



МИХАЙЛОВА
Елена Радиславовна

**РОЛЬ ФЕРМЕНТА ГЛИЦЕРАЛЬДЕГИД-3-ФОСФАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ В
МЕЖКЛЕТОЧНОМ ПЕРЕНОСЕ ПАТОГЕННЫХ БЕЛКОВЫХ КОМПЛЕКСОВ В
КЛЕТОЧНОЙ МОДЕЛИ БОЛЕЗНИ ХАНТИНГТОНА**

03.03.04 – Клеточная биология, цитология, гистология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой
степени кандидата биологических наук

Санкт-Петербург

2016

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

Научный руководитель:

доктор биологических наук
Ирина Владимировна Гужова,
Заведующая Лабораторией защитных механизмов
клетки Федерального государственного бюджетного
учреждения науки Институт цитологии Российской
академии наук

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук
Елена Владимировна Савватеева-Попова,
Заведующая Лабораторией нейрогенетики
Федерального государственного бюджетного
учреждения науки Институт физиологии
им. И.П. Павлова Российской академии наук

кандидат биологических наук
Елена Викторовна Шмальгаузен,
Старший научный сотрудник Научно-
исследовательского института физико-химической
биологии имени А.Н.Белозерского Московского
государственного университета имени
М.В.Ломоносова.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное научное
Учреждение "Институт экспериментальной
медицины".

Защита диссертации состоится «21» апреля 2017 года в 14.00 часов на заседании Диссертационного совета Д002.230.01 на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института цитологии РАН по адресу:

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

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Института цитологии РАН
<http://www.cytspb.rssi.ru/>

Ученый секретарь Диссертационного
совета, кандидат биологических наук

Е.В. Каминская



ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы.

Нейродегенеративные заболевания, как правило, связаны с накоплением внеклеточных или внутриклеточных агрегатов мутантных белков. Олигомеры и агрегаты, образующиеся при развитии патологии, являются причиной смерти нейронов в областях мозга, специфических для каждого заболевания. По мере прогрессирования заболевания агрегаты патогенных белков появляются в других регионах мозга, зона поражения расширяется, гибнут новые нейроны в соседних структурах мозга. В последние годы обнаружено явление горизонтального переноса, в ходе которого белковые агрегаты проникают в нативные клетки через плазматические мембраны и изменяют конформацию нормальных белков, способствуя, таким образом, распространению заболевания подобно прионным белкам. Тем не менее, на сегодняшний день недостаточно данных о токсичности внеклеточных агрегатов, их белковом составе и участии в межклеточной миграции.

Болезнь Хантингтона — наследственное неврологическое заболевание — обусловлена наличием мутации в гене белка хантингтина, находящемся в коротком плече 4-й хромосомы. Данная мутация приводит к увеличению количества триплетов CAG и, как следствие, к появлению аномально длинной полиглутаминовой последовательности (polyQ) в N-терминальном домене молекулы. При наличии полиглутаминовой последовательности длиной свыше 35 остатков образуются цитотоксические олигомеры и агрегаты, что способствует многочисленным нарушениям в нейрональной физиологии и, в конечном счете, приводит к массовой гибели клеток. Растущие агрегаты вовлекают в своё образование нормальные клеточные белки, присутствие агрегатов в клетке инициирует дальнейшее нарушение механизмов фолдинга белков и приводит к последующей агрегации [1].

Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (ГАФД) является ферментом, который катализирует шестой этап гликолиза. Помимо традиционных функций аэробного метаболизма глюкозы последние исследования выявили дополнительные функции ГАФД в других процессах: в регуляции экспрессии генов и в регуляции окислительно-восстановительных посттрансляционных модификаций [2]. Было также показано, что ГАФД содержится в патологических агрегатах tau-белка [3-5] и может физически связываться с A β [6]. Более того, комплекс ГАФД с polyQ был воспроизведён в клеточных моделях БХ и других polyQ заболеваний [7,8]. Недавно в Лаборатории защитных механизмов Института цитологии РАН было показано, что ГАФД значительно увеличивает агрегацию mНТТ [9,10] и мутантной супероксиддисмутазы (mСОД1), ответственной за возбуждение БАС [11]. Агрегация усиливалась в присутствии тканевой трансклутаминазы, которая катализирует образование связей между глутаминовыми и лизиновыми остатками.

Мы предположили, что ГАФД также может принимать участие в межклеточной миграции полиглутаминовых олигомеров и агрегатов; таким образом, главной задачей нашего исследования было выявить роль ГАФД в развитии патологии при БХ.

Цели и задачи исследования.

Целью данной работы было установить роль глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы в межклеточном переносе мутантного хантингтина. Исходя из этого, были поставлены следующие задачи:

1. Исследовать процесс выхода и белковый состав патогенных агрегатов мутантного хантингтина из клеток-моделей болезни Хантингтона.
2. Определить влияние вышедших комплексов ГАФД и polyQ на жизнеспособность клеток.
3. Исследовать механизмы внутриклеточного транспорта ГАФД — индивидуально и в комплексе с polyQ.
4. Определить вклад ГАФД в прион-подобную активность мутантного хантингтина.
5. Сравнить токсичность внеклеточных и внутриклеточных агрегатов комплексов polyQ-ГАФД.

Основные положения, выносимые на защиту.

1. ГАФД высвобождается из мёртвых и повреждённых клеток в комплексе с polyQ, и эти комплексы токсичны для клеток.
2. ГАФД в комплексе с polyQ способна проникать внутрь живых клеток и усиливать агрегацию нативных белков.
3. Внеклеточные агрегаты комплексов polyQ-ГАФД более токсичны, чем их внутриклеточные аналоги.

Научная новизна полученных результатов.

В настоящей работе впервые показано, что ГАФД в комплексе с polyQ способна высвобождаться из мёртвых или повреждённых клеток в клеточной модели БХ, и эти комплексы обладают цитотоксическим эффектом. Показано, что ГАФД усиливает способность polyQ проникать внутрь живых клеток и агрегацию нативных белков с полиглутаминовым трактом нормальной длины. Доказано, что экстраклеточные комплексы polyQ-ГАФД более токсичны, чем внутриклеточные агрегаты.

Теоретическое и практическое значение работы.

Полученные результаты свидетельствуют о значительной роли ГАФД в развитии нейродегенеративных патологий, таких, как болезнь Хантингтона. Доказана ведущая роль ГАФД в межклеточном переносе polyQ, а также её способность усиливать прион-подобные свойства polyQ.

Апробация работы.

Основные положения работы были представлены на восемнадцатой Всероссийской медико-биологической конференции молодых исследователей «Человек и его здоровье. Фундаментальная наука и клиническая медицина» (Санкт-Петербург, 2015), на девятнадцатой Международной Пущинской школе-конференции молодых учёных «Биология – наука XXI века» (Москва, Пущино,

2015), на VII Российском симпозиуме «Белки и пептиды» (Новосибирск, 2015), на V съезде биохимиков России (Сочи, Дагомыс, 2016).

Личный вклад автора.

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

Финансовая поддержка работы.

Работа проходила при поддержке Программы Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» (грант № 14-50-00068) и гранта президента в рамках научного проекта № МК-8274.2016.4.

Структура и объем работы.

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов работы, обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы, включающего 152 ссылки. Диссертация изложена на 104 страницах и иллюстрирована 24 рисунками.

Список сокращений.

АТФ – аденозин-3-фосфат	ПонаА – Понастерон А
БА – болезнь Альцгеймера	СОД1 – супероксиддисмутаза-1
БАС – боковой амиотрофический склероз	тТГ – тканевая транслутаминаза
БП – болезнь Паркинсона	ФСБ – фосфатно-солевой буфер
БТШ70 – белок теплового шока 70 кДа	ФСБТ – фосфатно-солевой буфер с добавлением 0,005% Тритон X-100
БХ – болезнь Хантингтона	ЦНС – центральная нервная система
ГАФД – глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа	Аβ – амилоидный бета-пептид
ДСН – додецилсульфат натрия	APP – (англ. Amyloid precursor protein) белок предшественник бета-амилоида
ИФА – иммуно-ферментный анализ	НТТ – хантингтин
ЛДГ – лактатдегидрогеназа	mНТТ – мутантный хантингтин
НАД – никотинамидадениндинуклеотид	polyQ – полиглутаминовый тракт
ПААГ – полиакриламид-гель	

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследований.

Белки и пептиды. Рекомбинантные полипептиды, содержащие последовательность первого экзона хантингтина и 58 (мутантная форма) или 23 (непатогенная форма) остатков глутамина, выделяли из бактерий *E. coli*, трансформированных плазмидами pGEX-2TK-httQ58 или pGEX-2TK-httQ23, соответственно. Плазмиды были любезно предоставлены доктором Дж. Вэнг (Массачусетский центральный госпиталь, Бостон, США). Обе белковые конструкции, содержащие глутатион-S-трансферазные (GST) метки, очищали с помощью глутатион-сефарозной колонки (Qiagen, Германия). Элюцию белков производили после промывок геля с помощью раствора, содержащего 15 мМ глутатиона (Sigma, США), при pH 8.0.

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

В экспериментах с использованием проточной цитометрии использовали ГАФД, конъюгированная с флуоресцентным красителем Cy5, а в экспериментах с конфокальной микроскопией — с красителем Alexa 488 (Invitrogen, США). Конъюгацию с красителями производили в соответствии с протоколом производителя.

Клеточные культуры и условия культивирования. Клетки нейробластомы человека SK-N-SH были любезно предоставлены проф. Д. Рубинштейном из Университета Кэмбриджа (Великобритания). Клетки феохромоцитомы крысы PC-12 дикого типа были взяты из Российской коллекции клеточных культур (Россия, Санкт-Петербург). Клетки феохромоцитомы крысы PC-12HttQ103, несущие экдизон-индуцибельную генетическую конструкцию, включающую 1-й экзон гена хантингтина, слитого с зеленым флуоресцентным белком (Apostol et al., 2006) были любезно предоставлены проф. М. Шерманом из Бостонской школы медицины (США).

Для культивирования клеток использовали питательную среду DMEM (БиоЛот, Россия) с добавлением L-глутамина, 50 мкг/мл сульфата гентамицина и 10 % фетальной бычьей сыворотки (PAA Laboratories GE, Австрия). В среду для культивирования клеток PC-12HttQ103 добавляли также 100 мкг/мл G-418 (Gibco by Life Technologies, Великобритания). Культивирование клеток проводили при температуре 37°C в атмосфере, содержащей 5% CO₂. Экспрессию HttQ103 в клетках PC-12HttQ103 индуцировали добавлением в питательную среду 2 мкМ Понастерона А (Sigma, США).

Для оценки цитотоксичности кондиционированной среды клетки PC-12HttQ103 с растущими агрегатами и контрольные клетки PC-12 дикого типа высевали в лунки 6-луночных планшетов (Sarstedt, Германия) в концентрации 200000 клеток/мл и выращивали в течение ночи. На следующее утро в питательную среду добавляли 2 мкМ Понастерона А (понА) и инкубировали клетки в течение следующих 3, 9, 24, 36 и 48 ч при 37°C. После инкубации клетки промывали три раза ФСБ и

добавляли свежую бессывороточную среду на следующие 4 ч, в течение которых в среде накапливались белки, высвобождающиеся из клеток. Кондиционированную среду собирали, добавляли к ней фетальную бычью сыворотку до конечной концентрации 10% и инкубировали с интактными клеткам PC-12HttQ103 или PC-12 дикого типа в течение 24 ч. В некоторых экспериментах агрегаты удаляли из кондиционированной среды при помощи центрифугирования (12000g, 15 мин) до инкубации с акцепторными клетками.

При приготовлении проб для конфокальной микроскопии SK-N-SH клетки высевали на покровные стекла и инкубировали в течение ночи. Затем клетки трансфецировали плазмидой, содержащей ген 1-го экзона хантингтина с 25 глутаминовыми остатками (непатогенная форма), слитый с геном зеленого флуоресцентного белка EGFP (любезно предоставлена проф. Д. Рубинштейном из Университета Кэмбриджа, Великобритания). Трансфекцию проводили с использованием Липофектамина 2000 (Invitrogen, США) в соответствии с протоколом производителя. Через четыре часа после трансфекции среду заменяли на свежую, содержащей 10 мкг/мл Q58 или Q23 по отдельности или в комплексе с 10 или 30 мкг/мл ГАФД. Еще через 48 ч, клетки фиксировали с помощью 4% параформальдегида в течение 20 мин, а ядра окрашивали 4',6-диамидино-2-фенилиндолом (DAPI). Готовые препараты сканировали с помощью конфокального лазерного микроскопа Leica TCS SL. Для возбуждения флуоресценции EGFP и DAPI применяли лазеры с длиной волны 488 нм и 450 нм соответственно. Анализ полученных изображений проводили с помощью программы LeicaApplicationSuite 2.0.2 (Leica).

Ультрафильтрация: метод ловушки на фильтре. Среды, кондиционированные клетками PC-12 дикого типа или PC-12 HttQ103, собранные после 3, 9, 24, 36 и 48 ч после введения Пона (как описано выше), а также клеточные лизаты исследовали на наличие агрегатов.

Пробы кондиционированной среды или клеточных экстрактов смешивали с 2% раствором ДСН и вносили в лунки 96-луночного манифолда (BioRad, США), соединенным с вакуумным насосом. В качестве дна манифолда использовали ацетат-целлюлозная мембрана. Растворимые в ДСН клеточные белки проходили через поры мембраны, а нерастворимые белковые агрегаты задерживались на мембране.

Полученную мембрану инкубировали с антителами против polyQ (MAB1574, Millipore, Германия) или ГАФД (6C5, Abcam, Великобритания), а затем с вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена (Jackson Immunoresearch, США). Пероксидазную реакцию визуализировали при помощи метода усиленной хемилюминесценции. Интенсивность свечения определяли при помощи программы TotalLabQuant.

ГАФД иммуноферментный анализ. Количественный анализ ГАФД, находящейся в кондиционированной среде, проводили при помощи тест-системы на основе двухсайтового иммуноферментного анализа, разработанного в нашей лаборатории.

Для увеличения чувствительности метода на твёрдой фазе адсорбировали NeutrAvidin в концентрации 4 мкг/мл в течение 1 часа и производили отмывку буфером ФСБТ от не связавшихся компонентов. Свободные места связывания блокировали БСА в концентрации 5 мг/мл и производили отмывку. В лунки вносили поликлональные крысиные антитела к ГАФД (получены в лаборатории защитных механизмов клетки ИИЦ РАН), предварительно меченные биотином (Pierce, США) в концентрации 5 мкг/мл, и производили отмывку. После этого производили инкубацию с антигенами в течение 4 часов (калибровка стандартов чистой ГАФД в концентрациях 2, 6, 18 и 54 нг/мл, и разбавленная в 2 раза среда, кондиционированная клетками PC-12HttQ103 и PC-12 дикого типа после воздействия ПонА). После процедуры отмывания в лунки вносили моноклональные мышинные антитела к ГАФД (6C5, Abcam, Великобритания) и инкубировали в течение 1 ч. После очередной отмывки вносили вторичные конъюгированные с пероксидазой хрена антитела к лёгким и тяжёлым цепям мышинных иммуноглобулинов (Jackson ImmunoResearch, США) и инкубировали в течение 1 ч. После отмывки добавляли смесь цитратного буфера с 3,3',5,5'-тетраметил-бензидином (Sigma, St.Louis, США). Реакцию останавливали через 15 мин 0,2 М серной кислотой и количество продукта реакции измеряли с помощью иммунохимического анализатора «Флюорофот» (ПРОБАНАУЧПРИБОР, Россия) при длине волны, равной 450 нм. Количество ГАФД в образцах определяли с использованием калибровочной кривой (2–54 нг/мл), полученной из титров стандартов.

Проточная цитометрия. Для количественной оценки степени внутриклеточного транспорта ГАФД, клетки SK-N-SH инкубировали с 66 мкг/мл ГАФД, меченной Cy5, в течение 15, 30 мин и 1, 3 и 6 ч. Затем клетки тщательно промывали ФСБ и анализировали с помощью проточного цитометра BDFACSAria3 (BectonDickinson, США) при длине волны, равной 655 нм.

Клеточный иммуноферментный анализ. Клеточный иммуноферментный анализ использовали в качестве альтернативного метода оценки внутриклеточного транспорта polyQ и ГАФД и их динамики. Клетки SK-N-SH высевали в лунки 96-луночный планшета в концентрации 200 000 клеток/мл. После 18 ч инкубации в лунки добавляли растворы ГАФД (30 мкг/мл), Q23 (10 мкг/мл), Q58 (5 или 10 мкг/мл) на 15, 30 мин, 1, 3, 6 или 18ч. После клетки отмывали буфером ФСБТ и фиксировали 4% формалином (Sigma, США). После отмывки клетки подвергали воздействию 0,3% перекиси водорода (Sigma, США) в течение 30 мин. После отмывки добавляли антитела к антигенам (моноклональные мышинные к ГАФД (6C5, Abcam, Великобритания) или моноклональные мышинные к polyQ (MilliporeMAB 1574, Германия)) и инкубировали в течение часа. После очередной отмывки вносили конъюгированные с пероксидазой хрена вторичные антитела к лёгким и тяжёлым цепям мышинных иммуноглобулинов (Jackson ImmunoResearch, США) и инкубировали в течение 1 часа. После отмывки добавляли смесь цитратного буфера с 3,3',5,5'-тетраметил-бензидином (Sigma, St.Louis, США). Реакцию останавливали через 15 мин 0,2 М серной кислотой.

При ингибиторном анализе внутриклеточного белкового транспорта клетки SK-N-SH инкубировали с 30 мкг/мл ГАФД, смешанной с 10 мкг/мл Q23 или Q58 в присутствии 100 мкМ

динасора (ингибитор динамин-зависимого эндоцитоза); 10 мкМ хлорпромазина (ингибитор клатрин-зависимого эндоцитоза); 50 мкМ амилорида (ингибитор пиноцитоза); 10 мкМ филипина (ингибитор кавеолин-зависимого эндоцитоза); 5 мкМ цитохалазина D (нарушает актин-зависимый транспорт); 2 мкМ нокодазола (ингибитор тубулин-зависимого эндоцитоза); и 5 мкМ метил-бета-циклодекстрина (M β CD) (разрушает липидные рафты). После 6-часовой инкубации клетки обрабатывали по вышеописанному протоколу. Количество продукта реакции измеряли с помощью иммунохимического анализатора «Флюорофот» (ПРОБАНАУЧПРИБОР, Россия) при длине волны, равной 450 нм.

Определение активности дегидрогеназ по Мосману. Жизнеспособность клеток оценивалась при помощи метода Мосмана (Mosmann, 1983). Данный метод основан на способности живых клеток восстанавливать соли тетразолия МТТ. В лунки 96-луночного планшета с клетками вносили по 20 мкл раствора МТТ (5 мг/мл) и клетки инкубировали в течение 4 ч при 37°C и 5% CO₂. Затем в лунки планшета вносили по 100 мкл ДМСО для растворения кристаллов формазана и измеряли сигнал при длинах волн 570 и 630 нм на иммунохимическом анализаторе «Флюорофот» (ПРОБАНАУЧПРИБОР). Результатом служила разница между значениями поглощения, полученными при 570 и 630 нм.

Определение активности лактатдегидрогеназы. Лактатдегидрогеназа (ЛДГ) является стабильным цитозольным ферментом. При повреждении клеточной мембраны (клеточный лизис или некроз) ЛДГ высвобождается во внеклеточное пространство. Таким образом, по активности ЛДГ в клеточной среде можно судить о количестве погибших клеток. Активность ЛДГ определяли колориметрическим методом с использованием набора CytoTox 96 фирмы Promega (США) в соответствии с протоколом производителя. Концентрацию ЛДГ в культуральной среде измеряли в ферментативном тесте при превращении солей тетразолия в цветные продукты формазана. Оптическую плотность измеряли на иммунохимическом анализаторе «Флюорофот» (ПРОБАНАУЧПРИБОР) при длине волны 490 нм.

ПААГ-ДСН электрофорез и иммуноблоттинг. При приготовлении проб клетки собирали, промывали холодным ФСБ, центрифугировали при 800 g в течение 5 мин. К сухому клеточному осадку добавляли лизирующий буфер (20 мМ Трис-HCl pH 7,5; 150 мМ NaCl; 0,5 % Тритон X-100; 2 мМ ЭДТА). Электрофоретическое разделение белков проводили по методу Лаэммли (Laemmli, 1970) в 10 %-ном ПААГ.

Перенос разделенных белковых зон из геля на нитроцеллюлозную мембрану (Immobilon-P (PVDF), размер пор 0,45 мкм, фирмы Millipore Corporation) производили при помощи камеры MINI-Protean TETRA (BioRad, США).

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

Для окрашивания белковых зон использовали антитела: моноклональные мышинные против ГАФД, клон 6C5, титр 1:5000 (Abcam), моноклональные антитела против иммуноглобулина (IgG) мыши, меченные пероксидазой (фирмы Sigma, титр 1:10000).

Статистическая обработка результатов. Статистическую обработку результатов проводили с помощью компьютерной программы Excel (Microsoft) с использованием t-критерия Стьюдента. Полученные значения представлены в виде среднего $\pm$ стандартная ошибка среднего. Разницу считали статистически значимой при $p < 0,05$ (*) или $p < 0,01$ (**).

РЕЗУЛЬТАТЫ

ГАФД и polyQ высвобождаются из клеток, индуцированных к экспрессии НТТQ103

Ранее было показано, что ГАФДГ формирует цитотоксические агрегаты в комплексе с длинными полиглютаминовыми повторами в модели БХ *in vitro* [9] и в модели атаксии-3 *in vivo* [10]. Мы предположили, что эти агрегаты способны мигрировать из патогенных клеток в другие регионы мозга подобно прионным белкам [12]. Чтобы подтвердить роль ГАФД во внеклеточном транспорте polyQ, мы использовали клетки феохромоцитомы крысы PC-12, несущие экдизон-индуцибельную генетическую конструкцию, включающую 1-й экзон гена НТТ, содержащего 103 глутаминовых повтора (Q103) [13]. После индукции экспрессии Q103 с помощью Пона первые агрегаты polyQ появлялись уже через 9 ч; через 24 ч агрегаты наблюдали в 50% клеток, а через 48 ч 100% клеток содержали агрегаты (Рис. 1, А).

При помощи антител к ГАФД мы выяснили, что в этих клетках ГАФД специфически колокализуется с polyQ (Рис. 1, Б).

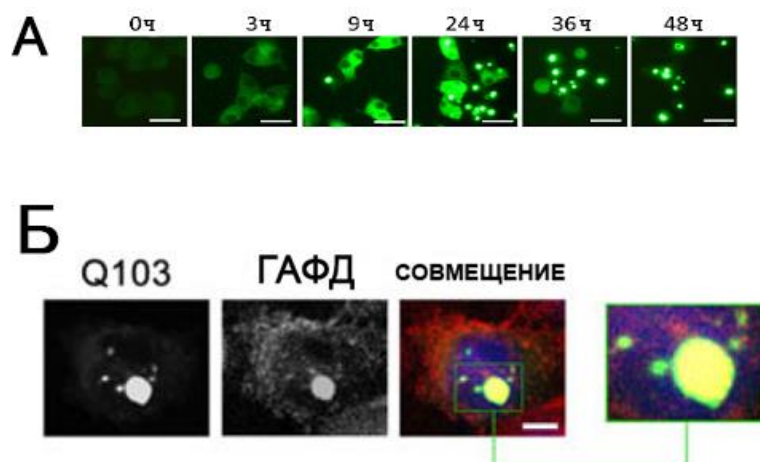


Рис. 1. (А) Клетки PC12-HttQ103. Мы вызывали экспрессию патогенного белка polyQ добавлением в среду 2 мкМ Пона в течение указанных периодов времени. Масштабная линейка: 10 мкм

(Б) Колоколизация ГАФД и polyQ в клетках PC12-HttQ103 через 24 ч. после индукции экспрессии Q103. Экспрессию вызывали 2 мкМ Пона.

Мы измеряли токсичность растущих агрегатов polyQ посредством определения жизнеспособности клеток с помощью метода МТТ. Через 48 часов после индукции клеток PC-12HttQ103 сПона, процент умерших клеток достигал $53,5 \pm 4,2\%$ (рис.2.А.). Контрольные клетки PC-12 дикого типа также продемонстрировали слабую чувствительность к Пона. Их смертность составила $9,8 \pm 1,4\%$ через 48 часов инкубации с Пона. Мы также использовали анализ активности ЛДГ (Promega CytoTox96, США) в культуральной среде, чтобы подтвердить постепенную смерть

клеток, содержащих агрегаты polyQ. Результаты данного анализа соответствовали с данным, полученным с помощью метода МТТ.

Для оценки содержания внеклеточной ГАФД мы использовали двухсайтовый иммуноферментный анализ с чувствительностью 2–5 нг/мл ГАФД, т.к. ожидали, что высвобождение ЛДГ из клеток будет сопровождаться появлением ГАФД в кондиционированной клеточной среде. Через 3 ч после обработки клеток ПонА мы обнаружили внеклеточную ГАФД, а через 48 ч содержание фермента достигло 130 нг/мл (рис.2, Б). Иммуноблоттинг кондиционированной среды клетками PC-12 HttQ103 также показал постепенное повышение содержания ГАФД с течением времени (рис. 2, Б, верхняя панель). Кроме того, мы подтвердили высвобождение ГАФД из мёртвых клеток с помощью анализа активности ЛДГ. Увеличение активности ЛДГ коррелирует с увеличением количества ГАФД в кондиционированной среде и с возрастанием гибели клеток с течением времени.

Мы исследовали, в какой форме ГАФД и polyQ покидают клетки PC-12HttQ103, обработанные ПонА. Мы использовали метод ультрафильтрации в 96-луночном манифолде для определения количества нерастворимых в ДСН агрегатов в кондиционированной среде клеток PC-12HttQ103, обработанных ПонА в течение различных периодов времени. В итоге мы получили 2 идентичные мембраны, одну из которых мы окрашивали антителами против ГАФД, а другую – антителами против polyQ. В итоге антитела окрашивали одни и те же точки, из чего можно предположить, что оба белка образуют внеклеточные агрегированные комплексы (рис. 2, В и Г). Важно отметить, что интенсивность окрашивания антителами обоих белков постепенно усиливалась со временем, что даёт основание заключить, что накопление polyQ-ГАФД комплексов во внеклеточной среде связано, главным образом, с повреждёнными клетками, производящими большее количество агрегатов.

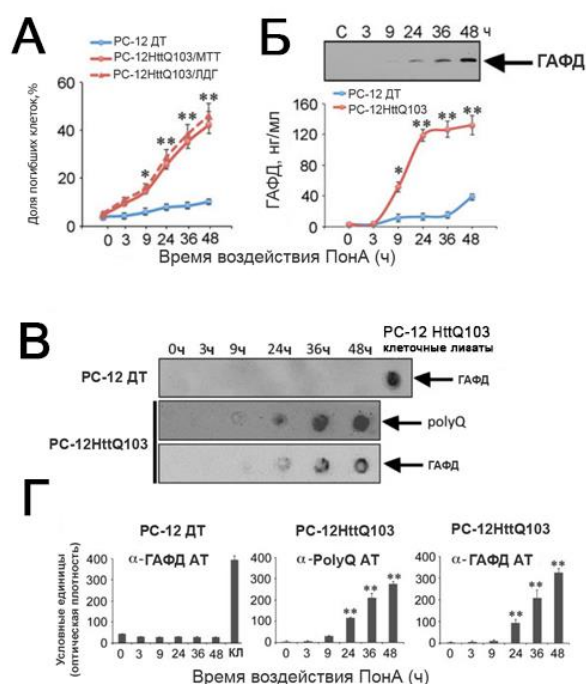


Рис. 2. (А) Жизнеспособность клеток PC-12HttQ103 и PC-12 дикого типа после индукции с ПонА, измеренная при помощи метода МТТ (непрерывная линия) и анализа активности ЛДГ (пунктирная линия).

(Б) Иммуноблоттинг кондиционированной среды клетками PC-12HttQ103 (антитела против ГАФД) и количество внеклеточной ГАФД в культуральной среде, измеренное при помощи метода двухсайтового ИФА.

(В) Ультрафильтрация кондиционированной среды клетками PC-12HttQ103 обработанных ПонА в течение указанных периодов времени.

(Г) Измерение уровня сигнала при помощи программы TotalLabQuant

Мы провели анализ кондиционированной среды, собранной от клеток PC-12HttQ103, инкубированных с ПонА в течение разных периодов времени, для того, чтобы исследовать токсичность внеклеточных агрегатов или их компонентов. Было установлено, что кондиционированная среда токсична для интактных клеток PC-12HttQ103 и PC-12 дикого типа. Через 48 ч инкубации в кондиционированной среде доля мертвых клеток достигала $56,4 \pm 6,4\%$, в популяции интактных клеток PC-12HttQ103 и $56,3 \pm 5,4\%$ для клеток PC-12 дикого типа (рис. 3, А и Б). В то же время кондиционированная среда клетками PC-12 дикого типа не вызывает какого-либо заметного повышения цитотоксичности за тот же период времени (рис. 3, А и Б).

Мы предположили, что цитотоксичность среды обусловлена наличием в ней внеклеточных polyQ-ГАФД агрегатов. Чтобы проверить эту гипотезу, мы удалили внеклеточные агрегаты polyQ-ГАФД из кондиционированной среды с помощью центрифугирования. Уровень оставшихся агрегатов определяли с помощью метода ультрафильтрации. При успешном удалении агрегатов из среды в полученных супернатантах можно было наблюдать только следовые количества polyQ и ГАФД (рис. 3, В и Г).

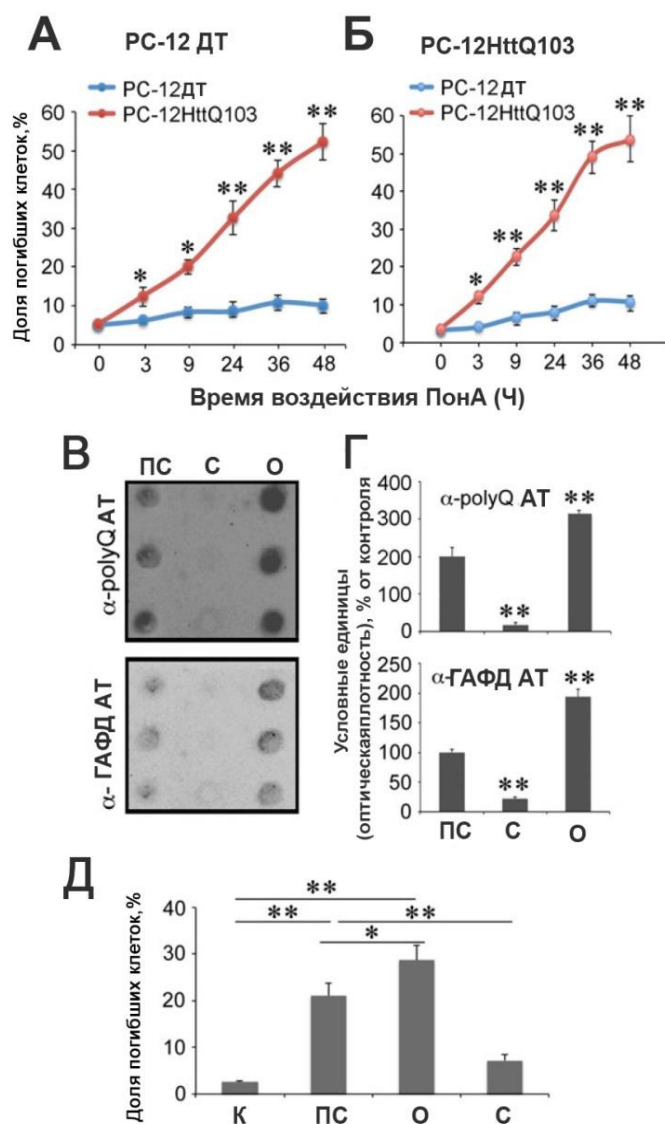


Рис. 3. (А) Кондиционированная среда от клеток PC-12HttQ103, индуцированных ПонА, является токсичной из-за наличия в ней агрегатов polyQ-ГАФД. Клетки PC-12HttQ103 и PC-12 дикого типа обрабатывали ПонА, после указанных периодов времени клетки промывали и к клеткам добавляли свежую среду без эмбриональной бычьей сыворотки на 4 ч. Затем среду собирали, добавляли к ней сыворотку и инкубировали с интактными клетками PC-12 дикого типа (А) и PC-12HttQ103 (Б). Клеточную жизнеспособность измеряли при помощи метода МТТ.

(В) Кондиционированную среду клетками PC-12HttQ103 собирали и центрифугировали. Затем измеряли количество агрегированных polyQ и ГАФДГ в полной среде (ПС), во фракции супернатанта (С) и фракции осадка (О) с помощью метода ультрафильтрации.

(Г) Измерение уровня сигнала при помощи программы TotalLabQuant.

(Д) Жизнеспособность интактных клеток после инкубации в течение 48 часов с фракциями среды, полученными после центрифугирования. Статистическая значимость $p < 0,05$ (*) или $p < 0,01$ (**).

Инкубация intactных клеток PC-12HttQ103 в течение 24 ч в кондиционированной среде, лишённой агрегатов (фракция С), не приводила к гибели клеток, в то время как инкубация в полной кондиционированной среде (ПС) вызывала гибель $22,5 \pm 3,2\%$ клеточной популяции, а инкубация с фракцией, содержащей осадки клеточных агрегатов (фракция О), вызывала ещё большую гибель клеток (рис.3, Д).

Так как агрегаты, содержащие ГАФД и HttQ103, были токсичны для клеток PC-12, важно было понять, какой из этих двух белков оказывает наибольшее влияние на цитотоксичность агрегатов. В этих опытах мы использовали клетки нейробластомы человека SK-N-SH, которые инкубировали с чистыми белками Q58 в концентрациях 5, 10 и 20 мкг/мл и ГАФД в концентрациях 10 и 30 мкг/мл в комплексе или по отдельности. Сам по себе Q58 демонстрировал невысокую цитотоксичность, и максимальный показатель клеточной смерти достигал $13,3 \pm 1,42\%$ при концентрации 20 мкг/мл (рис. 4). Цитотоксичность одиночного ГАФД была выше и достигала $15,2 \pm 2,34\%$ при концентрации 30 мкг/мл, в то время как комплексы Q58-ГАФД значительно и дозозависимо увеличили количество мертвых клеток до $33,3 \pm 2,96\%$ после 48-часовой инкубации в присутствии 20 мкг/мл Q58 и 30 мкг/мл ГАФД. В то же время, одиночный белок Q23 не токсичен для клеток SK-N-SH. На основании полученных данных мы можем заключить, что не только внутриклеточный ГАФД значительно увеличивает цитотоксичность polyQ аномальной длины в клетках, экспрессирующих мутантный НТТ[10], но и, находясь в составе внеклеточных агрегатов, он усиливает токсичность последних.

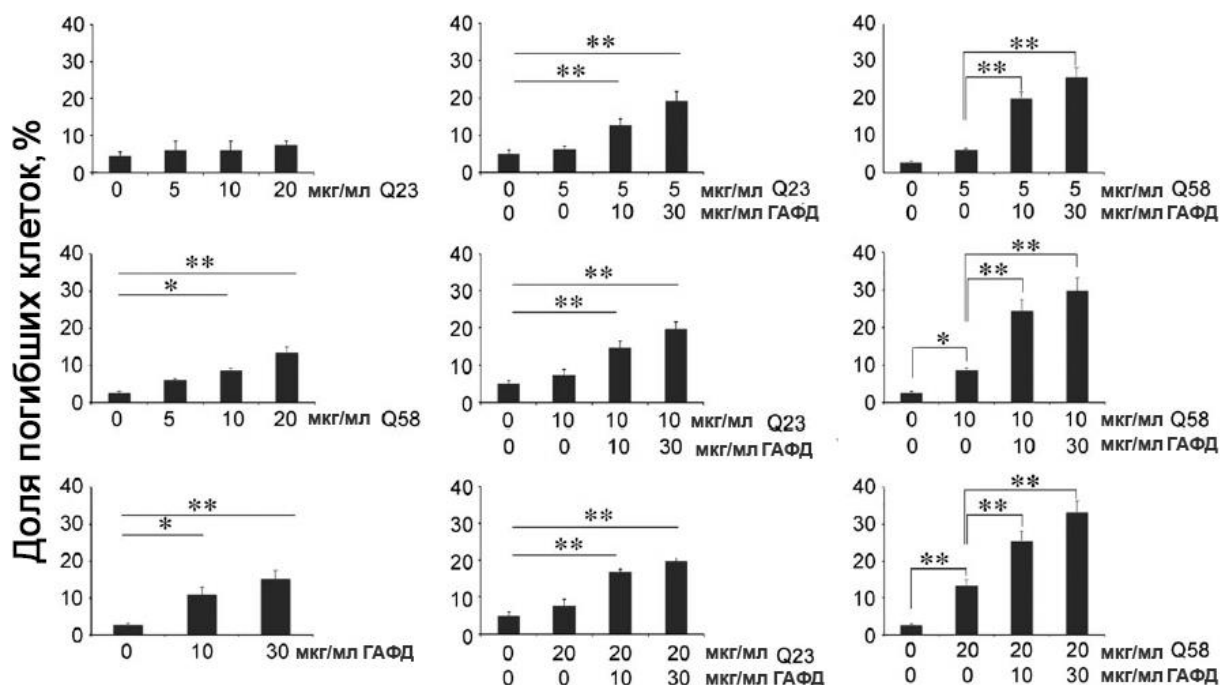


Рис. 4. ГАФД усиливает токсичность polyQ в клетках SK-N-SH

Клетки SK-N-SH высевали в лунки 96-луночных планшетов и инкубировали с Q23, Q58 и ГАФД в комплексе или по отдельности в указанных концентрациях. Через 48 ч измеряли жизнеспособность клеток. Представлены данные одного из трех репрезентативных экспериментов. Статистическая значимость * $p < 0,05$; ** $P < 0,01$.

ГАФД способствует проявлению прион-подобных свойств Q58 в нормальных клетках

Впервые прион-подобные свойства белков, имеющих аномально длинный полиглутаминовый тракт, продемонстрировали в экспериментах с синтетическим пептидом K2Q44K2, который был способен проникать в клетки COS7 [10]. Чтобы определить, может ли ГАФД влиять на проникающую способность polyQ или обладает ли сам этой способностью, мы инкубировали клетки SK-N-SH с ГАФД, меченным флуоресцентной меткой Cy5 в течение 0,5, 3, 6, 12 и 24 ч, а затем анализировали при помощи метода проточной цитометрии. ГАФД появился в клетках уже через 0,5 ч после добавления меченого фермента, а с течением времени его количество возрастало и достигало плато к 6 ч (рис. 5, А). На основании этих результатов в дальнейших экспериментах мы ограничили время наблюдения до 6 ч.

Способность ГАФД и polyQ проникать в клетки по отдельности или в комплексе друг с другом мы изучили с помощью клеточного ИФА. Клетки SK-N-SH иммобилизовали на поверхности 96-луночных планшетов и вносили в среду очищенные Q58 (патогенная форма), Q23 (непатогенная форма) и ГАФД по отдельности или в комплексах. После тщательной отмывки, фиксации и пермеабиллизации, клетки окрашивали антителами против polyQ или против ГАФД. Сигнал, полученный от окрашивания внутриклеточного фермента, принимали за фоновое значение и вычитали из полученных сигналов. С течением времени количество поглощенного клетками ГАФД увеличивалось независимо от того, был ли он добавлен к культуре клеток отдельно или в комплексе с Q23 или Q58. Также мы обнаружили, что Q23 способен самостоятельно проникать внутрь клетки, а Q58 обладает очень низкой проникающей способностью. Кроме того ГАФД способствует внутриклеточному транспорту Q58 во времени, приближая его к значениям транспорта чистого ГАФД (рис. 5, Б).

Данные, полученные в опытах с использованием клеточного ИФА, были подтверждены с помощью метода конфокальной микроскопии; было показано, что ГАФД и Q58 действительно проникают внутрь клетки, а не остаются на её поверхности. Мы обнаружили, что после 6 ч инкубации ГАФД и Q58 распределяются внутри клеток SK-N-SH преимущественно в цитоплазме. Кроме того белки колокализуются и формируют внутриклеточные агрегаты (рис. 5, В).

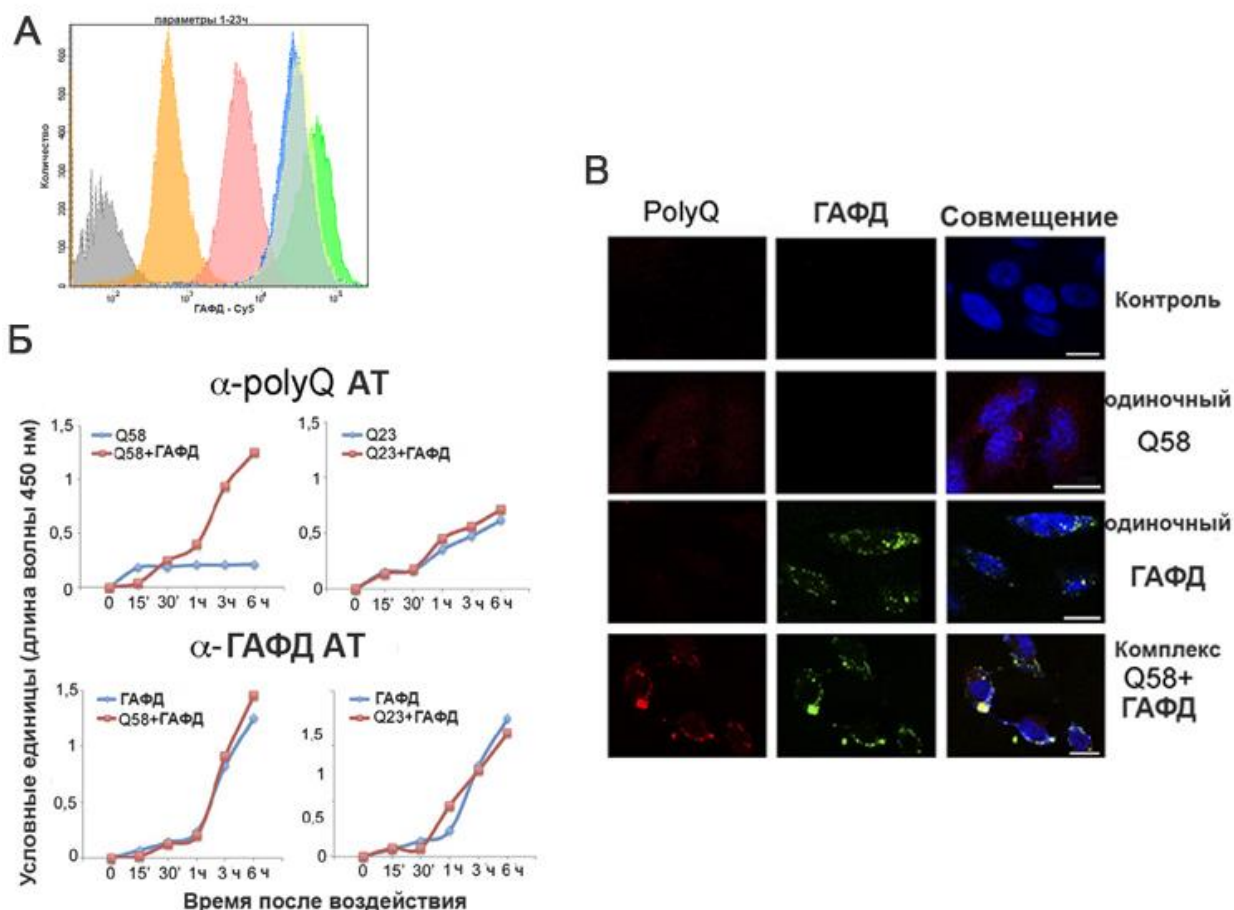


Рис. 5. (А) Клетки SK-N-SH высевали в лунки 6-луночных планшетов и инкубировали с 66 мкг/мл ГАФД, меченой красителем Cy5. Через 0,5 (серый), 3 (оранжевый), 6 (синий), 12 (желтый) и 24 ч (зеленый), клетки промывали и анализировали с помощью метода проточной цитометрии.

(Б) Изучение проникающей способности ГАФД и polyQ внутрь клетки. Клетки SK-N-SH инкубировали с Q23, Q58 и ГАФД по отдельности или в комплексе в течение указанных периодов времени. Затем клетки промывали, фиксировали, пермеабилizировали и анализировали с помощью метода клеточного ИФА с использованием антител против polyQ (верхняя панель) или против ГАФД (нижняя панель).

(В) Проникновение ГАФД и polyQ внутрь клеток. Клеток SK-N-SH высевали на покровные стекла и инкубировали с ГАФД, меченным красителем Alexa 488 (зеленый) и Q58 по отдельности или в комплексе в течение 6 или 36 ч. Затем клетки промывали, фиксировали, пермеабилizировали и окрашивали антителами против polyQ (красный). Ядра окрашивали DAPI.

Масштабная линейка: 1 мкм

Для того, чтобы определить, усиливает ли ГАФД прион-подобным свойствам polyQ (например таким, как способность вызывать агрегацию внутриклеточного НТТ с нормальной длиной глутаминовых повторов), мы трансфецировали клетки SK-N-SH плазмидой, несущей 1-й экзон гена НТТ с 25 CAG триплетами (непатогенная форма), слитыми с геном зеленого флуоресцентного белка (EGFP) (Q25-EGFP), и инкубировали эти клетки с чистыми белками Q58 и ГАФД в комплексе или по отдельности. Белок Q58 приводил к незначительной агрегации Q25-EGFP, в то время как комплекс

ГАФД с Q58, в зависимости от дозы, значительно увеличивал образование агрегатов EGFP в культуре клеток (рис. 6, А). При инкубации клеток SK-N-SH с Q23 по отдельности или в комплексе с ГАФД агрегация не происходила.

Ультрафильтрация лизатов клеток SK-N-SH, полученных в результате трансфекции плазмидой Q25-EGFP и инкубированных с Q58 по отдельности или в комплексе с ГАФД, продемонстрировала, что количество ДСН-нерастворимых агрегатов ГАФД увеличивалось дозозависимо (рис.6, Б и В). Таким образом, можно заключить, что в присутствии ГАФД Q58 не только активнее проникает в здоровую клетку, но и значительно усиливает свои прион-подобные свойства.

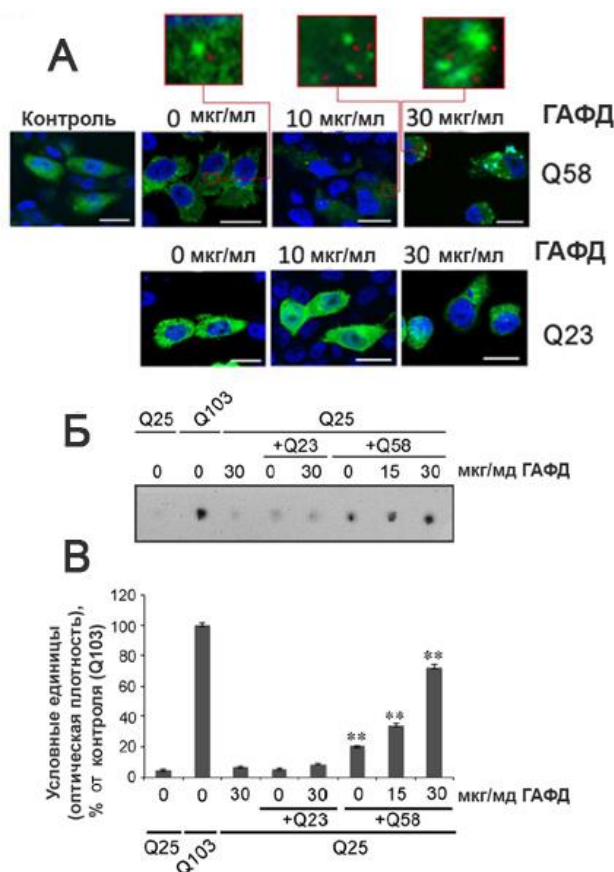


Рис. 6. (А) Клетки SK-N-SH трансфицировали плазмидой, содержащей последовательность, кодирующую первый экзон htt с Q25. Через 24 ч после трансфекции мы добавляли Q23 или Q58 по отдельности или в комплексе с ГАФД в указанных концентрациях к клеткам и инкубировали следующие 48 ч. После этого клетки фиксировали и анализировали с помощью конфокальной микроскопии. Ядра окрашивали DAPI. Масштабная линейка: 5 мкм.

(Б) Ультрафильтрация лизатов клеток, полученных в результате трансфекции плазмидой Q25-EGFP и инкубированных с Q58 или Q23 по отдельности или в комплексе с ГАФД в течение 48 часов. В качестве положительного контроля были использованы лизаты клеток SK-N-SH, трансфицированных плазмидой, содержащей Q103.

(В) Измерение уровня сигнала при помощи программы TotalLabQuant

ГАФД транспортирует polyQ внутрь живых клеток с помощью клатрин-зависимого эндоцитоза.

Механизмы, регулирующие внутриклеточный транспорт агрегатов polyQ, до сих пор остаются неясными, и в то же время заслуживает внимания изучение миграции комплексов белков. Для исследования предположительных механизмов внутриклеточного транспорта комплексов polyQ-ГАФД мы использовали подход, который использовали при изучении внутриклеточного транспорта шаперона БТШ70 в раковых клетках [14,15]. Суть этого подхода заключается в использовании ингибиторов внутриклеточного транспорта. Для предотвращения клатрин-зависимого эндоцитоза использовали динасор и хлорпромазин, для подавления кавеолин-зависимого эндоцитоза – филиппин, а для подавления макропиноцитоза – амилорид. Для нарушения внутриклеточного транспорта,

зависящего от цитоскелета, использовали цитохалазин D и нокодазол, а для разрушения липидных рафтов и подавления кавеолин-зависимого эндоцитоза – метил-бета-циклодекстрин (M β CD).

Мы исследовали проникающую способность Q58, ГАФД и их комплексов при помощи метода клеточного ИФА с использованием клеток SK-N-SH. Как показано на рис.7, одиночный Q58 не обладает существенной способностью проникать в здоровые клетки. Поскольку амилорид не подавляет проникновение чистого ГАФД, можно предположить, что пиноцитоз не вовлечён во внутриклеточный транспорт энзима. Ингибиторы кавеолин-зависимого эндоцитоза, филиппин и M β CD, также не подавляют проникновение ГАФД в клетку, в то время как ингибиторы клатрин-зависимого эндоцитоза, динасор и хлорпромазин, снижают транспорт ГАФД на $68,3 \pm 5,8\%$ и $68,9 \pm 2,6\%$, соответственно (рис. 7). Цитохалазин D является мощным ингибитором актин-зависимого эндоцитоза и снижает интернализацию ГАФД до $40,7 \pm 2,9\%$; в то время как ингибитор тубулин-зависимого эндоцитоза – на $62,36 \pm 4,2\%$. Обобщая результаты этого эксперимента, можно предположить, что ГАФД использует клатрин-зависимый эндоцитоз при проникновении в живые клетки.

Механизм транспорта комплексов Q58 и ГАФД внутри клеток SK-N-SH напоминал механизм транспорта одиночного ГАФД. Амилорид, филиппин и M β CD не подавляли проникновение комплекса Q58-ГАФД в клетки, подтверждая тем самым, что макропиноцитоз и кавеолин-зависимый эндоцитоз не участвуют в транспорте данных белков. В то же время динасор и хлорпромазин, ингибиторы клатрин-зависимый эндоцитоза, подавляли транспорт комплексов Q58-ГАФД внутрь клеток. Динасор уменьшал проникновение комплексов до $56,6 \pm 4,4\%$ (антитела против polyQ) и $57,3 \pm 5,2\%$ (антитела против ГАФД), а хлорпромазин – до $59,1 \pm 3,6\%$ (антитела против polyQ) и $64,5 \pm 6,1\%$ (антитела против ГАФД). Ингибиторы тубулин-зависимого и актин-зависимого эндоцитоза также подавляли проникновение Q58-ГАФД комплексов до $50,9 \pm 4,6\%$ и $62,9 \pm 7,1\%$ (нокодазол) и $49,5 \pm 3,2\%$ и $61,4 \pm 6,6\%$ (цитохалазин D), как показало окрашивание антителами против polyQ или против ГАФД соответственно (рис 7). Обобщая эти данные, можно сказать, что ГАФД ответственна за внутриклеточный транспорт polyQ, включая те виды белков polyQ, которые обладают прион-подобными свойствами.

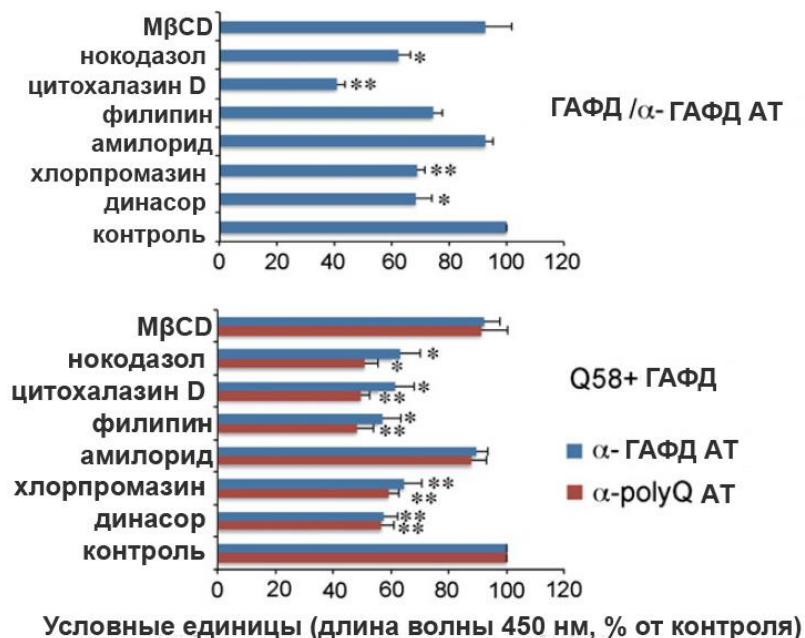


Рис. 7. Проникновение ГАФД и polyQ-ГАФД комплексов в живые клетки с использованием эндоцитозного пути. Клетки SK-N-SH инкубировали с ГАФД или Q58-ГАФД комплексами в присутствии ингибиторов внутриклеточного транспорта в течение 6 часов и анализировали при помощи метода клеточного ИФА. Представлены обобщённые данные трех независимых экспериментов. Статистическая значимость: $p < 0,05$ (*) или $p < 0,01$ (**).

В клеточной модели БХ внеклеточные агрегаты polyQ-ГАФД обладают большей цитотоксичностью, чем внутриклеточные агрегаты.

Как показывают результаты первой части этого исследования, клетки, модулирующие БХ, гибнут при росте внутриклеточных агрегатов, и агрегаты, находящиеся во внеклеточном пространстве, также токсичны для клеток. Мы пытались выяснить, какие агрегаты наиболее токсичны для клеток: внутри- или внеклеточные. Клетки PC-12HttQ103, посеянные в лунки 96-луночного планшета индуцировали к синтезу mHTT при помощи ПонА. Через 8 ч мы заменили среду на свежую, во всех лунках, кроме одной группы лунок (8 лунок на точку; 48 ч в несменяемой среде), удалив таким образом агрегаты, которые могли появиться в клеточной среде за это время. Ещё через 8 ч мы повторили процедуру, так же за исключением одной группы лунок (40 ч). Эту процедуру повторяли ещё четыре раза, и в итоге получили клетки, которым не меняли среду в течение 32, 24, 16 и 8 ч. Жизнеспособность клеток анализировали с помощью метода МТТ, а наличие агрегатов в среде – с помощью метода ультрафильтрации. Результаты ультрафильтрации показали, что чем короче было время инкубации в несменяемой среде, тем меньше агрегатов polyQ в ней содержалось (рис. 8, Б и В), и количество агрегатов в клеточной среде коррелировало с количеством мёртвых клеток в популяции клеток PC-12HttQ103.

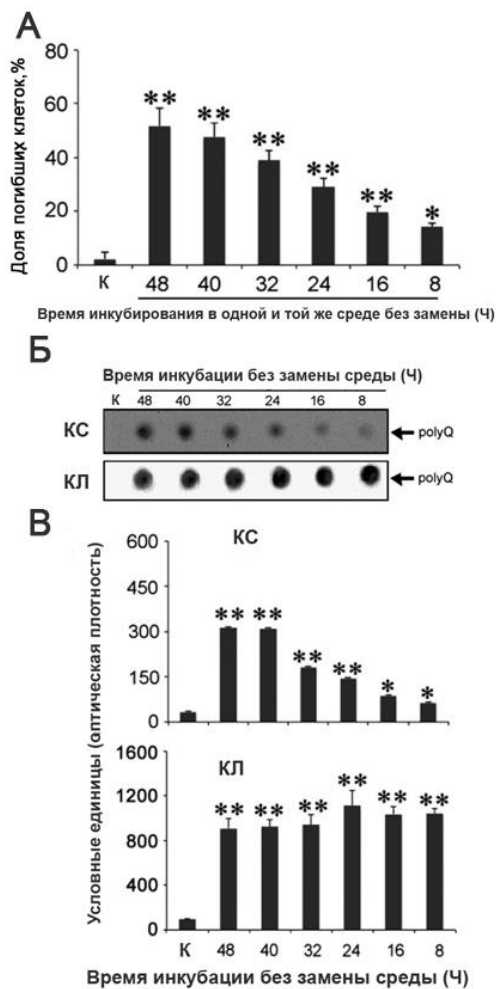


Рис. 8. (А) Клетки PC-12HttQ103 индуцировали к экспрессии Q103 с помощью ПонА. Каждые 8 часов питательные среды, содержащие агрегаты, высвобожденные из клеток, заменяли на свежую среду следующим образом: Группа 48 ч – среду не заменяли; 40 ч – среду меняли 1 раз через 8 часов после индукции ПонА; 32 ч – среду меняли 2 раза, через 8 и 16 ч после введения ПонА; 24, 16 и 8 ч – три, четыре и пять замен соответственно. Жизнеспособность клеток оценивали с помощью метода МТТ через 48 часов после индукции с ПонА.

(Б) Ультрафильтрация кондиционированной среды (1 мл) клетками PC-12HttQ103 и клеточных лизатов клеток, которым меняли среду каждые 8 часов в течение 48 часов как описано в А.

(С) Измерение уровня сигнала при помощи программы TotalLabQuant

Смертность клеток, которым заменяли среду 5 раз каждые 8 ч (8 ч культивирования в неизменной среде), составила $14,3 \pm 5,8\%$. (рис.8, А). А смертность клеток, которым не заменяли среду в течение 48 ч, составила $62,1 \pm 7,8\%$. Следует заметить, что количество внутриклеточных агрегатов в клетках не зависело от времени инкубации в свежей среде, во всех точках эксперимента оно было одинаковым (Рис. 8, Б, нижняя панель). Исходя из полученных результатов, можно сделать вывод, что внеклеточные агрегаты polyQ-ГАФД более токсичны, чем внутриклеточные агрегаты.

ОБСУЖДЕНИЕ

Агрегаты мутантных белков могут высвобождаться из клеток или тканей, передаваться другим группам клеток и вызвать агрегацию своих аналогов. Тем не менее, все эти исследования не показывают состав мигрирующих белковых комплексов. При формировании внутриклеточных агрегатов в них вовлекаются случайные клеточные белки, и одним из резидентов агрегатов tau, β -амилоида, СОД1 мутантного Htt является гликолитический фермент ГАФД.

ГАФД является ферментом гликолиза, но помимо своей основной функции он выполняет ряд дополнительных функций. Фермент ГАФД способен взаимодействовать с множеством разнообразных клеточных белков. Ранее мы показали, что ГАФД не просто является пассивным резидентом агрегатов мутантных белков, но значительно усиливает агрегацию мутантных НТТи

СОД1. Прогресс агрегации усиливается в присутствии фермента тканевой трансклутаминазы, и образующиеся агрегаты токсичны для клеток, имитирующих БХ и БАС [11]. Недавно мы показали, что ГАФД не только присутствует в агрегатах polyQ, но также усиливает агрегацию [9], а малые молекулы, связывающие ГАФД, предотвращают агрегацию polyQ в клеточной модели БХ и в трансгенных мухах [10]. Мы предположили, что подобные комплексы могут стать источником для дальнейшего межклеточного переноса mHTT, и изучили влияние ГАФД на миграцию polyQ структур в клеточной модели БХ.

В нашей работе мы показали, что индукция синтеза mHTT в клетках PC-12HttQ103 с помощью ПонА вызвала образование массивных агрегатов polyQ в клетках и их появление во внеклеточной среде. Мы показали, что (А) внеклеточные агрегаты состоят из ГАФД и mHTT и (Б) кинетика их накопления идентична кинетике накопления свободного ГАФД в среде, и, видимо, цитотоксические комплексы ГАФД и polyQ высвобождаются из мертвых клеток. ГАФД не только повышал токсичность комплекса с polyQ, но и был токсичен сам по себе.

ГАФД обеспечивает внутриклеточный транспорт polyQ, пронося последний в клетки с помощью клатрин-зависимого эндоцитоза. Проникновение комплекса в клетку приводило к прионизации клеточного НТТ нормальной длины, а увеличение доли ГАФД в комплексе дозозависимым образом ускоряло процесс прионизации. Нам удалось показать, что внеклеточные агрегаты, содержащие комплексы polyQ-ГАФД, более токсичны, чем внутриклеточные.

ВЫВОДЫ

1. ГАФД выходит из клеток с растущими агрегатами мутантного хантингтина в комплексе с последним; экспорт обоих белков и их комплексов осуществляется из мёртвых клеток.
2. Агрегаты polyQ-ГАФД более токсичны для нормальных клеток, чем каждый из белков по отдельности.
3. ГАФД способен проникать внутрь клеток и обеспечивать вхождение polyQ в нормальные клетки. Внутриклеточный транспорт комплекса polyQ-ГАФД происходит посредством клатрин-зависимого эндоцитоза.
4. ГАФД усиливает способность polyQ индуцировать агрегацию внутриклеточных нативных белков.
5. Внеклеточные агрегаты комплексов polyQ-ГАФД более токсичны, чем их внутриклеточные аналоги.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ.

1. Lazarev VF, Benken KA, Semenyuk PI, Sarantseva SV, Bolshakova OI, **Mikhaylova ER**, Muronetz VI, Guzhova IV, Margulis BA. GAPDH binders as potential drugs for the therapy of polyglutamine diseases: design of a new screening assay. FEBS Letters. 2015, 589: 581–587.
2. Lazarev VF, Nikotina AD, Semenyuk PI, Evstafyeva DB, **Mikhaylova ER**, Muronetz VI, Shevtsov MA, Tolkacheva AV, Dobrodumov AV, Shavarda AL, Guzhova IV, Margulis BA. Properties of substances inhibiting aggregation of oxidized GAPDH: Data on the interaction with the enzyme and the impact on its intracellular content. Data in Brief. 2016, 7: 524–528.
3. Lazarev VF, Nikotina AD, Semenyuk PI, Evstafyeva DB, **Mikhaylova ER**, Muronetz VI, Shevtsov MA, Tolkacheva AV, Dobrodumov AV, Shavarda AL, Guzhova IV, Margulis BA. Small molecules preventing GAPDH aggregation are therapeutically applicable in cell and rat models of oxidative stress. Free Radical Biology and Medicine. 2016, 92: 29–38.
4. Lazarev VF, Nikotina AD, **Mikhaylova ER**, Nudler E, Polonik SG, Guzhova IV, Margulis BA. Hsp70 chaperone rescues C6rat glioblastoma cells from oxidative stress by sequestration of aggregating GAPDH. Biochemical and Biophysical Research Communication. 2016, 470: 766–771.
5. **Mikhaylova ER**, Lazarev VF, Nikotina AD, Margulis BA, Guzhova IV. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase augments the intercellular transmission and toxicity of polyglutamine aggregates in a cell model of Huntington disease. Journal of Neurochemistry. 2016, 136: 1052–1063.
6. **Михайлова Е.Р.**, Лазарев В.Ф., Никотина А.Д. Роль гликолитического фермента глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы в межклеточном переносе мутантного хантингтина. Восемнадцатая Всероссийская медико-биологическая конференция молодых исследователей «Человек и его здоровье. Фундаментальная наука и клиническая медицина». Санкт-Петербург. С. 344–345.
7. **Михайлова Е.Р.**, Лазарев В.Ф., Никотина А.Д., Маргулис Б.А., Гужова И.В. Роль клеточного фермента глицер-альдегид-3-фосфатдегидрогеназы в переносе полиглутаминовых патологий. Девятнадцатая Международная Пущинская школа-конференция молодых учёных «Биология – наука 21 века». Москва, Пущино. С. 252–253.
8. **Михайлова Е.Р.**, Лазарев В.Ф., Маргулис Б.А., Гужова И.В. Межклеточный перенос мутантного хантингтина и роль фермента глицер-альдегид-3-фосфатдегидрогеназы в этом процессе. Седьмой Российский симпозиум «Белки и пептиды». Новосибирск. С. 345
9. **Михайлова Е.Р.**, Лазарев В.Ф., Никотина А.Д., Маргулис Б.А., Гужова И.В. Горизонтальный перенос полиглутаминовых патологий и роль гликолитического фермента глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы в этом процессе. V съезд биохимиков России. Сочи, Дагомыс, 4-8 октября 2016. Acta Naturae, спецвыпуск, том 2, 2016. С. 64

СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.

1. *Sugars, Rubinsztein.* (2003) Trends. Genet., 19: 233-8.
2. *Kadmiri et al* (2014) Pathol.Biol., 62: 333-336.
3. *Minjarez et al* (2013) J. Alzheimers Dis., 34: 239-262.
4. *Naletova et al* (2008) Biochim.Biophys.Acta., 1784: 2052-2058.
5. *Wang et al* (2005) FASEB J., 19: 869-871.
6. *Schulze et al* (1993) J. Neurochem., 60: 1915-1922.
7. *Wu et al* (2007) Acta.Biochim.Biophys. Sin., 39: 885-890.
8. *Koshy et al* (1996) Hum. Mol. Genet., 5: 1311-1318.
9. *Guzhova et al* (2011) Hum. Mol. Genet., 20: 3953-3963.
10. *Lazarev et al* (2015) FEBS Lett., 589: 581-587.
11. *Lazarev et al* (2013) Acta Naturae, 5: 81-89.
12. *Ren PH et al* (2009) Nat.Cell. Biol., 11: 219-225.
13. *Apostol et al* (2006) Hum. Mol. Genet., 15: 273-285.
14. *Holmes et al* (2012) Curr.Opin. Neurol., 25: 721-726.
15. *Walker et al* (2012) J. Biol. Chem., 287: 33109–33115