добавлении к ГАФД человека 40-кратного избытка α -синуклеина гидродинамический диаметр частиц немного возрастает: от $7,1 \pm 1,6$ нм для исходного фермента до $8,9 \pm 1,6$ нм для комплекса. Эти наблюдения хорошо соответствуют данным седиментационного анализа, свидетельствующим об уменьшении коэффициента седиментации комплекса, вероятно, вследствие увеличения его гидродинамического радиуса, по сравнению с исходным тетрамером ГАФД. В исследованных препаратах не было обнаружено частиц, соответствующих димерным или мономерным формам ГАФД.

4.4.8 Термостабильность и термоагрегация комплексов ГАФД с альфа-синуклеином

Эксперименты для определения термостабильности (ДСК) были проведены на препарате соматической ГАФД кролика, поскольку метод требует больших количеств белка. Предварительно было показано, что α -синуклеин оказывает на ГАФД кролика такое же инактивирующее воздействие, как и на ГАФД человека. Добавление α -синуклеина к ГАФД в соотношении 4:1 в расчете на тетрамер приводит к существенному изменению T_m , а именно, сдвигу в сторону более низких температур на $4,1^\circ\text{C}$ (рис.15).

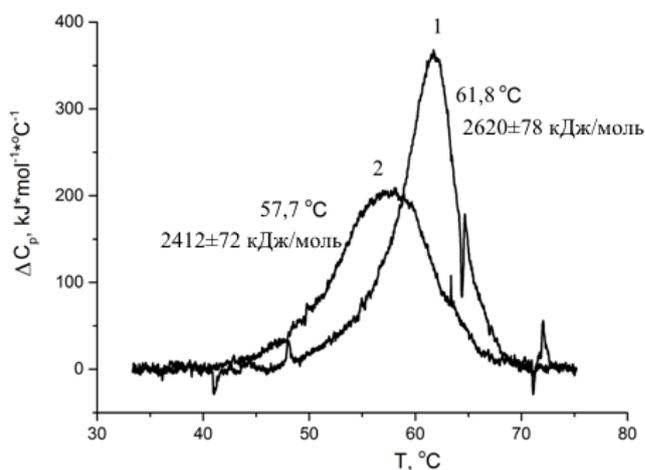


Рис.15 Кривые теплоглощения соматической ГАФД кролика и комплекса ГАФД с α -синуклеином, полученные методом ДСК. Кривые теплоглощения ГАФД кролика (1) и ГАФД кролика после инкубации с α -синуклеином (молярное соотношение ГАФД / α -синуклеин 1:4 на тетрамер) (2).

Эти данные свидетельствуют о значительной дестабилизации фермента при присоединении к нему α -синуклеина.

О снижении термостабильности комплексов ГАФД человека с α -синуклеином свидетельствуют также данные по их термоагрегации, полученные с помощью ДЛС (рис.16). Было показано, что в смеси ГАФД человека и α -синуклеина агрегация начинается примерно на 4 градуса раньше, чем в контрольной пробе ГАФД человека.

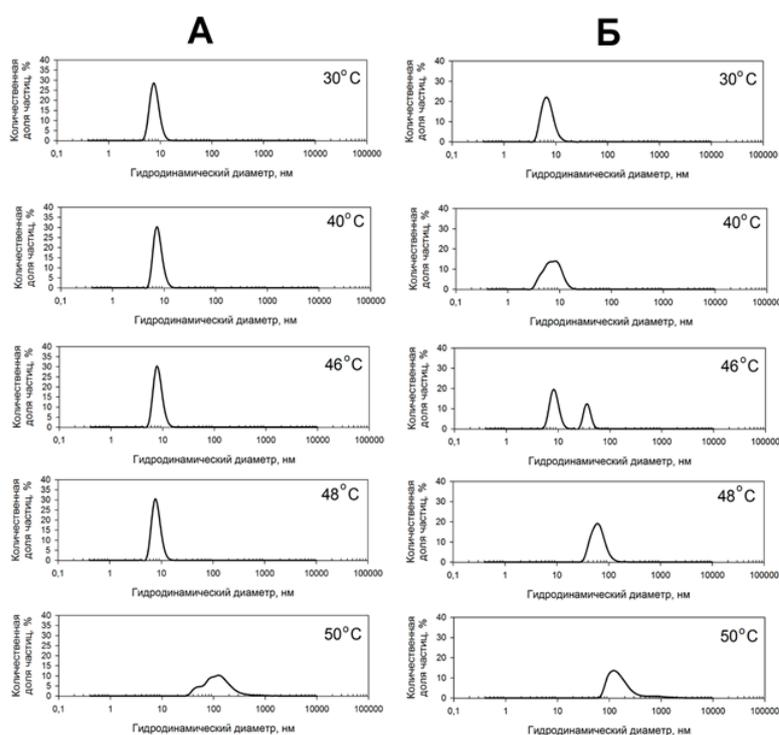


Рис. 16 Изменение распределения по числу частиц ГАФД человека и ее комплексов с α -синуклеином при постепенном нагревании. Распределение по числу частиц в растворе ГАФД человека (1,4 мкМ) (А) и в смеси ГАФД (1,4 мкМ) + α -синуклеин (56 мкМ) (молярное соотношение ГАФД / α -синуклеин 1:40 на тетрамер) (Б) при постепенном нагревании образцов от 30 до 70°C со скоростью 0,5°C/мин. Каждое измерение является средним из трех измерений с интервалом в 15 сек.

Таким образом, можно сделать вывод, что взаимодействие с α -синуклеином снижает температуру тепловой агрегации ГАФД человека и способствует образованию более крупных агрегатов. Эти результаты полностью соответствуют данным, полученным методом ДСК.

4.4.9 Влияние ГАФД на фибриллизацию альфа-синуклеина

Образование комплексов α -синуклеина с ГАФД человека не только вызывает инактивацию, дестабилизацию и агрегацию фермента, но и может влиять на формирование агрегатов самого α -синуклеина. Было показано, что мутность растворов в обоих образцах нарастала во времени сходным образом, однако флуоресценция тиофлавина Т увеличивалась только в пробе без ГАФД (рис.17).

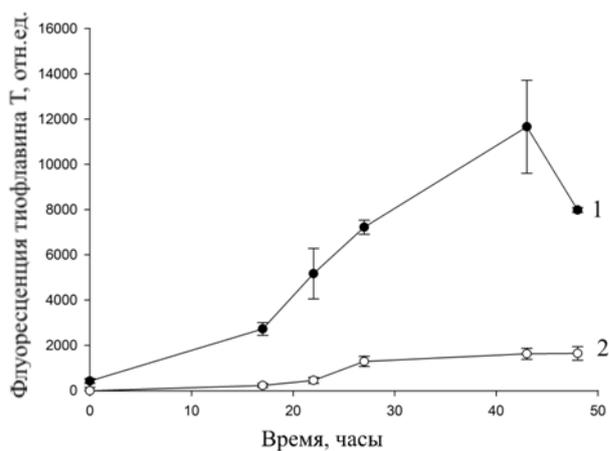


Рис.17 Влияние рекомбинантной ГАФД человека на формирование амилоидных структур при фибриллизации α -синуклеина. Тиофлавиновая флуоресценция образуемых фибрилл α -синуклеина (кривая 1) и смеси α -синуклеина и ГАФД человека в молярном соотношении 4:1 на тетрамер (кривая 2). Агрегаты были образованы в буфере PBS, pH 4,0 при 37°C и постоянном интенсивном встряхивании.

Данные представлены как среднее трех измерений \pm SD.

Таким образом, добавление ГАФД человека не предотвращает агрегацию α -синуклеина, но подавляет образование амилоидных структур.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе была изучена амилоидная агрегация разных форм α -синуклеина, а также влияние замены Tyr136Cys на амилоидную трансформацию белка. Показано, что при окислении кислородом воздуха мутантная форма белка склонна к формированию димеров за счет образования дисульфидной связи. Димерные формы мутантного α -синуклеина не подвергаются амилоидной трансформации и предотвращают амилоидную трансформацию α -синуклеина дикого типа.

Показано, что амилоидная трансформация α -синуклеина полностью предотвращается не только метилглиоксалем, но и промежуточным метаболитом гликолиза, глицеральдегид-3-фосфатом.

Различными методами биоинженерии исследовано взаимодействие между рекомбинантной соматической ГАФД человека и α -синуклеином, которое может играть определенную роль в возникновении и развитии синуклеинопатий. Для этой цели разработан метод очистки рекомбинантной соматической ГАФД человека без дополнительных тэгов из бактериальных клеток, позволяющий выделить чистый препарат с высокой удельной активностью. Дальнейшее выяснение особенностей взаимодействия ГАФД и α -синуклеина, показанного в данной работе, будет полезным не только для понимания механизмов возникновения синуклеинопатий, но и для поиска соединений, регулирующих эти взаимодействия и обладающих терапевтическим действием.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

1. Обнаружено, что при экспрессии α -синуклеина в клетках *E. coli* до 50% белка синтезируется в виде мутантных форм с заменой Tyr136Cys, склонных к формированию димеров, соединенных дисульфидной связью.
2. Показано, что димерные формы мутантного α -синуклеина с заменой Tyr136Cys не подвергаются амилоидной трансформации и предотвращают амилоидную трансформацию α -синуклеина дикого типа.
3. Установлено, что гликирование метилглиоксалем или глицеральдегид-3-фосфатом не препятствует агрегации α -синуклеина, но предотвращает его амилоидную трансформацию.
4. Различными методами доказано взаимодействие α -синуклеина и глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы.
5. Показано, что связывание α -синуклеина с глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназой с частично окисленными сульфгидрильными группами активного центра приводит к инактивации фермента.
6. Инактивация глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы при взаимодействии с α -синуклеином наблюдается при физиологических значениях ионной силы. При этом добавление кофактора фермента - NAD^+ - снижает степень ингибирования фермента α -синуклеином, а частичное окисление SH-групп активного центра стимулирует инактивацию.
7. Взаимодействие глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы с α -синуклеином дестабилизирует фермент, но не вызывает ни агрегации, ни диссоциации его на субъединицы.
8. Добавление рекомбинантной глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы не предотвращает агрегацию α -синуклеина, но подавляет его амилоидную трансформацию.
9. Взаимодействие глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы с α -синуклеином, впервые обнаруженное в нашей работе, может участвовать как в ингибировании гликолиза, так и в амилоидогенной трансформации α -синуклеина при различных синуклеинопатиях.

РАБОТЫ, ОПУБЛИКОВАННЫЕ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

- 1) В.И. Муронец, А.К. Мельникова, З.Н. Сефербекова, **К.В. Баринова**, Е.В. Шмальгаузен (2017) Гликирование, гликолиз и нейродегенеративные заболевания: есть ли взаимосвязь? *Биохимия*, **82** (8): 1138 – 1153.
- 2) **Barinova KV**, Eldarov MA, Khomyakova EV, Muronetz VI, Schmalhausen EV (2017) Isolation of recombinant human untagged glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from E.coli producer strain. *Protein Expr Purif.* **137**, 1-6.
- 3) **Barinova K.V.**, Khomyakova E.V., Kuravsky M.L., Schmalhausen E.V., Muronetz V.I. (2017) Denaturing Action of Adjuvant Affects Specificity of Polyclonal Antibodies. *Biochem Biophys Res Commun.* **482**(4):1265-1270.
- 4) **Barinova K.V.**, Kuravsky M.L., Arutyunyan A.M., Serebryakova M.V., Schmalhausen E.V., Muronetz V.I. (2017) Dimerization of Tyr136Cys alphasynuclein prevents amyloid transformation of wild type alpha-synuclein. *Int J Biol Macromol.* **96**:35-43.
- 5) Muronetz VI, **Barinova KV**, Stroylova YY, Semenyuk PI, Schmalhausen EV. (2017) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: Aggregation mechanisms and impact on amyloid neurodegenerative diseases. *Int J Biol Macromol.* **100**, 55-66.

Тезисы конференций и статьи в сборниках:

- 1) **Kseniya Barinova**, Elena Schmalhausen, Vladimir Muronetz. Influence of glycation of alpha-synuclein on its amyloid transformation (2017) International Conference "Biocatalysis-2017: Fundamentals and Applications".
- 2) Мельникова А.К., **Баринова К.В.** Точечный мутант альфа-синуклеина по 136 аминокислоте с заменой кодона тирозина ТАС на ТАТ позволяет получить гомогенный препарат белка дикого типа (2017) XXIV Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2017». Секция "Биоинженерия и биоинформатика".
- 3) **Баринова К.В.**, Шмальгаузен Е.В., Муронец В.И. Применение антител для изучения взаимодействия альфа-синуклеина с белками-партнерами (2016) V Съезд физиологов СНГ, V Съезд Биохимиков России.
- 4) **Barinova K.V.**, Schmalhausen E.V. Influence of dimerization and glycation of alpha-synuclein on amyloid transformation (2016) Biomembranes 2016.

- 5) **Баринаова К.В.**, Муронец В.И. Implication of cross-linked synuclein for the design of antiparkinson antibodies (2015) International Conference "Biocatalysis-2015: Fundamentals and Applications".