

**«АКТИВАТОРЫ СИСТЕМЫ  
ШАПЕРОНОВ КАК СРЕДСТВА  
ПРОФИЛАКТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ  
НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ  
ЗАБОЛЕВАНИЙ АМИЛОИДНОЙ  
ПРИРОДЫ**

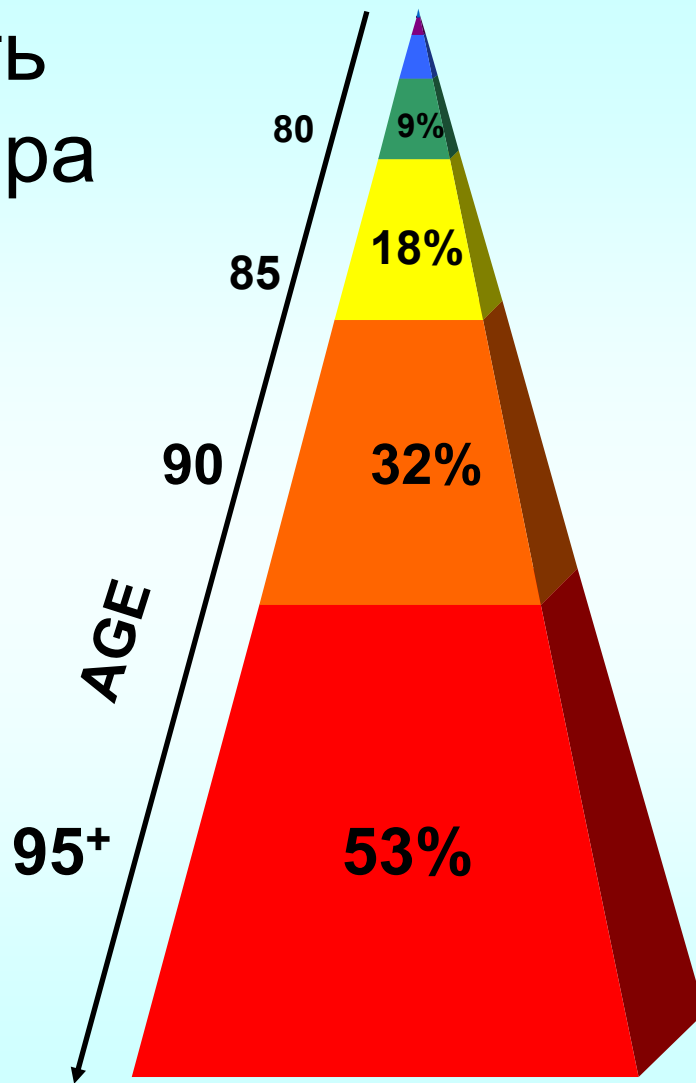
*Владимир Муронец*

*Факультет биоинженерии и биоинформатики и  
НИИ Физико-химической биологии им. А.Н.Белозерского,  
Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова*

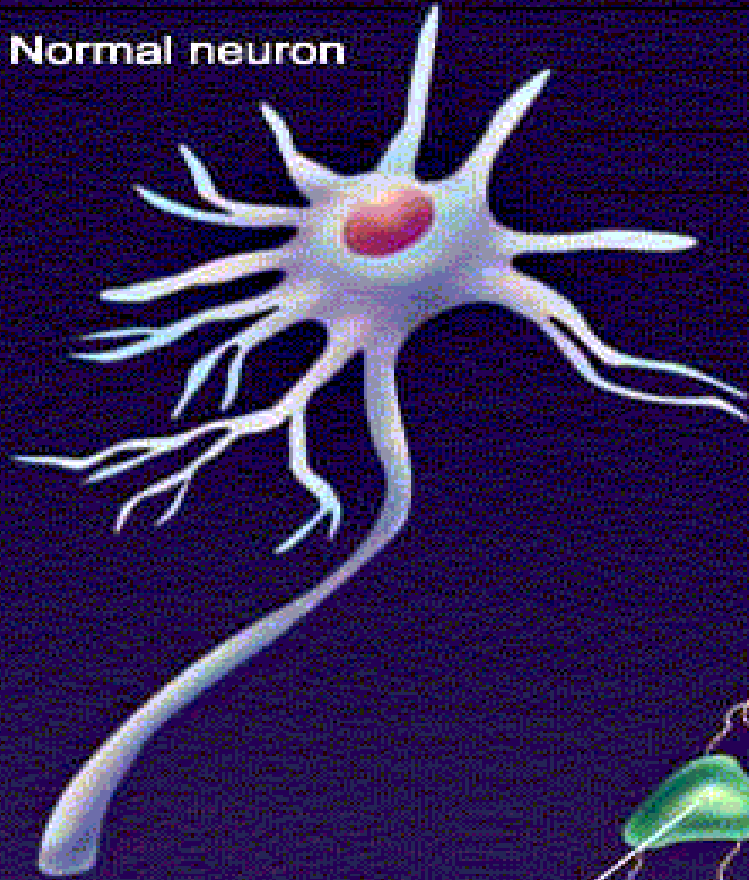
<i>Белки</i>	<i>Конформационные болезни</i>
<b>β-амилоид, APP, PS-1, PS-2, убиквитин</b>	Болезнь Альцгеймера; синдром Дауна; семейная болезнь Альцгеймера, вызванная дефектом протеолиза предшественника β-амилоида и мутациями в генах пресенилинов -1 и -2
<b>Прионные инфекции – прионы, PrP<sup>C</sup></b>	Трансмиссионная губчатая энцефалопатия («коровье бешенство»), болезнь Крейтцфельда-Якоба, синдром Гертсмманна-Штреусслера-Шейнкера, семейная смертельная бессонница, куру
<b>PrP</b>	Наследственные формы Болезни Крейтцфельда-Якоба, синдром Гертсмманна-Штреусслера-Шейнкера, семейная смертельная бессонница и другие заболевания, вызываемые прионами
<b>α-Синуклеин</b>	Болезнь Паркинсона
Гемоглобин	Серповидноклеточная анемия; нестабильный гемолиз, связанный с присутствием телец включения эритроцитах; гемолиз, индуцированный лекарственными препаратами
Серпины	Дефицит α <sub>1</sub> -антитрипсина; эмфизема легких; циррозы; антитромбиновый дефицит; тромбоземблическая болезнь; сосудистый отек, связанный с дефицитом C <sub>1</sub> -ингибитора
Глутаминовые повторы	Врожденные нейродегенеративные заболевания; болезнь Хантингтона; спинocereбральная атаксия; атрофия субстанции Рубро; атрофия Мачадо-Джозефа
Легкие цепи иммуноглобулина	Системный AL амилоидоз
Сывороточный амилоидный протеин А	Реактивный системный AA амилоидоз, хроническая болезнь воспаления
Транстретин	Сенильный системный амилоидоз, семейная амилоидная нейропатия, семейный кардиальный амилоидоз
β-микроглобулин	Гемодиализный амилоидоз, амилоидоз простаты
Аполипопротеин АI	Семейная амилоидная полинейропатия, семейный висцеральный амилоидоз
Цистатин С	Врожденная исландская церебральная ангиопатия
Лизоцим	Семейный висцеральный амилоидоз
Амилин	Диабет II типа

# Распространенность болезни Альцгеймера

<u>AGE</u>	<u>%</u>
65	1
70	2
75	5
80	9
85	18
90	32
95+	53

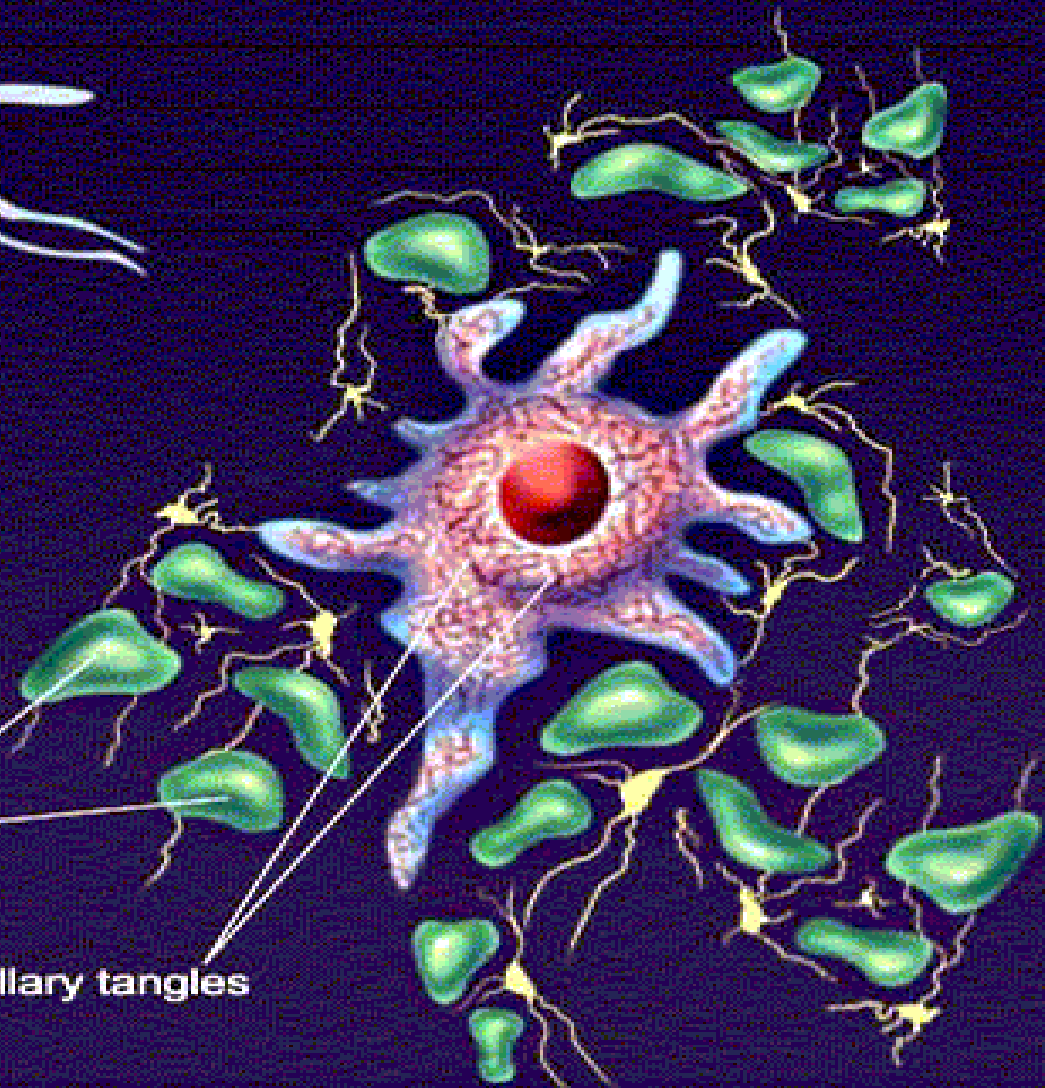


Normal neuron

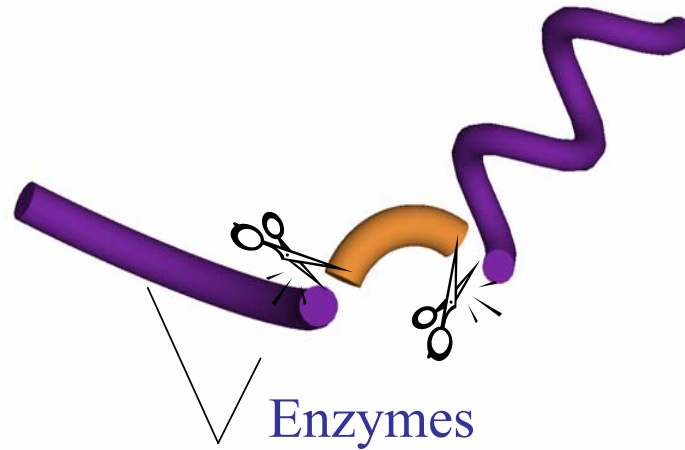


Beta amyloid plaques

Neurofibrillary tangles

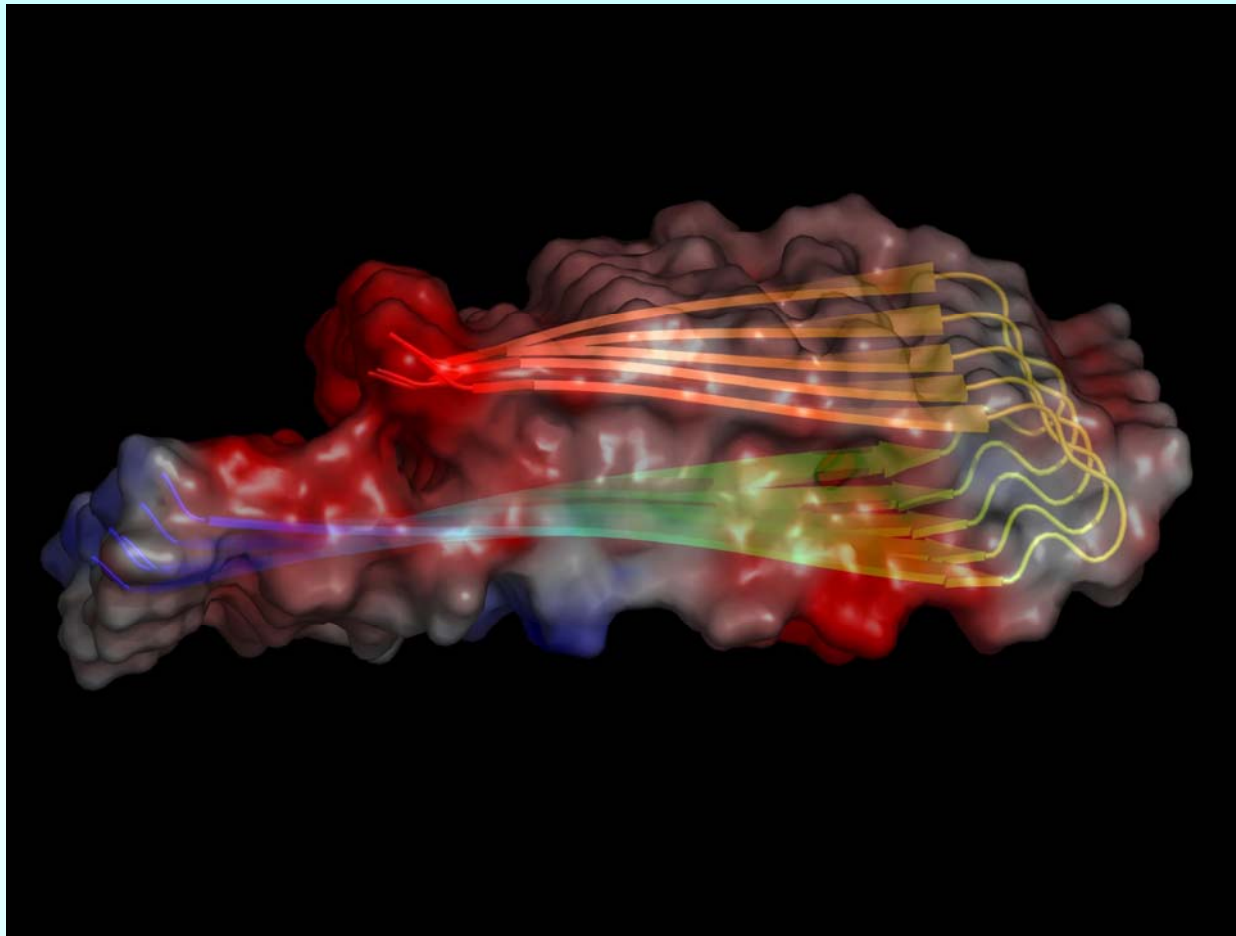


## Белок-предшественник $\beta$ -амилоида и болезнь Альцгеймера



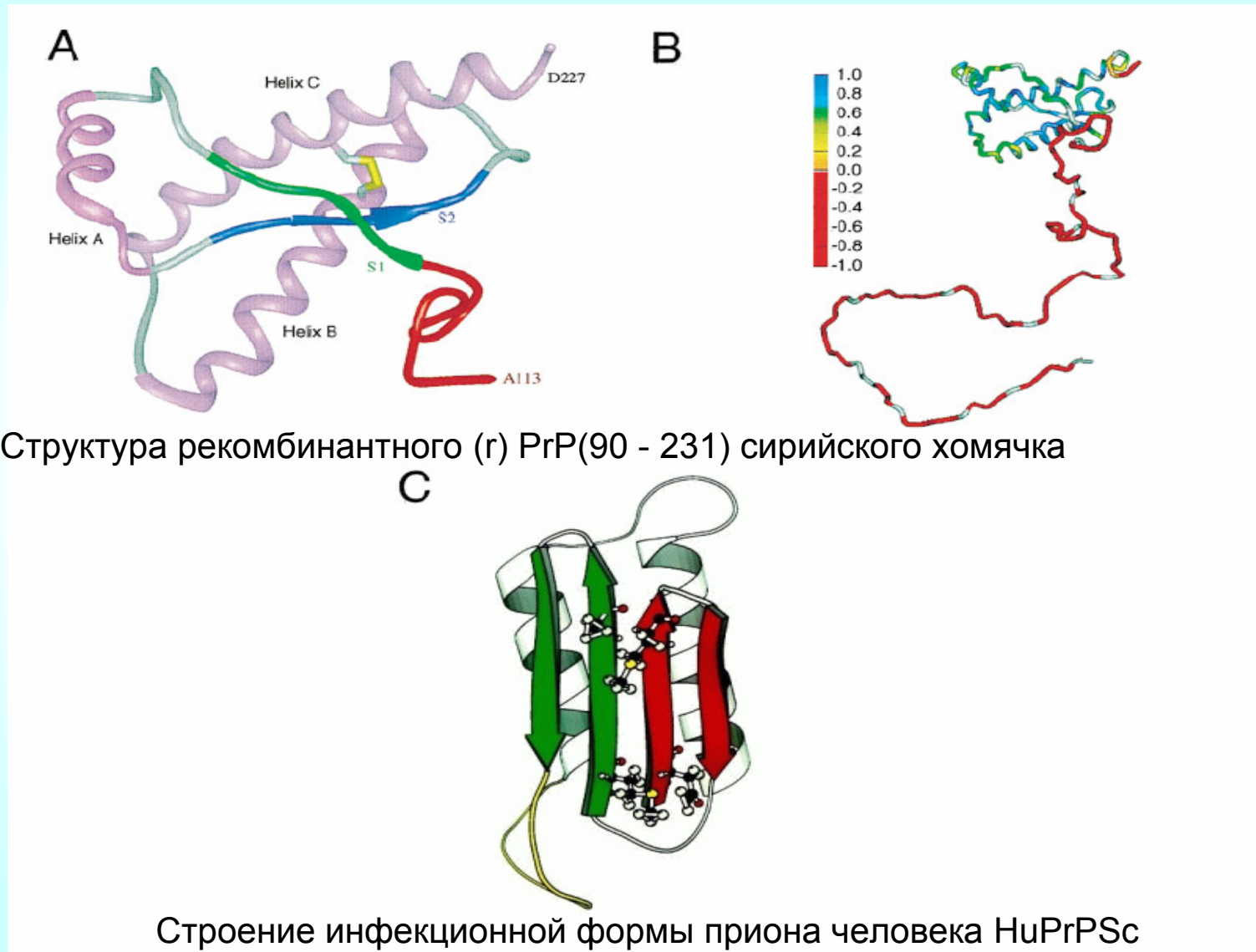
$\beta$ - Amyloid plaque



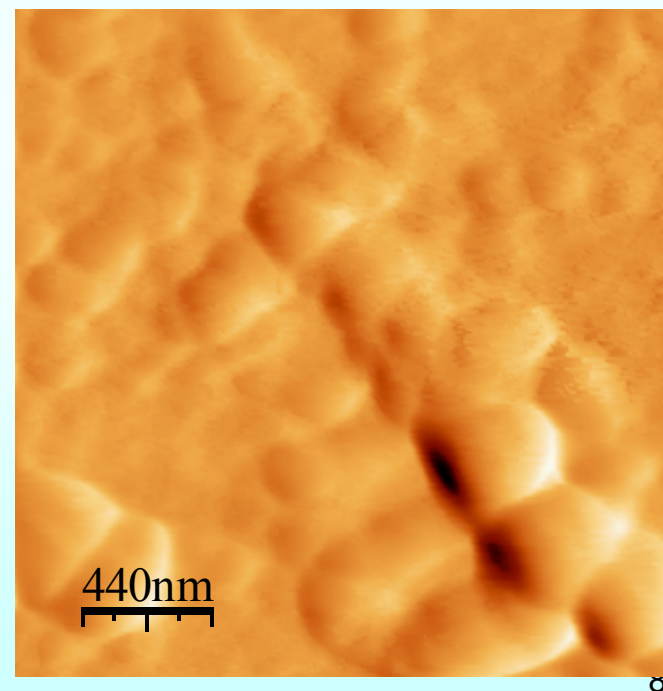
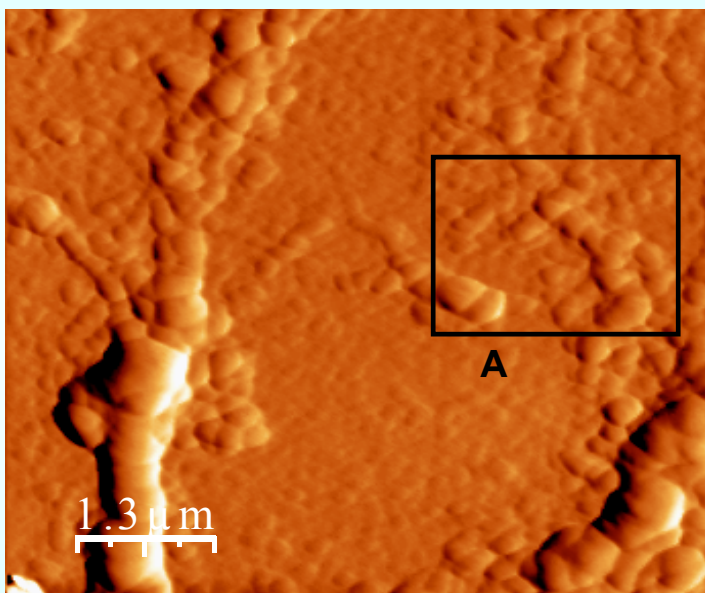


$\beta$ -амилоид

# Структуры прионных белков



# Образование амилоидных фибрилл при нагревании рекомбинантных овечьих прионов

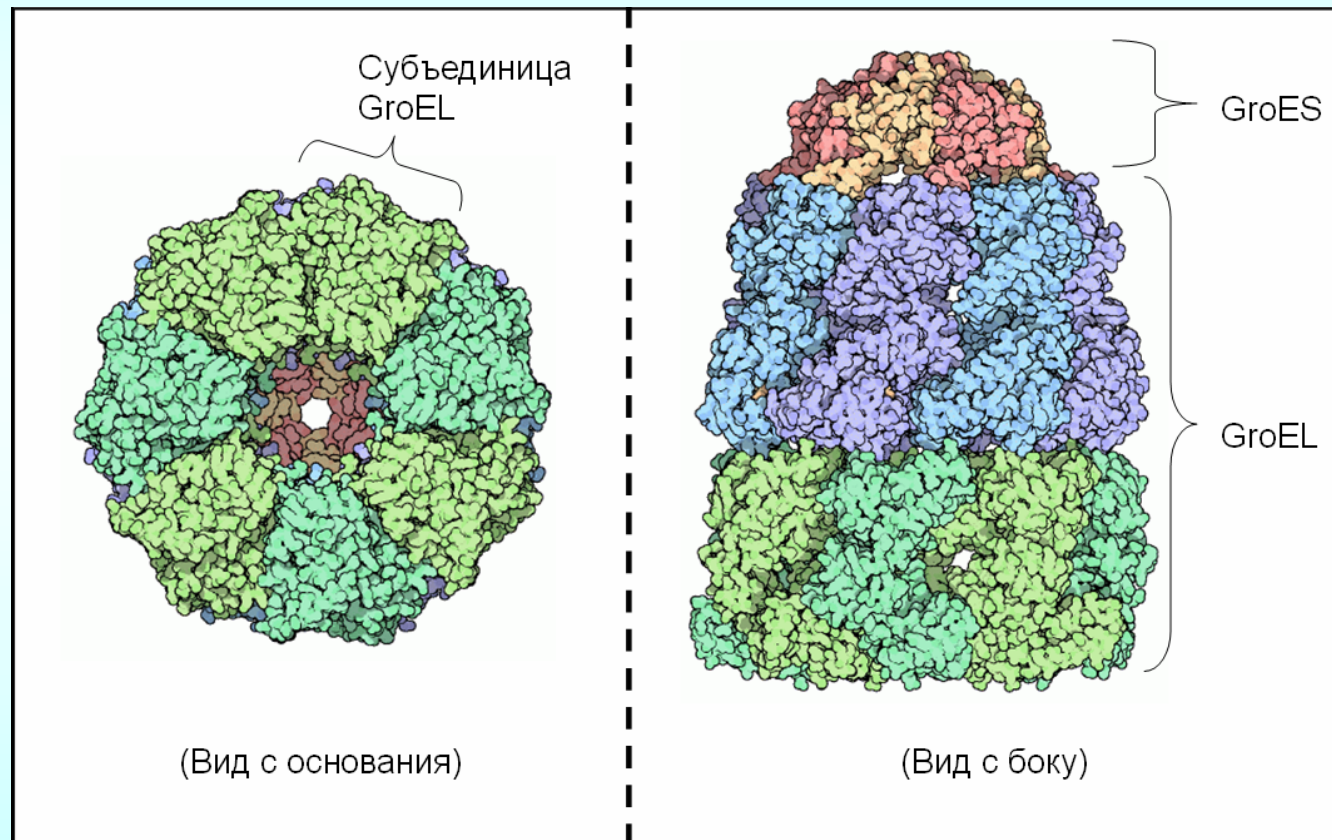


атомно-силовая микроскопия

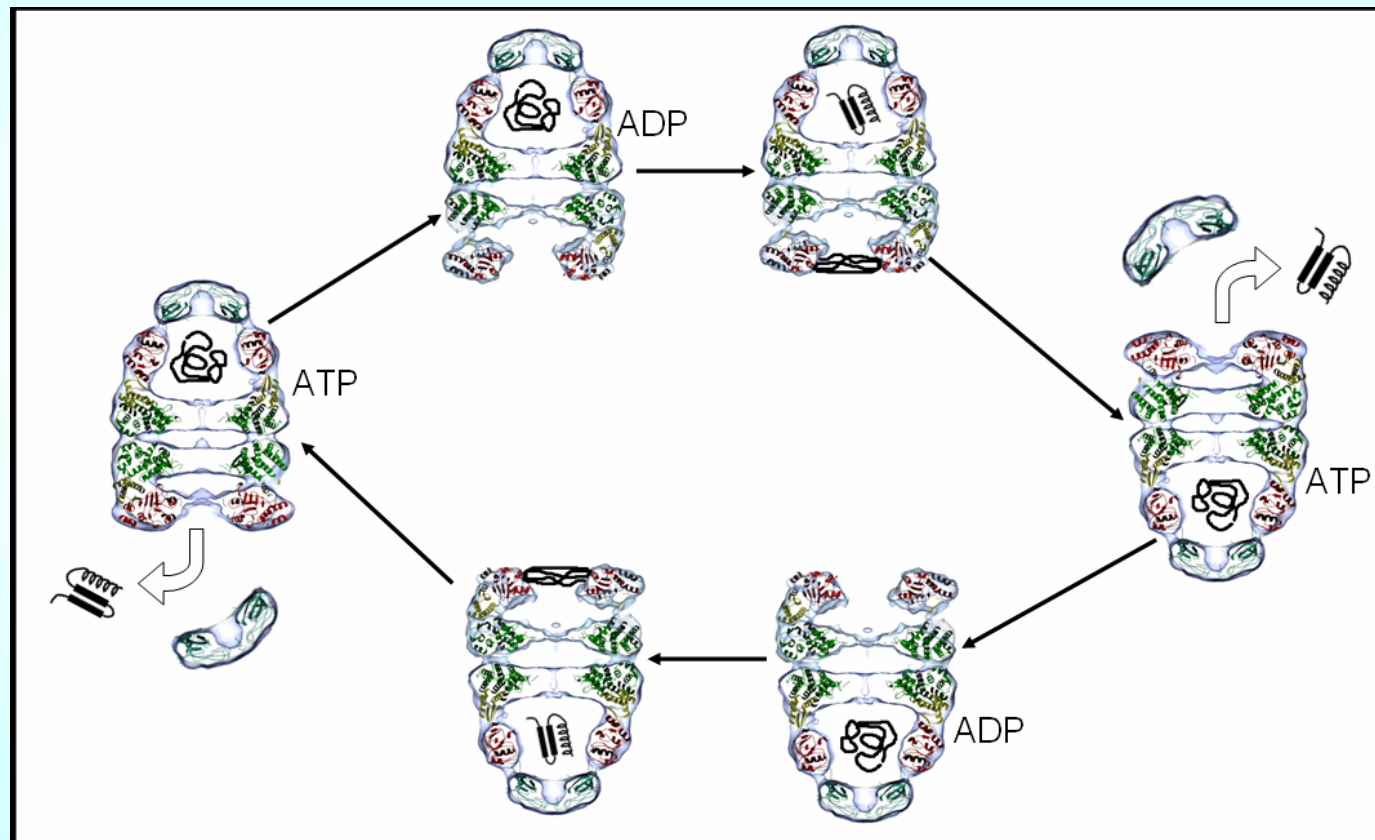


1. Накопление белков, неспособных формировать нативную структуру (так называемые «misfolded proteins») создает серьезные проблемы для выживания клеток (развитие нейродегенеративных болезней, амилоидозов и старения).
2. Основная функция молекулярных шаперонов заключается в связывании ненативных форм белков и препятствовать их агрегации.
3. Гипотеза – белки, неспособные формировать нативную структуру (misfolded proteins), ухудшают функционирование шаперонов, необратимо связываясь в их активных центрах.

# Строение комплекса шаперонина GroEL и кошаперонина GroES *E. coli*



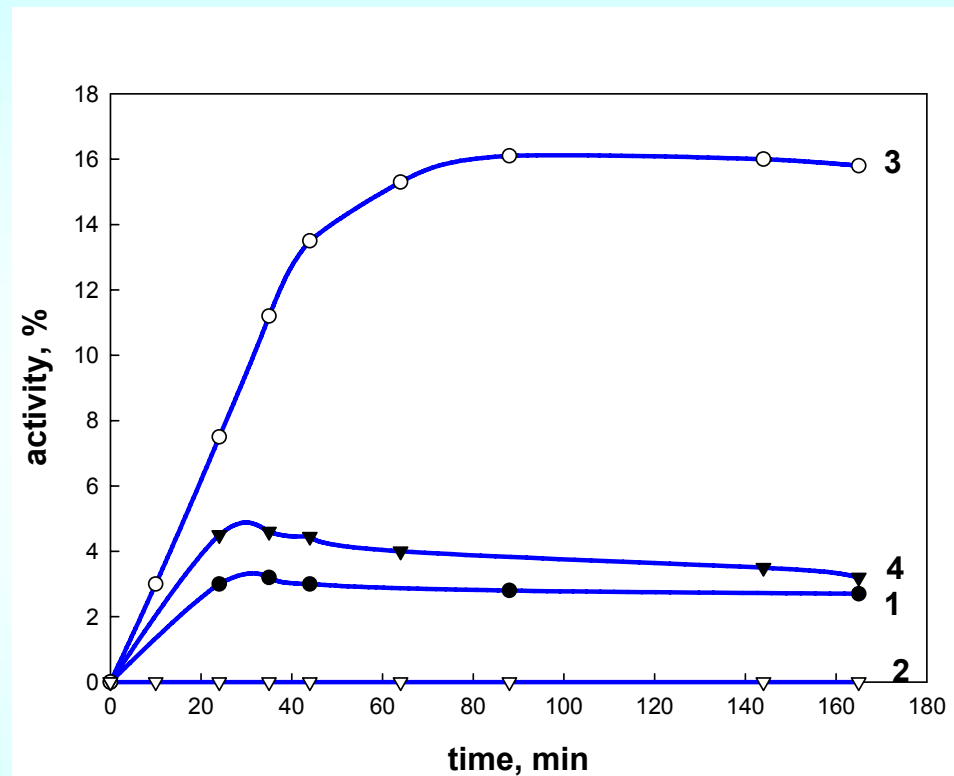
# Схема функционального цикла GroEL/GroES цис-механизм фолдинга



**• получены «*misfolded*» формы белка (глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (ГАФД) с помощью окисления, химической модификации и сайт-специфического мутагенеза, и доказано их необратимое связывание с шаперонином GroEL и их влияние на активность шаперонина.**

*O. POLYAKOVA, O. ROITEL, R. ASRYANTS, A. POLIAKOV, G. BRANLANT, V. MURONETZ "Misfolded forms of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase interact with GroEL and inhibit chaperonin-assisted folding of the wild-type enzyme" Protein Science (2005), 14:921–928.*

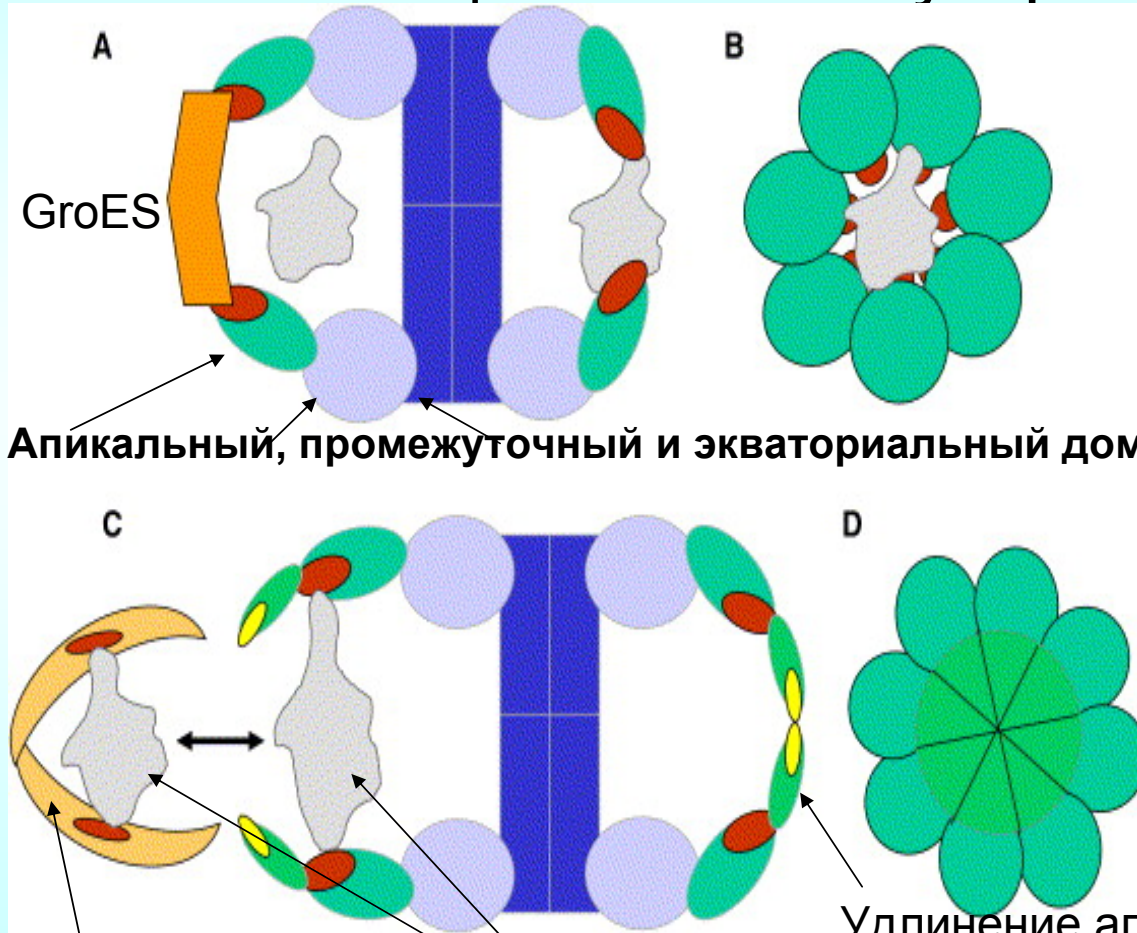
## Влияние окисленного белка на шаперон-зависимую реактивацию денатурированной ГАФД



1. ГАФД
2. ГАФД+GroEL/GroES
3. ГАФД+GroEL/GroES+Mg+ATP
4. ГАФД+ГАФДоx+GroEL/GroES+Mg+ATP

*Naletova I.N. et al.*  
*Biochem.Biophys.Acta*  
2006, 1764, 831-838.

# Шаперонины группы I (GroEL+GroES, микроорганизмы) и группы II (TriC, цитоплазма эукариот)



(A) GroEL+GroES. 14 идентичных субъединиц  
 (B) Вид снизу на гептамерное кольцо GroEL.

Апикальный, промежуточный и экваториальный домены

(C) Шаперонин типа II (TriC), 16 различных субъединиц  
 (D) Вид снизу на октамерное кольцо TriC

Удлинение апикального домена<sub>14</sub>

Кобелок префолдин Белковый субстрат Clarke AR. Mol Cell. 2006 Oct 20;24(2):165-7.

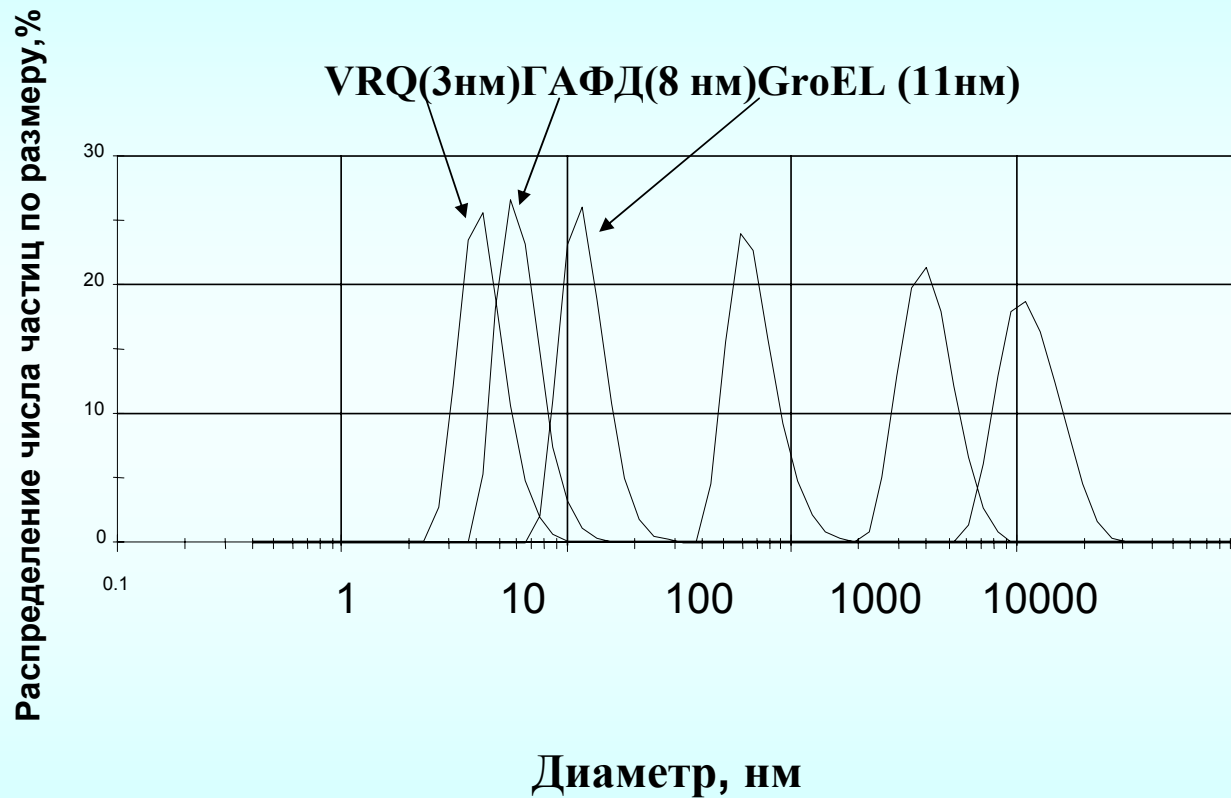




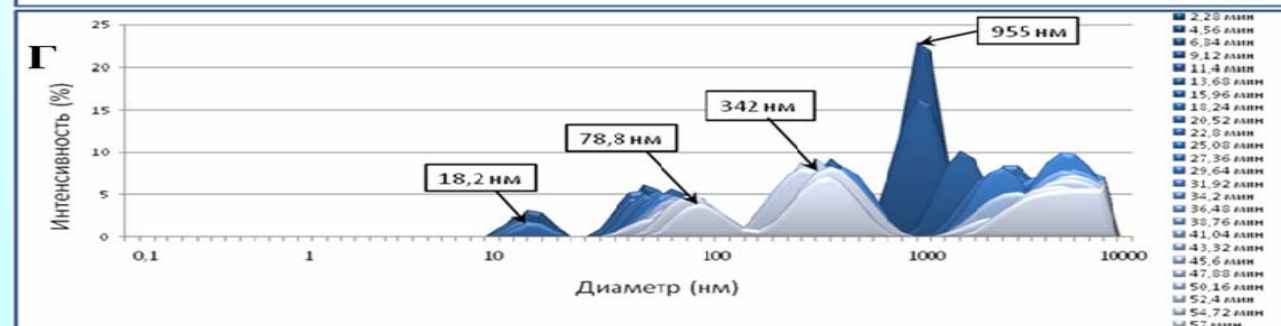
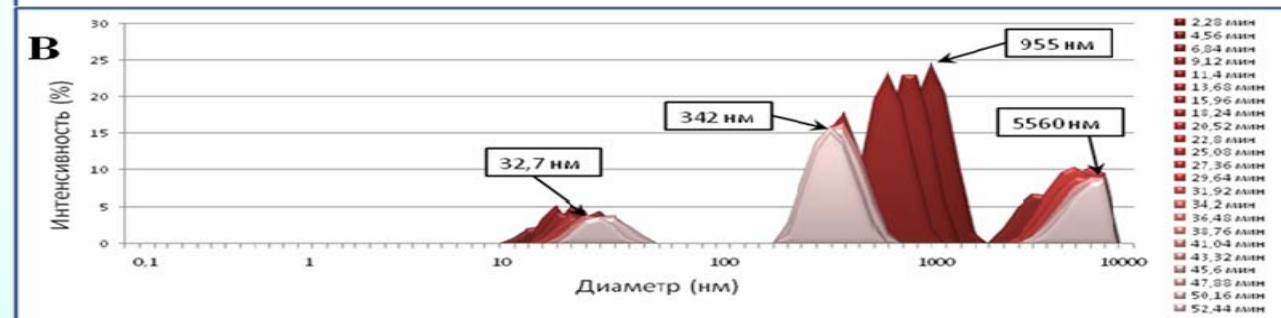
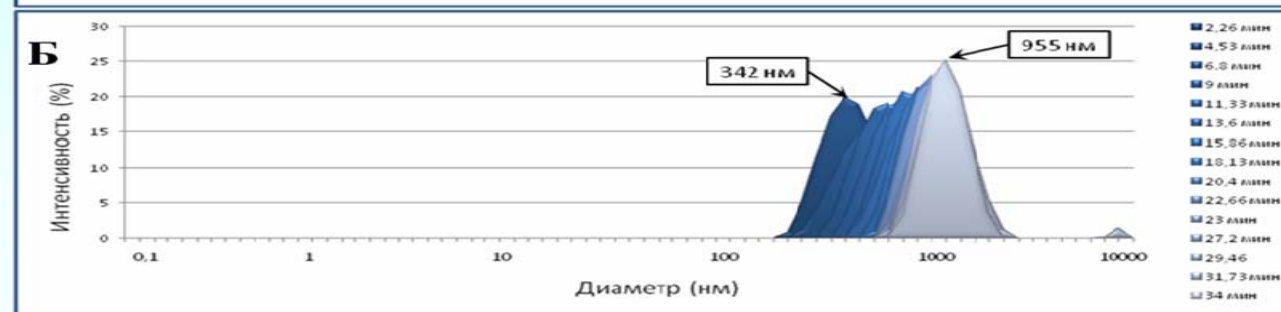
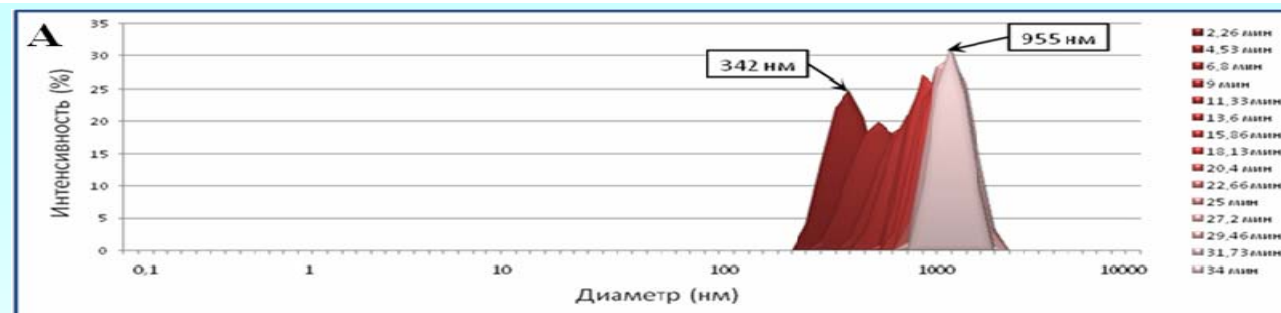
Метод динамического лазерного светорассеяния (Dynamic Light Scattering Method)

	<b>Zeta potential measurement</b>	<b>Particle size analysis range</b>	<b>Molecular weight range</b>
<b>Zetasizer Nano ZS</b>	<b>M3-PALS 5nm-10µm</b>	<b>0.6nm – 6000nm</b>	<b>1000 - 2x10<sup>7</sup> Da</b>

# Определение размеров индивидуальных белков методом ДЛС







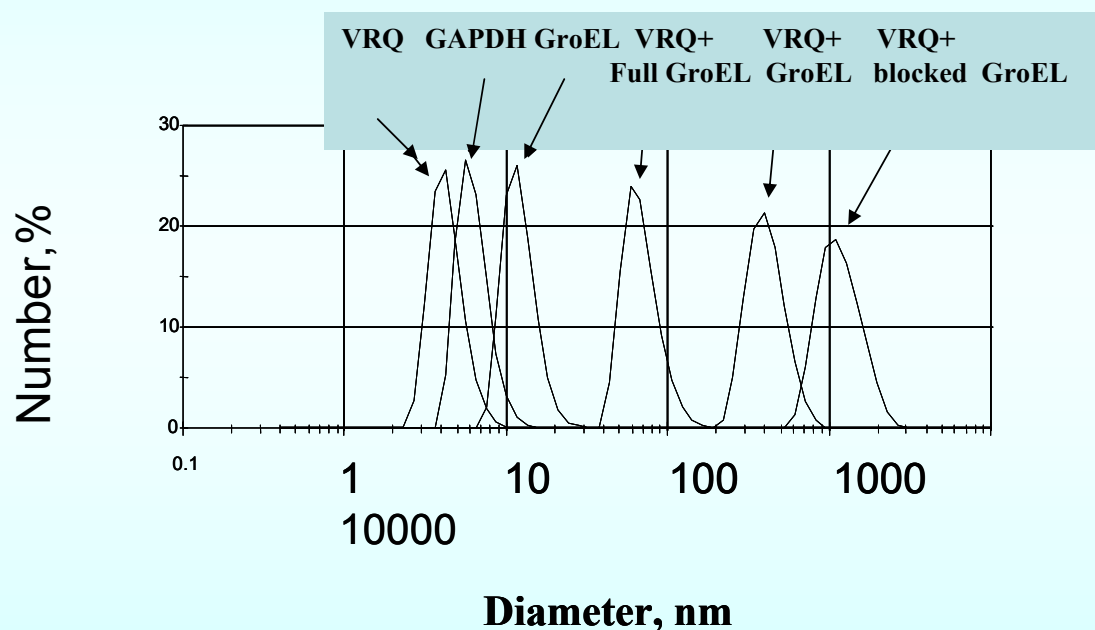
Термоагрегация  
изоформы  
овечьего  
прионного  
белка VRQ

Термоагрегация  
изоформы  
овечьего  
прионного  
белка ARR

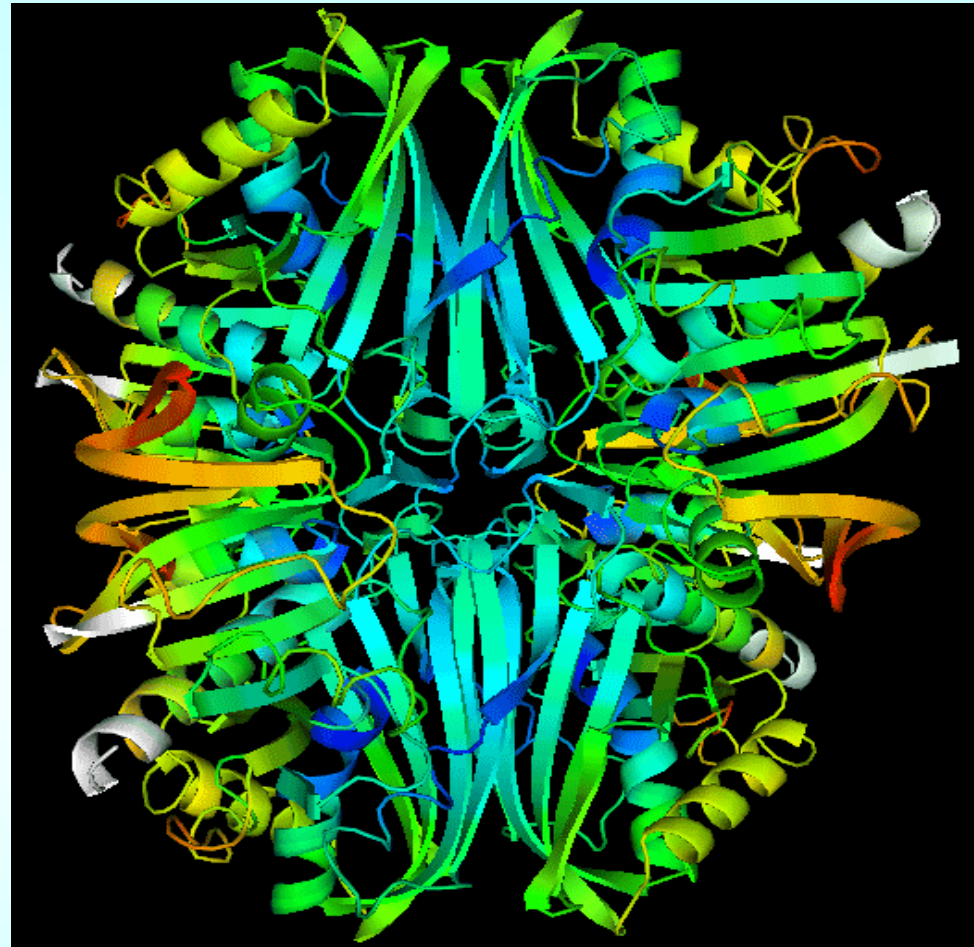
Влияние  
шаперонина  
GroEl на  
размеры  
прионных  
агрегатов VRQ

Влияние  
шаперонина  
GroEl на  
размеры  
прионных  
агрегатов ARR

# Агрегация приона VRQ в присутствии GroEL в различных функциональных состояниях

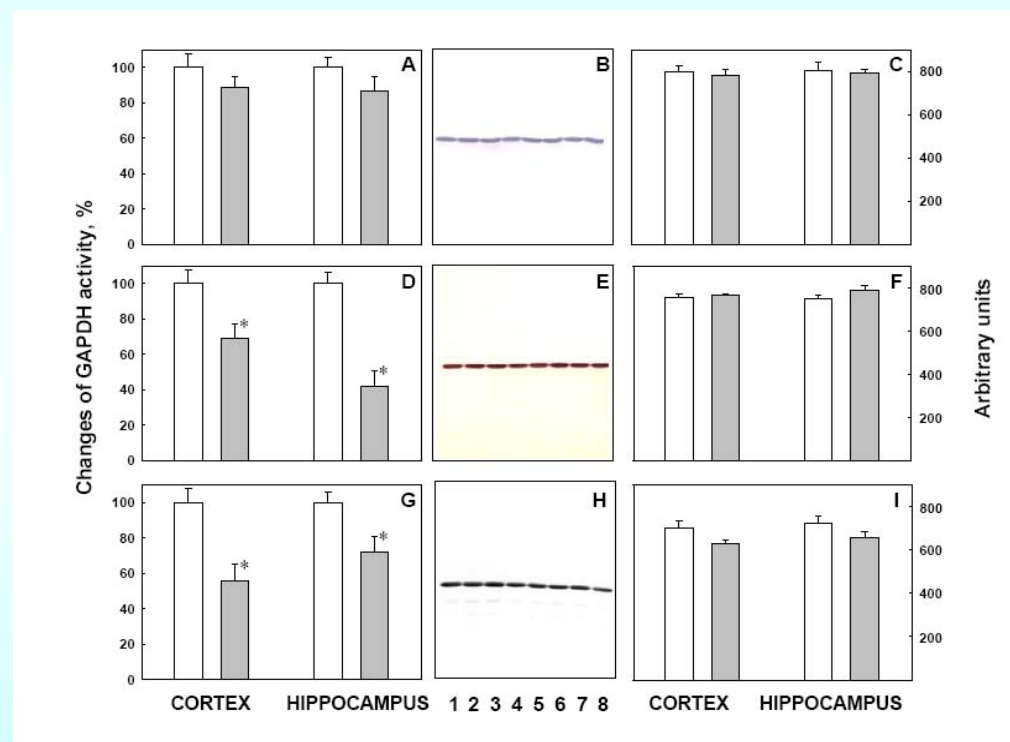


При 25С нефункционирующий шаперонин (GroEL+GroES) формирует Агрегаты прионов (400 nm), в полной системе (+Mg-АТР) размер агрегатов - 70-80 nm. После блокирования GroEL окисленной Денатурированной ГАФД размер агрегатов увеличивается до 1200 nm.<sup>18</sup>



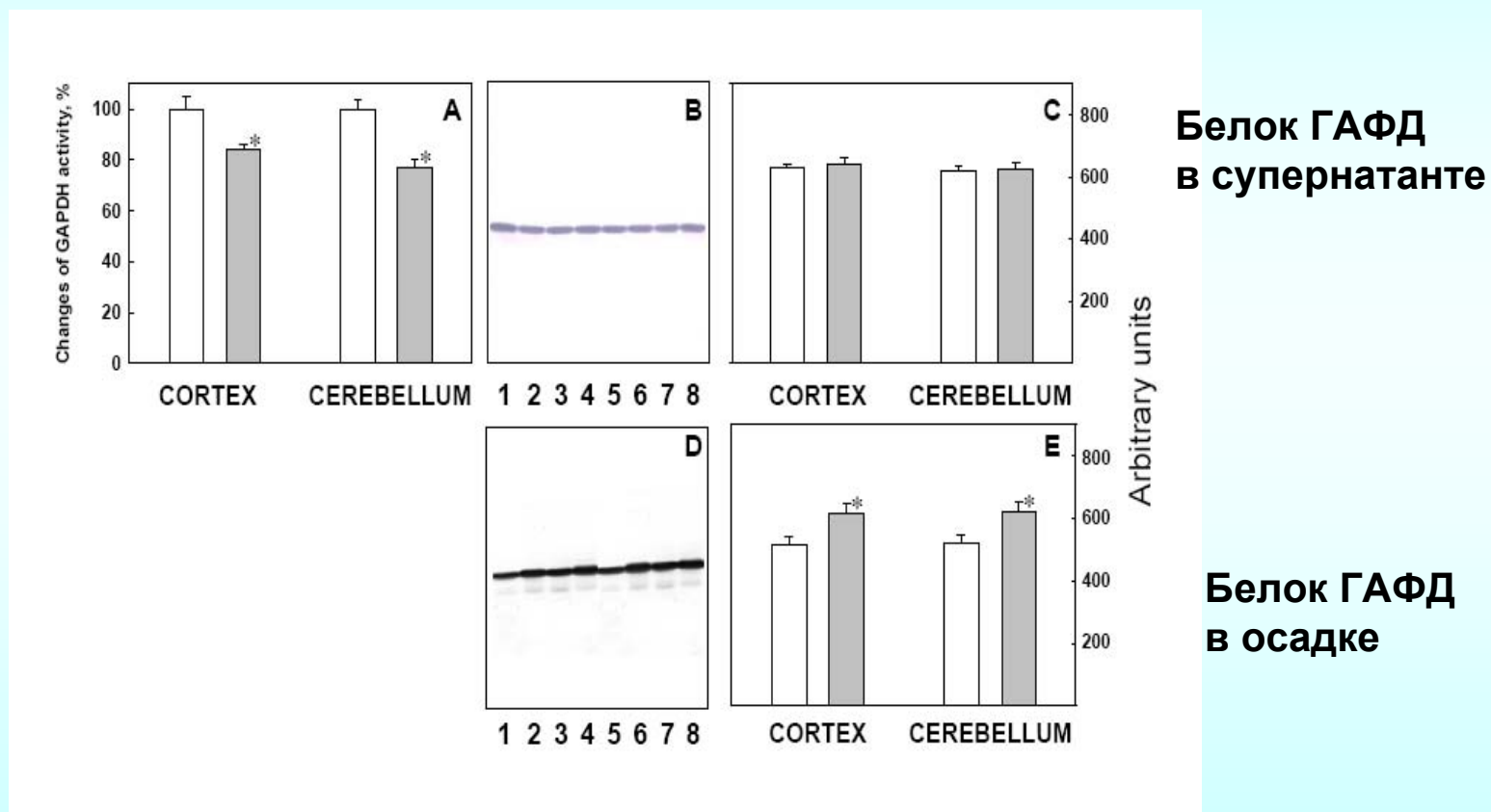
ГАФД

ИЗМЕНЕНИЕ УДЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ (A, D,G) И СОДЕРЖАНИЯ БЕЛКА ГАФД В МОЗГЕ КРЫС ПОСЛЕ МОДЕЛИРОВАНИЯ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА (■) ВВЕДЕНИЕМ БЕТА-АМИЛОИДА (A, B, C), ТИОРФАНА (D, E, F), ЛИПОПОЛИСАХАРИДОВ+ ГАММА-ИНТЕРФЕРОНА (G, H, I), КОНТРОЛЬ (□).



Western blotting of different fraction with antibodies 6C5 (B, E, H), and densitometric analysis of GAPDH level (C, F, I) in different parts of brain. 1,3 – control cortex, 2,4 – treated cortex, 5, 7 – control cerebellum, 6, 8– treated cerebellum.

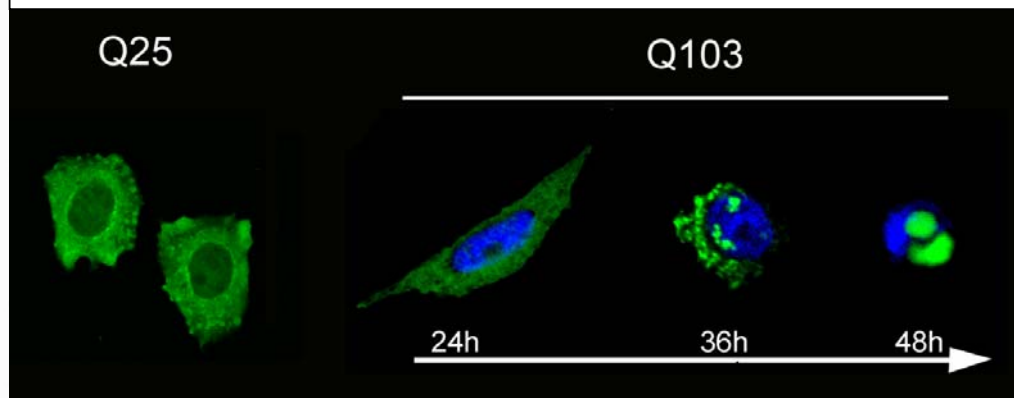
## Сравнение дегидрогеназной активности и содержания белка ГАФД в мозге нормальных и трансгенных (Tg 2576) мышей с болезнью Альцгеймера



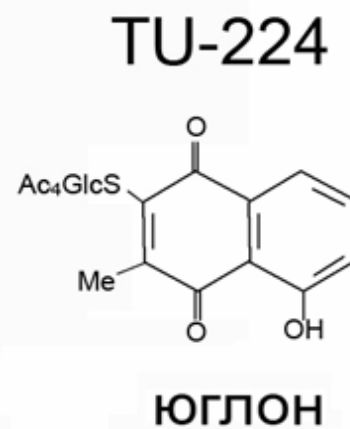
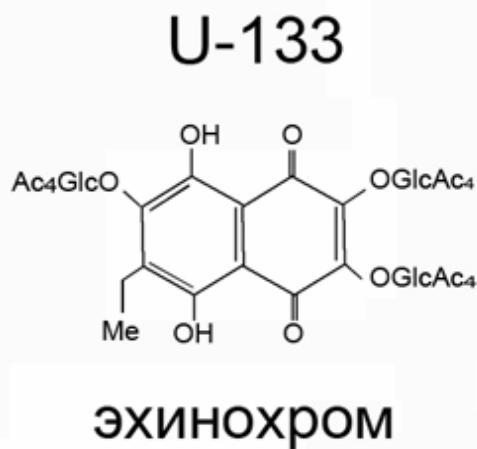
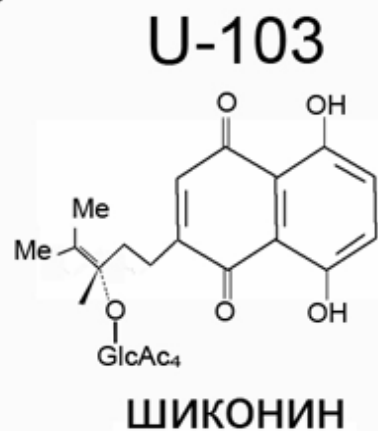
21

•Shalova I.N. et al., *Biochim Biophys Acta*. 2007;1770(5):826-32.

# Болезнь Гентингтона (Hsp 70)



б



## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

- Окислительный стресс и химическая модификация белков провоцирует образование «misfolded» форм белков.
- «Misfolded» формы белков (например, неактивные формы ГАФД») могут возникать при ряде амилоидозов.
- «Misfolded» формы белков необратимо блокируют шапероны и ингибируют шаперон-зависимое сворачивание белков .
- простейший способ увеличения концентрации активных шаперонов в клетке - использование низкомолекулярных тиолов и антиоксидантов для предотвращения окисления белков.
- Заблокированные шапероны стимулируют образование агрегатов амилоидогенных белков

**НИИ Физико-химической  
биологии им. А.Н.Белозерского  
и факультет биоинженерии и  
биоинформатики, Московский  
государственный университет  
им. М.В. Ломоносова**

***Регина Асриянц,  
Владимир Изумрудов,  
Ирина Налетова,  
Ирина Шалова  
Елена Шмальгаузен,  
аспиранты:  
Георгий Киселев  
Сергей Стогов***

**Работа была поддержана грантами РФФИ 05-04-48076-а,  
08-04-00231-а и 08-08-00540-а), ИНТАС и NATO (PDD(CP)-  
(CBP.NR.RIG 982779),  
Роснаука «Живые системы» № 02.512.11.2249**

**Институт цитологии РАН  
Ирина Гужова  
Борис Марголис  
Клиника нервных болезней  
ММА им. Сеченова  
Ирина Преображенская**

**Department of Human  
Physiology and Pharmacology  
"Vittorio Erspamer", University  
of Rome "La Sapienza", Rome,  
Italy –  
*Luciano Saso*  
Sigma-Tau Company, Italy -  
*Antonio Caprioli*  
*Institut National de la Recherche  
Agronomique, BIA-FIPL, France -  
Thomas Haertle***



## ***New Year -2007/2008***



25