Амилоиды и прионы: от патогенеза к функции

Антон Александрович Нижников

3 февраля 2016, г. Новосибирск

Структура лекции

1. Определение понятий «амилоид» и «прион»;
2. Уникальные свойства амилоидных фибрилл;
3. Биоразнообразие амилоидов и прионов;
4. Амилоидомика: проблемы, успехи и перспективы.

Амилоиды и прионы

Амилоид – фибриллярный белковый агрегат, обладающий «кросс-бета» структурой;

Прион – инфекционная белковая частица

в более узком смысле:

Прион – инфекционный амилоид.

Происхождение термина «амилоид»

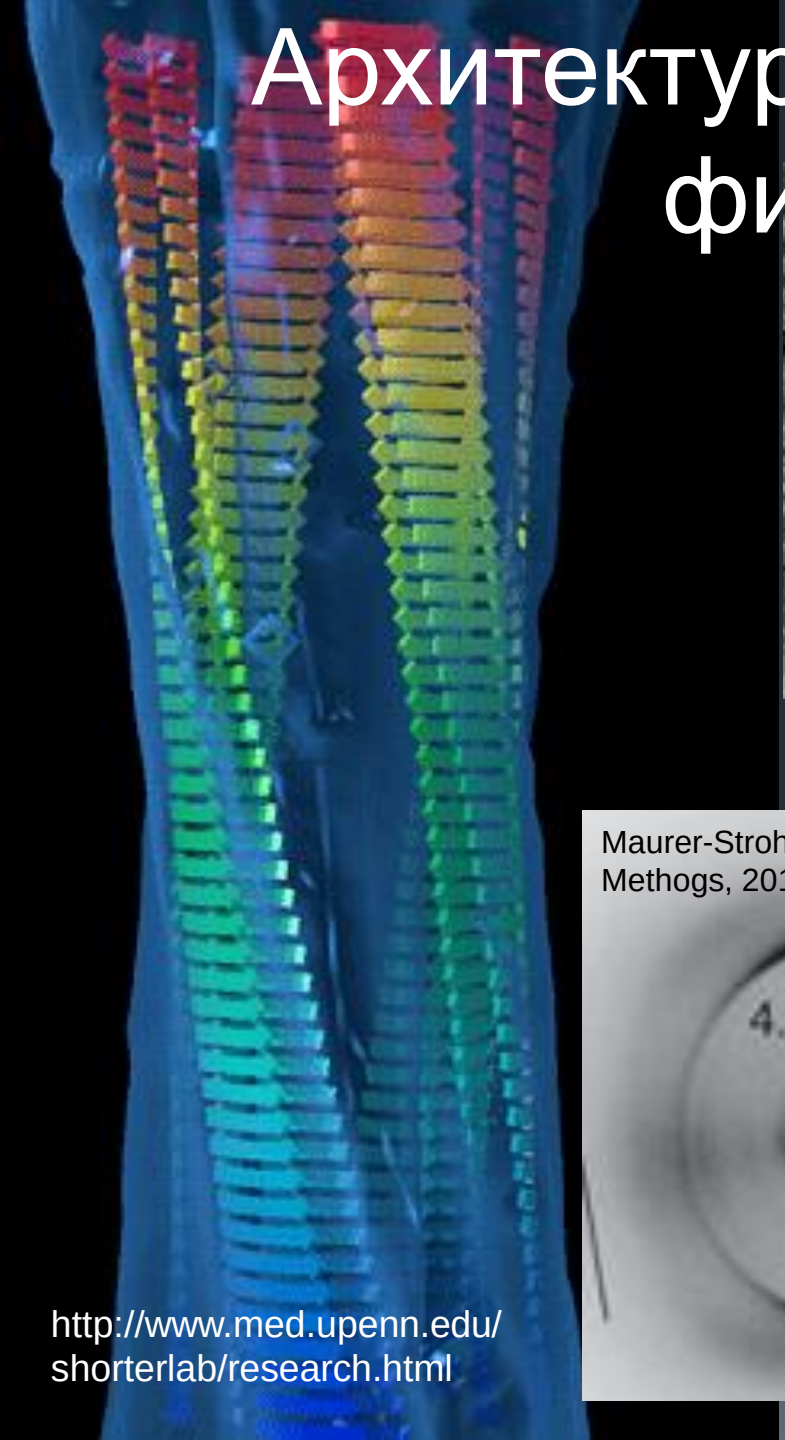
Амилоид – «крахмалоподобный», производное от латинского “amylum” и греческого “amylon” (крахмал) (М. Шлейден, 1838).

- Возможно первое описание амилоидоза у человека – 1639 г., Н. Фонтано (по: Kyle, 2001, Br. J. of Haematology).
- Р. Вирхов – применил термин «амилоид» для патологических включений в печени, окрашиваемых йодом – 1854 г. (Virchow, 1854, переиздание Virchows Arch. Path. Anat.).
- К. Фрейдрих и А. Кекуле – белковая природа амилоидов 1859 г. (по: Kelly, 1987, Topics in the Neurosciences).
- М. Прас, метод водной экстракции амилоидов, 1968 г. (Pras, 1968, J. Clin. Invest).

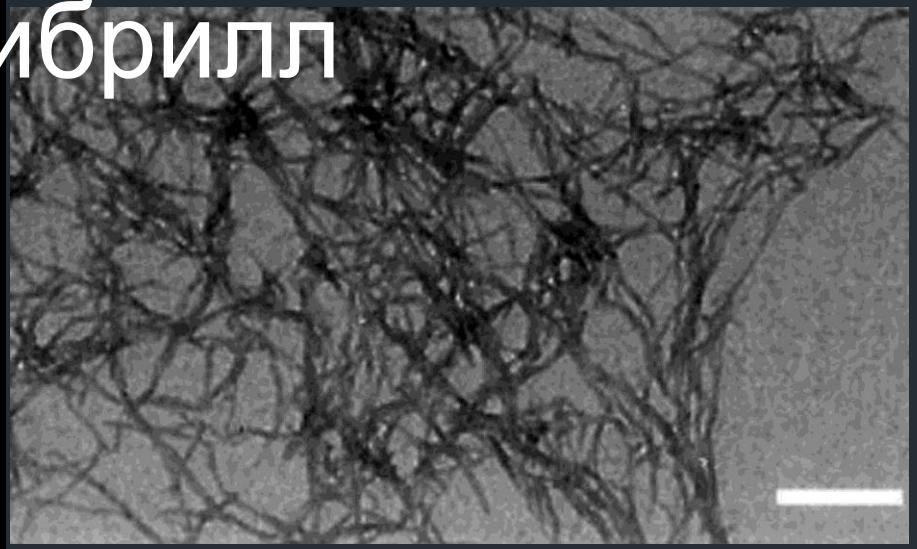
Рудольф Вирхов (1821—1902)

http://chemo.net/newpage1.htm

Архитектура амилоидных фибрилл



http://www.med.upenn.edu/shorterlab/research.html

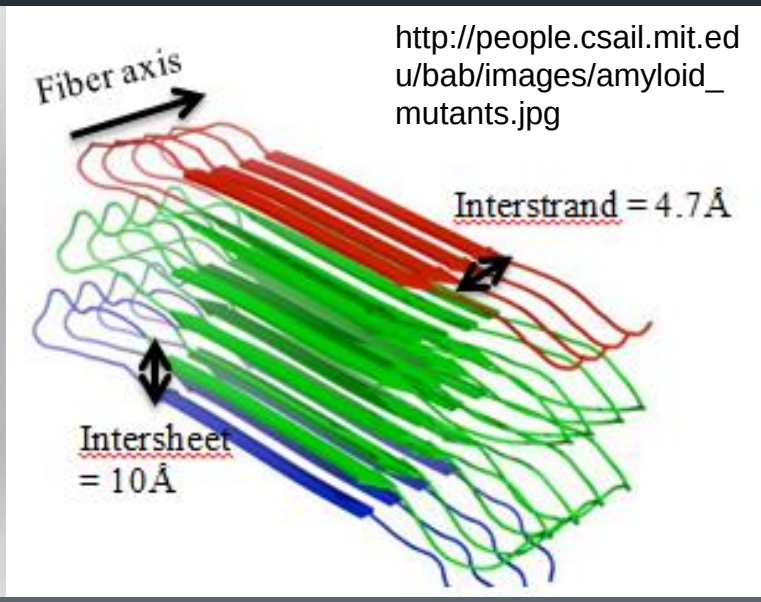


Chih-Yen King et al. PNAS 1997;94:6618-6622

«Кросс-бета» структура

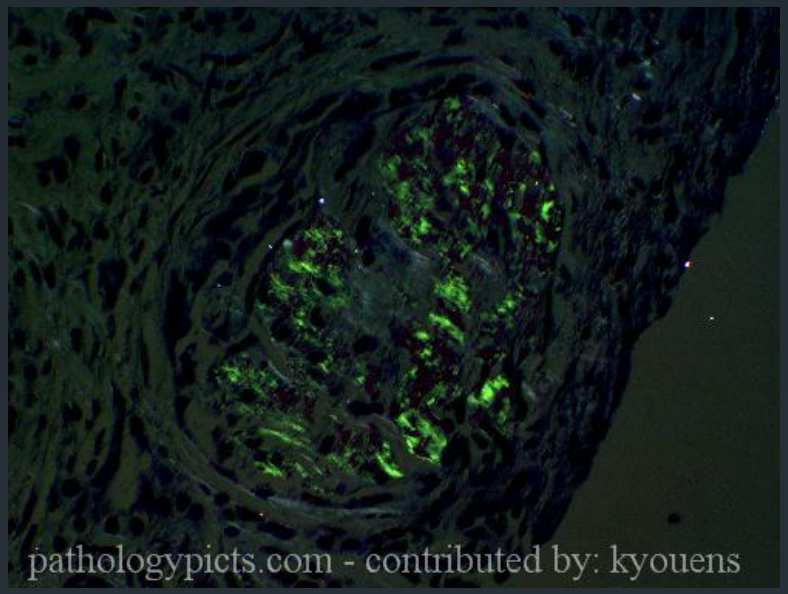
Maurer-Stroh et al., Nat. Methogs, 2010

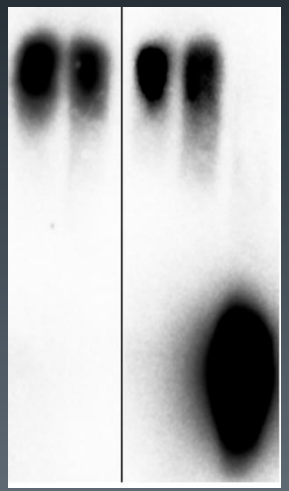
http://people.csail.mit.edu/bab/images/amyloid_mutants.jpg



Важные свойства амилоидных фибрилл, являющиеся следствием их «кросс-бета» структуры

- Двойное лучепреломление при связывании красителя Конго красного;
- «Кросс-бета» картина при рентгеновской дифракции;
- Устойчивость к обработке ионными детергентами.





1-4 Не кипяченые образцы

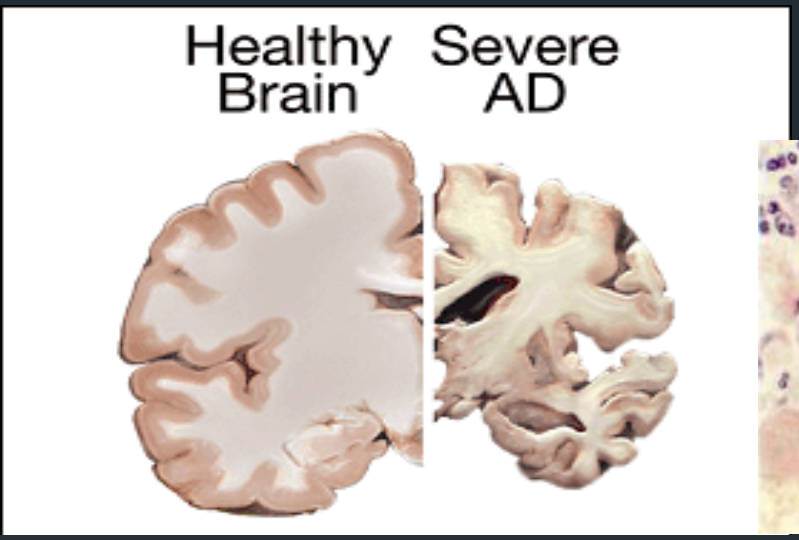
5 Кипяченый образец

Обработка 3% лаурил-саркозинатом Na

Antonets *et al.*, Biochem. (Mosc.), 2016

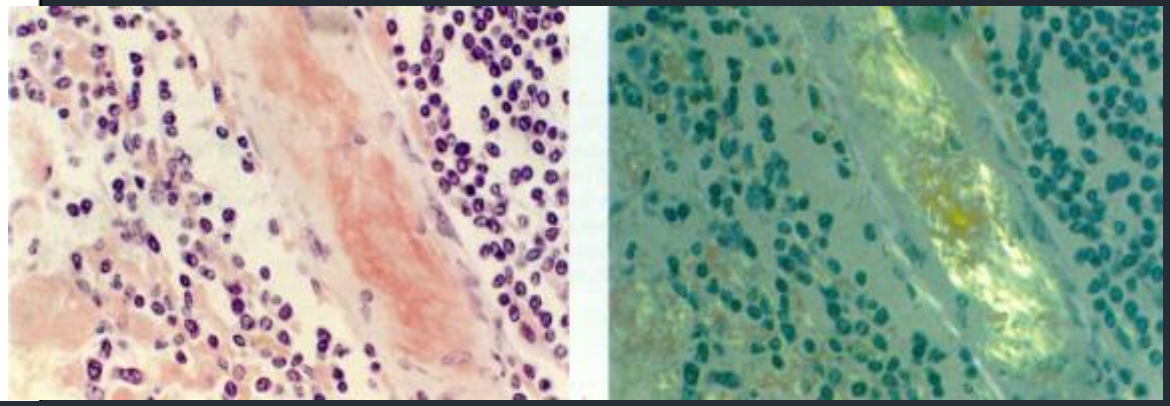
Биоразнообразие амилоидов и прионов

Патологические амилоиды



https://report.nih.gov/nihfactsheets/ViewFactSheet.aspx?csid=107

Congo red staining

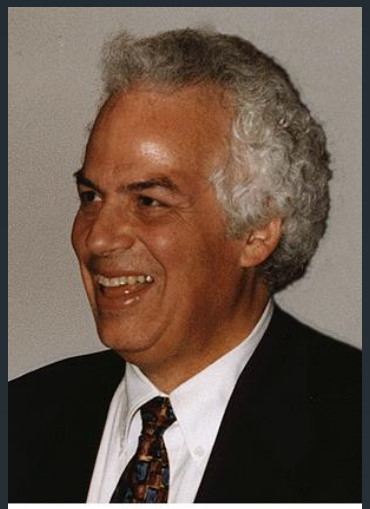


http://www.wvc.vetsuite.com/templates/ContentPages/More_Info/ClinicContentPage.aspx?guid=915f3c10-62d2-43a3-a1a5-a73f93b0437e

- Около 30 различных белков человека формируют патологические амилоиды (по: Sipe *et al*., Amyloid, 2014);
- Первичные и системные, приобретенные и наследственные амилоидозы;
- Особая группа - нейродегенеративные амилоидозы (например, б. Альцгеймера – каждый третий после 85 лет);
- Амилоидные заболевания крайне трудно поддаются лечению и только на начальных стадиях;
- В последнее время появились свидетельства в пользу того, что некоторые онкологические заболевания могут быть ассоциированы с амилоидами, формируемыми мутантным p53 (Ano Bom *et al*., J.B.C., 2012).

Прион млекопитающих PrP^{Sc}

- Prion – protein infection (particle) – инфекционная белковая частица (С. Прусинер, Нобелевская премия 1997 г.);
- Амилоиды PrP^{Sc} вызывают ряд летальных инфекционных нейродегенеративных амилоидозов человека (Куру, болезнь Кройцфельда-Якоба и др.), овец (скрепи), коров (губчатая энцефалопатия – «коровье бешенство») и ряда других млекопитающих.
- Губчатая энцефалопатия коров передается человеку в виде «нового варианта» болезни Кройцфельда-Якоба;
- Появляются свидетельства, что ряд амилоидозов, которые считались неинфекционными (б. Альцгеймера, Паркинсона и др.), потенциально могут обладать инфекционностью (напр. Jaunmuktane *et al.*, Nature, 2015).

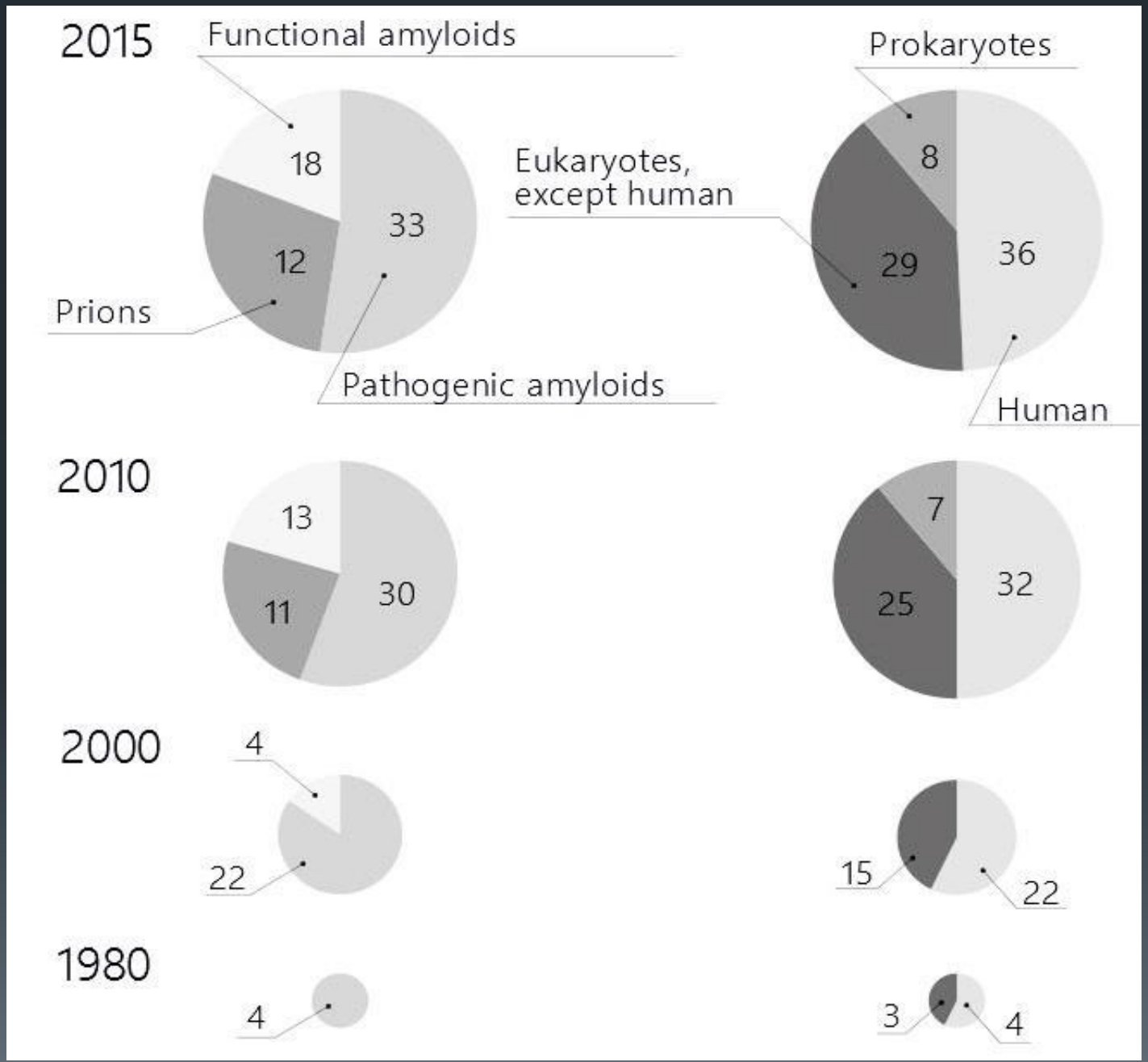


Dr. Stanley Prusiner, C '64, M '68

http://www.upenn.edu/almanac/v44/n07/100797.html

https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Prions_and_Encephalopathies

Изменение парадигмы амилоида как патогена

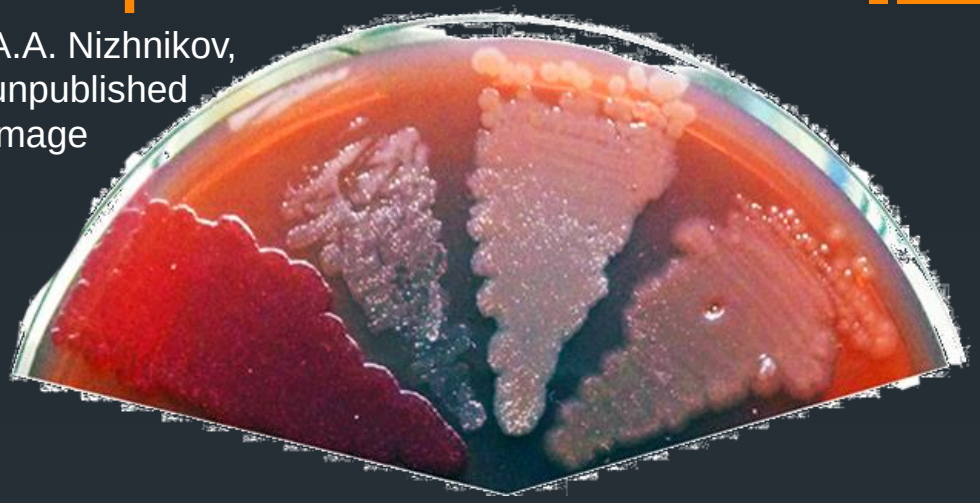


Nizhnikov *et al*., Biochem. (Mosc.), 2015

Функциональные амилоиды прокариот

- У бактерий известно не менее 6 групп функциональных амилоидов, необходимых для формирования биопленок, преодоления поверхностного натяжения, либо запасания токсинов (см. Syed and Boles, Front. in Microbiol, 2014)

- У архей недавно были показаны амилоидные свойства биопленок (*Haloferax*, см. Chimilevski *et al*., BMC Biol., 2014) и белковых оболочек (*Methanosaeta*, Dueholm *et al*., JBC, 2015)



A.A. Nizhnikov, unpublished image

Chapman Lab, https://sites.lsa.umich.edu/chapman-lab/

Функциональные амилоиды эукариот

- Белки CPEB образуют амилоиды, необходимые для формирования долговременной памяти у высших эукариот (Si *et al*., Cell, 2010 and other papers);
- PMEL контролирует биогенез меланина (Fowler *et al*., PLoS Biol, 2006);
- Ряд гормонов человека запасается в виде амилоидов (Maji *et al*., Science, 2009);
- Для TNF-индуцированного программируемого некроза необходимо формирование гетероамилоидов киназ RIP1/RIP3 (Li et al., Cell, 2012)

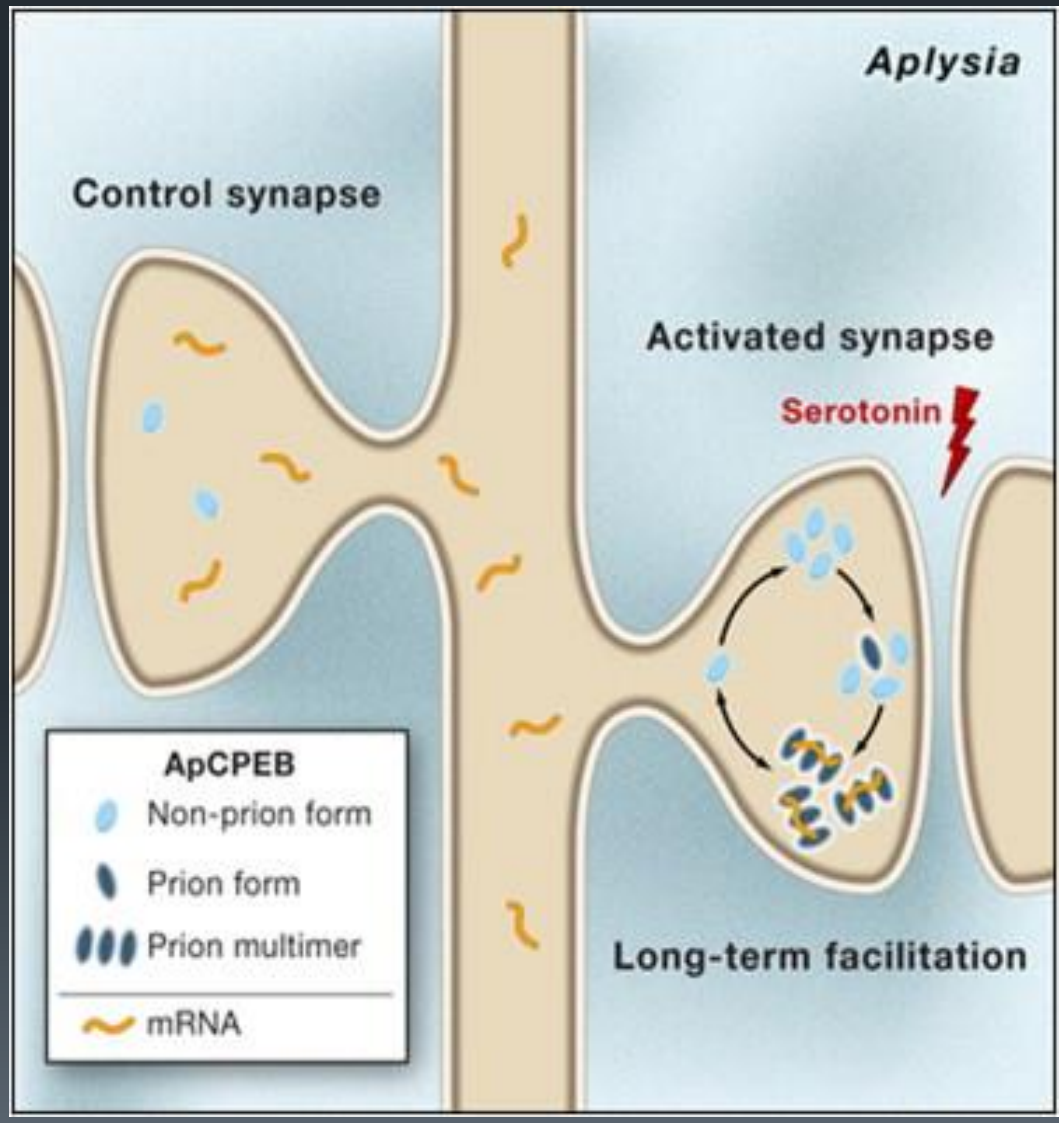


Image from Si *et al*., Cell, V. 140, p.421-435

Амилоидомика: проблемы успехи и перспективы

Проблемы в биологии амилоидов

К настоящему времени получен большой массив данных по биоразнообразию амилоидов и прионов, тем не менее:

1. Существующие биоинформатические подходы предсказывают амилоидные свойства белков с достаточно низкой эффективностью.
2. Методы для выявления амилоидов в масштабе протеома до недавнего времени отсутствовали.

Биоинформатические алгоритмы для предсказания амилоидных свойств белков

NNNQNQQQQQQQNSASDETYEWFGGYWCGA

- LPS (Harrison and Gerstein, 2003)
- SARP (Antonets and Nizhnikov, 2013)

- WALTZ (Maurer-Stroh *et al*., 2010)
- Aggrescan (Conchillo-Sole *et al*., 2007)

- Используемые в настоящее время алгоритмы для предсказания амилоидных свойств обычно анализируют композицию аминокислот (LPS, SARP, Aggrescan), а некоторые (WALTZ) учитывают и позиционную информацию.
- Существующие алгоритмы предсказывают амилоидные свойства конкретного участка, но не полноразмерного белка.

Экспериментальные методы поиска амилоидов

- Масс-спектрометрическая идентификация состава крупных амилоидных включений (болезнетворные амилоиды человека и животных)
- Полногеномные скрининги кандидатов с последующей проверкой амилоидных свойств. (крайне длительный метод: идентификация дрожжевого приона [*ISP*+] – более 10 лет, [*NSI*+] – то же самое.

Идентификация новых белков, формирующих амилоиды является трудоемкой и длительной, а методы для протеомных скринингов амилоид-формирующих белков до 2013 г. Отсутствовали (TAPI and PSIA).

Метод протеомного скрининга амилоид-формирующих белков (PSIA)

Extraction and purification of detergent-resistant protein fractions

↓

Separation of proteins using 2D-DIGE+SDS-PAGE or by LC-MALDI

↓

Mass-spectrometric identification of candidate proteins

↓

Analysis of amyloid properties of candidates (analysis of aggregation *in vitro* and *in vivo*, analysis of Congo red birefringence, etc.)

Nizhnikov *et al*., PLoS One, 2014

Идентификация комплекса детергент-устойчивых белков у бактерии *Escherichia coli* (Antonets *et al.*, Biochem. (Moscow), 2016

- При помощи трех подходов (SDS-PAGE, 2D-DIGE и LC-MALDI) в составе фракции детергент-устойчивых полимеров и комплексов достоверно идентифицирован 61 белок.
- Идентифицированные белки обладают различными функциями и локализацией
- 56 из 61 белка имеют амилоидогенные участки, предсказываемые алгоритмом WALTZ (Maurer-Stroh *et al*., 2010).
- 4 из 61 белка (BcsC, MukB, YfbK и YghJ) имеют аспарагин-глутамин обогащенные участки, выявляемым алгоритмом SARP (Antonets and Nizhnikov, Evol. Bioinf., 2013).
- В составе детергент-устойчивых фракций идентифицированы компоненты фимбрий I типа (FimA и FimH), являющиеся факторами вирулентности *E. coli.*

Взаимосвязь биоинформатических и экспериментальных данных

- Доля белков с потенциально амилоидогенными участками, выявляемыми WALTZ в выборке детергент-устойчивых белков, идентифицированных PSIA, составляет 91%, в то время как в целом по протеому *E. coli* этот показатель равен 33,2%.
- Аналогичный показатель, полученный при помощи SARP, составляют для выборки из идентифицированных белков 6,5%, а для всего протеома – 1,3% (Антонец и соавт., Биохимия, 2016).

Заключение

- Данные, накопленные к настоящему времени, показывают, что амилоиды не только вовлечены в целый ряд патогенных процессов, но и являются одним из вариантов четвертичной структуры белка, необходимых для выполнения биологических функций у прокариот и эукариот.
- Для развития биологии амилоидов необходимо решение двух основных задач:

1. Разработка экспериментальных методов для быстрого скрининга амилоидных свойств белков-кандидатов.
2. Разработка биоинформатических подходов для предсказания амилоидных свойств полноразмерных белков.