

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ  
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»  
(СПбГУ)

Кафедра молекулярной биофизики и физики полимеров

Направление «Физика»



## АНАЛИЗ МОРФОЛОГИИ МУТАНТОВ ПРИОННОГО БЕЛКА SUP 35

Магистерская работа студентки

\_\_\_\_\_ Докшковой Лолиты Борисовны

Научные руководители:

\_\_\_\_\_ д. ф.-м. н., проф. **Касьяненко Н.А.**

к.ф.-м.н. **Соколов П.А.**

Рецензент:

\_\_\_\_\_ д. б. н., доц. **Линькова Н.С.**

Санкт-Петербург  
2017

## Оглавление

1. Введение.....	4
2. Обзор литературы .....	5
2.1. Прионы, общие сведения.....	5
2.2. Болезни, вызываемые прионами.....	6
2.3. Белок Sup35 дрожжей <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , фактор [PSI <sup>+</sup> ] .....	9
2.4. Мутации в гене SUP35 .....	9
3. Методы исследования и материалы .....	10
3.1. Атомная силовая микроскопия .....	10
3.2. Сканирующий электронный микроскоп .....	10
3.3. Приготовление образцов для АСМ и СЭМ.....	11
3.4. Обработка изображений с помощью NanoScope Analysis, FibrilJ .....	11
3.5. Материалы.....	12
4. Экспериментальные результаты и их обсуждение .....	13
4.1. Анализ изображений, полученных методом АСМ.....	13
4.1.1. Анализ фибрилл прионного белка Sup35NMr-wT .....	13
4.1.2. Анализ фибрилл прионного белка Sup35NMr-M0.....	18
4.1.3. Анализ фибрилл прионного белка Sup35NMr-M1 .....	20
4.1.4. Анализ фибрилл прионного белка Sup35NMr-M2.....	22
4.1.5. Анализ фибрилл прионного белка Sup35NMr-M3.....	24
4.1.6. Анализ фибрилл прионного белка Sup35NMr-M4.....	26
4.1.7. Анализ фибрилл прионного белка Sup35NMr-M5.....	28
4.1.8. Сводная таблица линейных характеристик для дикого типа белка Sup35NMr и его мутантных форм. ....	30
4.2. Анализ изображений, полученные методом СЭМ.....	31
4.2.1. Анализ фибрилл прионного белка Sup35NMr-wT .....	31
4.2.2. Анализ фибрилл прионного белка Sup35NMr-M0.....	32
4.2.3. Анализ фибрилл прионного белка Sup35NMr-M1 .....	34

4.2.4.	Анализ фибрилл прионного белка Sup35NMr-M2.....	36
4.2.5.	Анализ фибрилл прионного белка Sup35NMr-M4.....	37
4.2.6.	Анализ фибрилл прионного белка Sup35NMr- M5.....	39
4.2.7.	Сводная таблица линейных характеристик для дикого типа прионного белка Sup35NMr и его мутантных форм. ....	41
4.3.	«Шубы» дикого типа и мутантов прионного белка Sup35NMr. ....	42
4.4.	Результаты.....	45
5.	Выводы.....	47
6.	Благодарности.....	48
7.	Список литературы .....	49

## 1. Введение

На сегодняшний день известно, что причиной большого количества заболеваний является аномальное формирование пространственной структуры белков. В том случае, если по каким-то причинам белок перешел в неправильное состояние, это может привести к формированию амилоидов - фибриллярных структур. Длинные и жесткие нити могут образовывать бляшки в мозгу, почках и других органах, вызывая такие болезни как: Амилоидоз, болезнь Альцгеймера и т. д.

Прионы — это инфекционные агенты, механизм действия которых основан на изменении конформационной структуры белков. Белки, способные прионизоваться, найдены как у высших, так и у низших эукариот. Одним из самых изученных является фактор  $[PSI^+]$  — прионная форма белка Sup35 дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. На биологическом факультете Санкт-Петербургского государственного университета был получен набор из шести мутаций этого белка. Задачей данной работы, было исследовать линейные характеристики образовавшихся агрегатов для каждой мутации. Эти данные могут помочь в дальнейшем определить факторы, обеспечивающие стабильность таких структур и на основе этого создать лекарственные средства, блокирующие их образование.

## 2. Обзор литературы

### 2.1. Прионы, общие сведения.

Прионы — это особый класс инфекционных агентов, представляющих собой белки в аномальной конформации. Они способны менять конформацию нормального клеточного белка, таким образом увеличивая свою численность. Интересно, что это первый случай схожего поведения белков с вирусами. В данном процессе не используется нуклеиновая кислота, но при этом происходит увеличение численности. Открытие прионов произошло сравнительно недавно. Долгое время природа инфекционного агента оставалась неизвестной. В 1966 году было обнаружено, что болезнь скрэйпи, известная под названием «Почесуха овец», невероятно устойчива к ионизирующей радиации и ультрафиолету, это никак не согласовывалось с предположением, что скрэйпи вызывается вирусом. Животные страдали от зуда и чувствовали боль во время движения. Было выявлено, что проблема сосредоточена в головном мозге. В 1967 году Д. Гриффит впервые высказал идею о инфекционном клеточном белке, который каким-то образом изменил свою форму. Спустя десять лет ученые смогли выделить инфекционный агент, вызывающий болезнь овец. Это дало новый толчок в изучении подобных агентов, было выяснено, что они очень устойчивы к нагреванию, сохраняют структуру даже после обработки протеиназой К, мочевиной, различными солями и агентами. Таким образом, они проявили все свойства гидрофобных белков. Таким инфекционным агентам дали название — прионы или prion (proteinacious — «белковая» infectious — «инфекционная» particle — «частица»).

Прионы вызывают формирование амилоидов, которые еще раньше находились под пристальным вниманием ученых в связи тем, что они вызывают различные заболевания. Амилоиды представляют собой белковые агрегаты, плотно упакованные в  $\beta$ -слои, которые формируют фибриллы. Раньше считалось, что такие агрегаты растут только с одного конца, но на сегодняшний день существует много свидетельств тому, что они могут расти с двух сторон. Амилоиды печально известны тем, что они связаны с такими заболеваниями как: болезнь Альцгеймера, амилоидоз, болезнь Хантингтона, «коровье бешенство», болезнь Паркинсона, диабет второго типа и т.д.

Были зафиксированы случаи, когда агрегированные белки принимали участие в клеточной жизни. Например, в клетках млекопитающих в ответ на стресс образуются многокомпонентные рибонуклеиновые комплексы, которые участвуют в остановке трансляции и дают клетке время на преодоление неблагоприятных условий. Белки TIA-1 и CREB являются яркими представителями описанного выше случая. Они способны связываться с РНК и также способны образовывать

амилоидные структуры. Белок CPEB обладает еще дополнительными функциями, например, он принимает участие в процессах формирования долгосрочной памяти у моллюска *Aplysia californica*. Схожей функцией обладает белок Orb2 в клетках мухи *Drosophila melanogaster*. Так же интересно упомянуть белок MAVS, найденный у млекопитающих. Он формирует амилоидные агрегаты в ответ на вирусную инфекцию и в результате последовательных реакция запускает синтез интерферона  $\beta$ . Белок Pmel17 в агрегированной форме участвует в созревании меланосом и участвует в процессах полимеризации меланина. Некоторые гормоны животных могут запасаться в виде амилоидных агрегатов. У членистоногих и рыб некоторые белки образуют амилоиды, а также в агрегированном состоянии находятся в составе оболочек яиц. У некоторых пауков белки в амилоидной конформации находятся в составе паутины. Всё эти данные указывают на необходимость дальнейшего исследования и детального изучения агрегирования прионных белков.

## 2.2. Болезни, вызываемые прионами.

Как уже было сказано выше, агент, вызывающий болезнь скреэпи получил название прион. Он представляет собой белок Prion Protein (PrP), кодируемый геном PrNP, который присутствует в геноме всех млекопитающих, птиц, рыб. Это мембранный белок, экспрессирующийся в клетках центральной нервной системы и лимфоретикулярной ткани. Были введены специальные обозначения для нормальной «правильной» формы — PrP<sup>c</sup> и для патологической формы, вызывающей различные заболевания — PrP<sup>Sc</sup>. Обе формы имеют одинаковую аминокислотную последовательность, различаются лишь пространственной структурой. С помощью метода ядерного магнитного резонанса было обнаружено, что в правильной конформации белок содержит 42%  $\alpha$ -спиралей и 3%  $\beta$ -структур, а в патологической форме 30%  $\alpha$ -спиралей и 43%  $\beta$ -структур, следовательно, приобретение инфекционных свойств связано с конформационным переходом, при котором образуются  $\beta$ -складки.

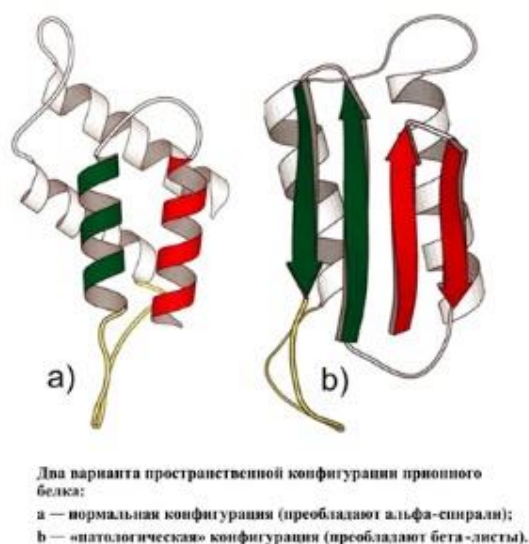


Рис.1

В форме PrP<sup>Sc</sup> белок гораздо более устойчив к любым воздействиям, поэтому до сих пор при диагностике прионных заболеваний используется обработка протеиназой К соскоба ткани миндалевидных желез.

Стенли Прузинер сформулировал следующую прионную концепцию:

- инфекционным является агент PrP<sup>Sc</sup>;
- инфекционный агент PrP<sup>Sc</sup> может реплицировать себя в отсутствие нуклеиновых кислот;
- превращение белка из нормальной формы в инфекционную происходит путем конформационного перехода;
- конформационный переход может происходить спонтанно, либо при употреблении зараженной пищи, также при пересадке инфицированных тканей, использовании плохо обработанного скальпеля, при попадании различными путями прионного агента извне.

Переход в «неправильную» конформацию может спровоцировать мутация в гене PrNP.

Губчатая энцефалопатия крупного рогатого скота или «коровье бешенство» также является прионной болезнью. Существует предположение, что болезнь скрэппи «почесухи овец» передалась крупному рогатому скоту, в тот момент, когда их кормили мясокостной мукой, которую изготавливали из больных овец. Даже изменив технологию переработки сырья животного происхождения так и не смогли обеспечить инактивацию возбудителя. Инкубационный период от года, до четырех лет. Преодолевают видовой барьер, заболеть могут другие животные, а также человек. Восприимчивость и скорость протекания болезни зависит от генетической характеристики инфицированного. Попав в организм, прионы начинают увеличивать своё

количество сначала в миндалинах, лимфоузлах, селезенке, толстом кишечнике, затем попадают в центральную нервную систему и локализуются в отделе головного мозга. Распространение на этом не заканчивается, прионы доходят в конечном итоге до передних областей головного мозга. При этом прионы вызывают амилоидоз, происходит дегенерация нервной ткани. Чаще всего «коровьем бешенством» страдают высокопродуктивные коровы молочного направления, реже поражаются животные на откорме. Болезнь проявляется в нарушении поведения, двигательных функций. Коровы ведут себя беспокойно, брыкаются, непрерывно облизываются, выступает сыпь на коже. При прикосновениях животное вздрагивает, также могут возникать судороги. В дальнейшем снижается удой, пропадает аппетит, появляется слабость в конечностях. После смерти не наблюдается каких-то особых признаков или особенностей, только лабораторный анализ способен диагностировать данное заболевание. В конечном итоге все прионные заболевания ведут к гибели.

Сильное влияние на изучение инфекционных белков оказала болезнь «Куру». Болезнь была распространена в районах Новой Гвинеи у аборигенов племени «Форе». Местные жители считали, что эта болезнь является сглазом или порчей шамана соседнего племени. Симптомы такие же, как и у всех прионных заболеваний: конвульсии, тремор, деменция (слабоумие), расстройство координации движений (атаксия), поведенческие и личностные изменения. Заболеванию были больше подвержены женщины и дети. По прошествии девяти-двенадцати месяцев с начала острой стадии болезнь заканчивалась смертельным исходом. Переломным моментом стал приезд Карлтона Гайдузек(Гайдушека), который заинтересовался данным явлением. Прожив вместе с аборигенами продолжительное время, он сделал вывод, что болезнь связана с традицией каннибализма, поедания собственных соплеменников, тем самым выражая им почет. Больше всего ценился мозг погибшего, поэтому его отдавали детям, считая, что они тем самым «забирают» себе ум и опыт умершего. В этот момент и происходило инфицирование. Болезнь проявлялась примерно через четыре года, но также есть случаи, когда обострение наступало спустя тридцать лет и более. На данный момент, племя пересмотрело свои взгляды на жизненные устои, и обряды прекратились, но из-за столь продолжительной стадии инкубации до сих пор фиксируются случаи заболевания. Также хотелось бы отметить, что Гайдузек смог передать болезнь Куру шимпанзе, тем самым доказав свою теорию. и при этом он продемонстрировал способность прионов к межвидовому распространению.



### 2.3. Белок Sup35 дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, фактор [PSI<sup>+</sup>]

Белок Sup35 выполняет функцию фактора терминации трансляции в клетках дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Он состоит из трех доменов: N, M, C. Основную функцию белка выполняет C-домен, в то время как роль M- и N-доменов до конца не ясна. Этот белок способен менять свою нативную конформацию на аномальную, в результате чего образуется прионная форма [PSI<sup>+</sup>] (Wickner, 1994). Известно, что M-домен влияет на стабильность инфекционного белка. В его присутствии она усиливается. Но главным участником образования прионной формы, является N-домен. Без него не было зафиксировано случаев перехода белка в патогенную форму. Для прионов характерно наличие большого количества аспаргиновых и глутаминовых остатков. N-домен в полной мере соответствует данной характеристике. В случае возникновения прионной формы [PSI<sup>+</sup>] снижается эффективность терминации трансляции, а вероятность распознавания преждевременного стоп-кодона как значащего увеличивается. По увеличению нонсенс-супрессии можно судить о наличии прионов в клетках дрожжей. (Сох, 1964; Liebman et al., 1979)

Прионизовавшись, белок Sup35 может образовывать длинные вытянутые структуры как *in vivo* так и *in vitro*. В отличие от прионов, образующихся у человека, прионы дрожжей не всегда приводят к патологии. Дрожжи могут влиять их на количество в клетке.

### 2.4. Мутации в гене SUP35

Как сообщалось ранее, именно N-домен белка Sup35 необходим для образования прионов. (Ter-Avanesyan et al., 1994) Исходя из этих соображений, мутации производились именно в этой части белка, который состоит из серии олигопептидных повторов, обогащенных глутамином и аспаргином. Названия указывают на номер олигопептидного повтора, в котором была произведена мутация: Sup35-M0, Sup35-M1, Sup35-M2, Sup35-M3, Sup35-M4, Sup35-M5. Структура прионов стабилизируется, благодаря водородным связям, возникающим между полярными незаряженными аминокислотами. Последние заменялись на заряженные, из-за чего они начинают отталкиваться друг от друга. Это влияет на стабильность и способность их прионизоваться. В случае M1 и M2 мутаций наблюдается исчезновение прионов *in vivo*. (Бондарев, 2014).

### 3. Методы исследования и материалы

#### 3.1. Атомная силовая микроскопия

Атомно-силовая микроскопия (АСМ) — вид зондовой микроскопии, в основе которого лежит силовое взаимодействие атомов (строго говоря, обменное взаимодействие атомов зонда и исследуемого образца). Для того, чтобы “почувствовать” взаимодействие атома с атомом, необходимо, чтобы острие зонда было сравнимо с атомными размерами. Вследствие этого обычно используемые в АСМ зонды имеют размеры острия от десяти нанометров до одного атома. Длина их обычно варьируется от одного до двух микрометров. Зонд расположен на свободном конце кантилевера. Чем меньше радиус кривизны и угол схождения острия, тем меньше его влияние на получающееся изображение исследуемого объекта. Консоль – это упругая пластинка, по отклонению которой можно судить о силе взаимодействия острия с образцом. Когда остриё приближается к образцу, между ними начинают действовать силы обменного взаимодействия. В зависимости от того, насколько мало расстояние между остриём и образцом, это будет сила либо притяжения, либо отталкивания. Наглядное трёхмерное изображение поверхности получается лишь после соответствующей математической обработки цифровой информации, в качестве которой выступают двумерные массивы целых чисел, например, отклонения кантилевера. Всю вычислительную работу выполняет компьютер и выдаёт в качестве результата уже готовое изображение.

АСМ изображения были получены с помощью микроскопа, расположенного в лаборатории молекулярной биофизики СПбГУ.

#### 3.2. Сканирующий электронный микроскоп

Сканирующий электронный микроскоп (СЭМ) — прибор, относящийся к классу электронной микроскопии, принцип действия которого основан на использовании электронного пучка вместо светового. Может разрешать объекты до 0.4 нанометра. Сфокусированный пучок электронов сканирует поверхность исследуемого образца, при этом детектор регистрирует сигнал, возникающий в результате взаимодействия электронов с веществом. В схему сканирующего электронного микроскопа входит источник электронов, система фокусировки электронов, детектор регистрации сигнала, камера с образцами, система откачки для создания вакуума (для предотвращения взаимодействия пучка электронов с воздухом). В качестве источника электронов могут использоваться термоэмиссионные источники (основанные на явлении испускания

электронов при нагреве) либо автоэмиссионные (испускание электронов в сильном электрическом поле). В процессе сканирования образца сфокусированным электронным пучком происходит эмиссия вторичных электронов, которые регистрируются детектором. При таком способе сканирования мы получаем информацию о координатах пучка на образце, а также величину сигнала с детектора. Таким образом, изображение образца получается путем прописывания в каждой точке яркости пропорциональной величине сигнала, полученного детектором.

Снимки были получены с помощью сканирующего электронного микроскопа на базе ресурсного центра Санкт-Петербургского государственного университета Нанотехнологии.

### 3.3. Подготовка образцов для АСМ и СЭМ

На кремний и сколотую слюду наносили 10 мкл раствора и выдерживали 1 минуту. После этого подложка промывалась слабым напором дистиллированной воды в течение трех-четырех секунд и продувалась воздухом. При указанных условиях фибриллы хорошо фиксируются на подложку. После этого проводились измерения на АСМ. Для атомно-силового микроскопа мы использовали подложки из кремния и слюды. Затем все кремниевые подложки, на которых были детектированы фибриллы, исследовались на сканирующем электронном микроскопе. Все это было сделано для каждой мутации и дикого типа прионного белка Sup35N<sup>Mr</sup>.

### 3.4. Обработка изображений с помощью NanoScope Analysis, FibrilJ

Обработка изображений проводилась программой NanoScope Analysis. Для выравнивания поверхности использовались команды Flatten и Plane Fit. Все изображения переводились в черно-белый диапазон, для обработки в FiJi с использованием плагина FibrilJ (Sokolov, 2017). Программа выдает значения длин, площадей, диаметров, персистентных длин посчитанных для агрегатов. Для этого с помощью инструментов, реализованных в ImageJ/FiJi на изображения с фибриллами, накладывалась маска из осевых линий, границ и радиус векторов. Программа выдает диаметры, посчитанные по трём различным алгоритмам. В первом случае находится площадь объекта, которая делится на длину осевой линии. Второе значение диаметра – есть среднее арифметическое между удвоенными значениями минимальных расстояний от осевой линии к границе объекта и значениями, найденными как пересечения с границей объекта перпендикуляров к осевой линии (в дальнейшем D1). Третий — это DM (Distance Map). В этом случае рассматривается черная фибрилла на белом фоне, далее крайним пикселям присваивается интенсивность 1, следующим за ними 2 и т. д. пока не дойдет до центральной линии. Таким образом интенсивность центральной

линии, умноженная на 2 и на длину одного пикселя — есть искомый диаметр. Расчет персистентной длины производился следующим образом: ввели понятие «секции» - линейный сегмент, соединяющий два смежных пикселя на осевой линии. Значение квадрата радиус-вектора определялось как расстояние от конца одной секции до начала другой ( $\langle R_i^2 \rangle$ ) разделенных вдоль осевой линии  $S_i$ .

$$PL(S_i) = \frac{1}{2} \frac{\langle R_i^2 \rangle}{S_i} \quad (1)$$

Формула (1) для расчета персистентной длины части фибриллы от 0 до  $i$  сегмента.

В нашем случае берется персистентная длина участка из 0 — 2 сегмента, 0 — 3 сегмента...0 —  $N$ . Далее все они усредняются с весом равным длине участка.

Непосредственно перед загрузкой изображения, можно задать параметры для фильтрации агрегатов, а именно указывать максимально возможный радиус, количество пересечений. Объекты, длины которых, меньше заданного значения максимального радиуса так же отбрасывались. Затем выдается изображение с наложенной маской и пронумерованными объектами, которые не были отфильтрованы. По изображению проводили контроль выбранных параметров. Затем, значения средних диаметров полученные для каждого изображения объединялись и аппроксимировались нормальным распределением. Все построения производились в программе MagicPlotPro.

### 3.5. Материалы

В работе исследовались прионы дрожжей Sup35NMP дикого типа и его мутантные формы Sup35NMP M0, Sup35NMP M1, Sup35NMP M2, Sup35NMP M3, Sup35NMP M4, Sup35NMP M5. Все белки были получены на биологическом факультете Санкт-Петербургского государственного университета. Для того, чтобы получить фибриллы, соответствующие белки помещали в натриевый фосфатный буфер (pH=7.4, NaCl=0.15M).

## 4. Экспериментальные результаты и их обсуждение

В данной работе были исследованы линейные характеристики прионного белка Sup35NMr дикого типа и его мутантных форм. Изображения фибрилл, были получены с помощью атомно-силовой микроскопии (АСМ) и сканирующего электронного микроскопа (СЭМ). Для изображений, полученных с помощью АСМ были посчитаны значения диаметров структур, высот, персистентных длин (характеризуют жесткость цепи), значения контурной длины. В случае СЭМ изображений анализировались те же параметры, за исключением высоты (принцип построения изображения сканирующим электронным микроскопом не позволяет получить данные о высоте объекта). Так же были исследованы «шубы» мутантов прионного белка Sup35NMr.

На биологическом факультете Санкт-Петербургского государственного университета был получен белок Sup35NMr дикого типа и его шесть мутантных форм следующих концентраций  $C(\text{Sup35NMr wT}) = 50\text{мг/мл}$ ,  $C(\text{Sup35NMr M0}) = 50\text{мг/мл}$ ,  $C(\text{Sup35NMr M1}) = 30\text{мг/мл}$ ,  $C(\text{Sup35NMr M2}) = 50\text{мг/мл}$ ,  $C(\text{Sup35NMr M3}) = 52\text{мг/мл}$ ,  $C(\text{Sup35NMr M4}) = 59\text{мг/мл}$ ,  $C(\text{Sup35NMr M5}) = 50\text{мг/мл}$ . Все белки были растворены в 8 М гуанидин гидрохлориде GuHCl. Для агрегации мономерного белка с дальнейшим образованием фибриллярных структур 0,5 мкл исходного белка смешивалось с 100 мкл фосфатного буфера. Растворы выдерживались 48 часов при  $+2^\circ\text{C}$  —  $+5^\circ\text{C}$ , затем высаживались на слюду и кремний для наблюдения с помощью атомного силового микроскопа и только на кремний для наблюдения с помощью сканирующего электронного микроскопа. При таких условиях на подложку высаживается большое количество фибрилл, при этом подложка из слюды покрывается слоями мономерного белка.

Первая часть исследования была посвящена в большей части оценке диаметров фибрилл, так как этот параметр важен в моделировании данных структур. Большое количество работ было посвящено получению линейных характеристик фибрилл, но не была изучена связь получения изображений для разных методов, в частности для АСМ и СЭМ. В нашей лаборатории ранее были проанализированы фибриллы дикого типа, данная работа является продолжением предыдущей, так как включает в себя исследование шести мутаций белка Sup35NMr.

### 4.1. Анализ изображений, полученных методом АСМ

#### 4.1.1. Анализ фибрилл прионного белка Sup35NMr wT

Изображения АСМ дикого типа wT Sup35NMr представлены на рис.4.1.1(1) На первых двух отчетливо виден слой мономерного белка в виде островков. На последнем изображении концентрации мономерного белка больше в десять раз, в сравнении с двумя предыдущими,

поэтому подложка покрыта несколькими слоями, составляющими однородную поверхность. Видно, что в последнем случае количество фибрилл на подложке заметно ниже, это так же прослеживалось и на других изображениях (представлены не все снимки, использованные в работе). Это подтверждает предположение, сделанное ранее в нашей лаборатории, что существует конкуренция между мономерным белком и фибриллами за связывание с поверхностью.

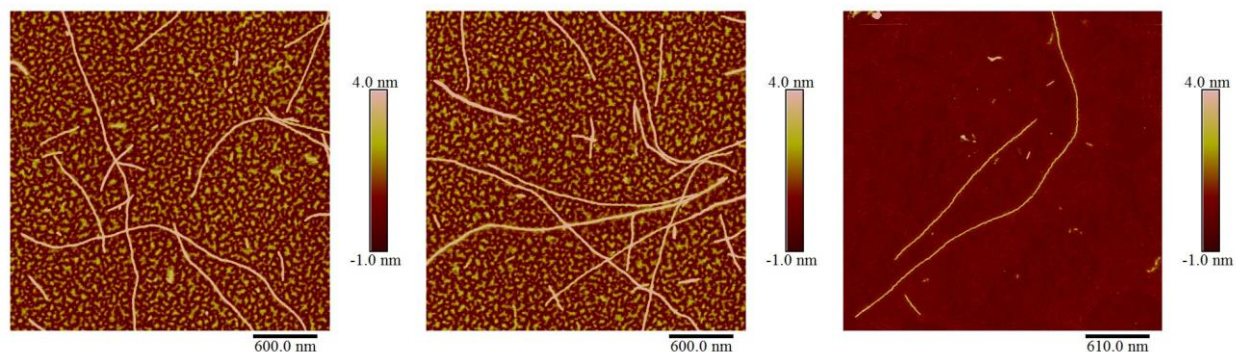


Рис.4.1.1.(1) Снимки АСМ прионного белка дикого типа Sup35NMr wT.

Линейные характеристики исследуемых объектов были посчитаны с помощью плагина FibrilJ. Для обсчета изображений, необходимо перевести их в черно-белый диапазон, как показано в верхней части рисунка 4.1.1(2), затем автоматически производится распознавание объектов - нижняя часть рисунка 4.1.1(2). На каждую предполагаемую фибриллу накладывается скелет, состоящий из осевых линий и границ.



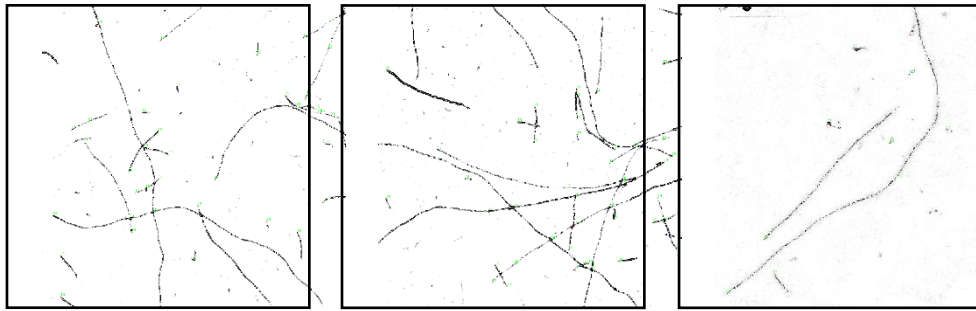


Рис. 4.1.1.(2) АСМ изображения до и после обсчета, произведенного с помощью плагина FibrilJ.

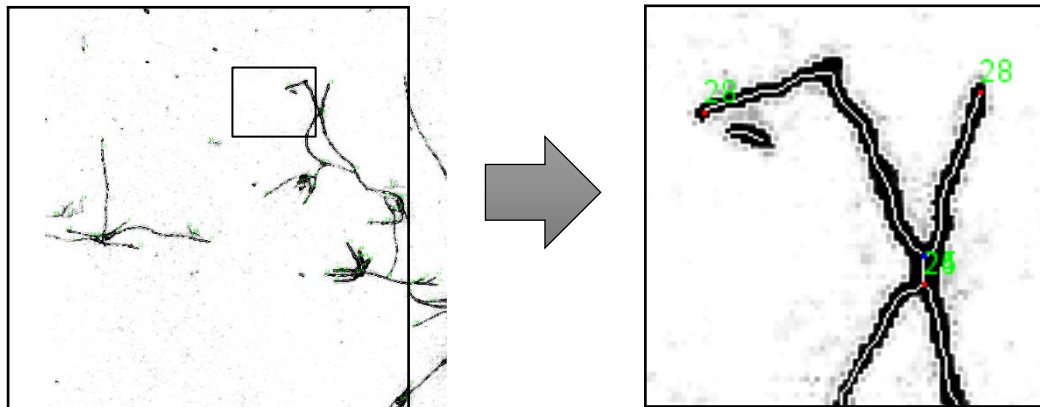


Рис. 4.1.1(3) Пример наложения скелета на изображение.

В параметрах программы можно задать максимальный диаметр и количество пересечений, после чего объекты, имеющие характеристики больше заданных, автоматически отфильтровываются. Данные параметры вначале устанавливались приблизительно, основываясь на данных, представленных в различных литературных источниках, затем, оценивая построение скелета, задавались оптимальные значения для фильтрации. Программа выдаёт диаметры, посчитанные по двум различным алгоритмам D1 и D2.

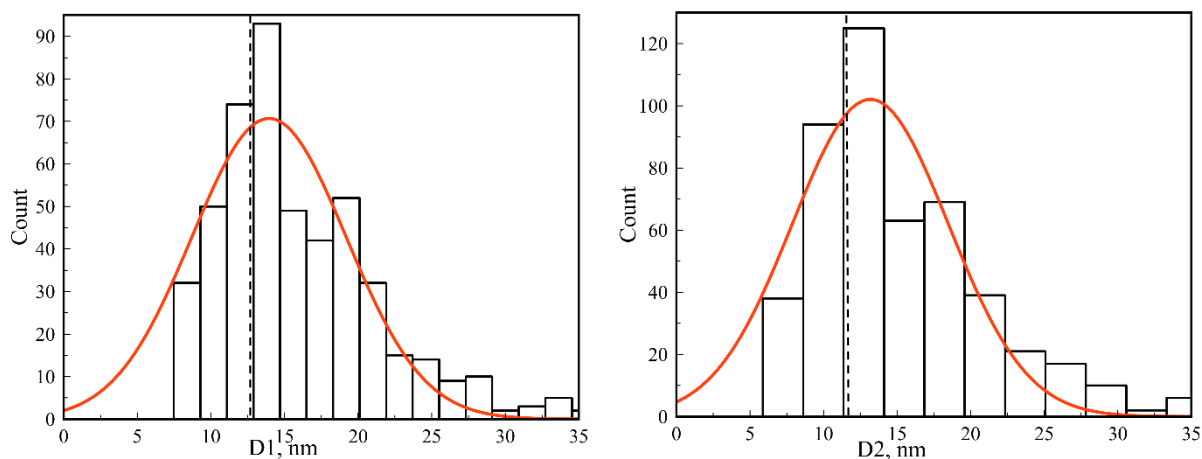


Рис. 4.1.1.(4) Распределение средних диаметров  $D_1$  и  $D_2$  для фибрилл прионного белка Sup35NMr.

После обсчета изображений на выходе получали большой массив данных (зависит от количества фибрилл на подложке), после чего данные, полученные со всех изображений объединялись и строилось распределение по диаметрам, которое аппроксимировалось гауссовой кривой. Значение диаметров фибрилл находилось по положению максимума аппроксимирующей кривой. Для фибрилл, образованных из белка дикого типа Sup35NMr wT значения диаметров составили  $D_1=13.9\pm 0.5\text{nm}$ ,  $D_2=13,2\pm 0,2\text{nm}$ .

Так же, с помощью плагина были получены значения персистентных (PL) и контурных длин (L) для каждой фибриллы. Их распределения представлены на рисунке 3.5. Для распределения по персистентным длинам построена аппроксимирующая кривая, значение находилось по положению максимума аппроксимирующей прямой. Для нашего распределения  $\langle PL \rangle = 177 \pm 9\text{nm}$ . Значения контурных длин для всех мутаций находились как среднее значение, с в случае Sup35NMr wT  $\langle L \rangle = 229\text{nm}$ . Из распределения видно, как сильно колеблются значения персистентных длин. Это связано с тем, что в способе определения  $\langle PL \rangle$  в данной работе использовались значения контурных длин, а как видно из распределения по длинам L, они принимают сильно различающиеся значения.



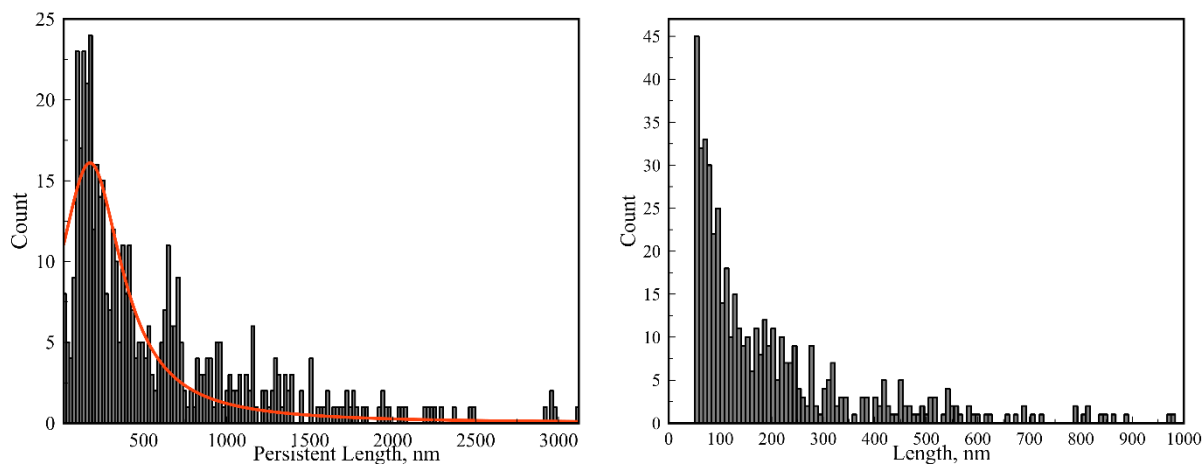


Рис. 4.1.1.(5) Распределения персистентных длин (слева) и контурных длин (справа).

После растворения мономерного прионного белка в фосфатном буфере, образуются как длинные, вытянутые нити, так и короткие фрагменты белка. Так как срок хранения белка ограничен, обычно растворы помещаются в морозильную камеру, после чего количество мелких фрагментов увеличивается, а у длинных фибрилл местами образуются изломы. Все это является причиной широкого распределения фибрилл по длинам, поэтому ввели в рассмотрение отношение  $\langle PL \rangle / \langle L \rangle = 0.78$ .

В программе NanoScope Analysis (программа для обработки АСМ изображений) автоматически строится распределение площади поверхности образца по занимаемым им высотам. Для наших фибрилл чаще всего распределение имеет вид, представленный на рисунке 4.1.1(6)(а). Первый пик соответствует высоте мономерного белка, покрывающего подложку. Плечо справа характеризует высоты фибрилл. В зависимости от количества фибрилл и мономерного белка на подложке, вид кривой меняется. В каждом случае алгоритм подсчета был одинаковый. По первому пику определялась высота поверхности, далее относительно нее считалась высота фибрилл в предположении, что они фиксируются на поверхности, а не на слое мономерного белка. Анализировалось плечо(рис4.1.1.6(б))

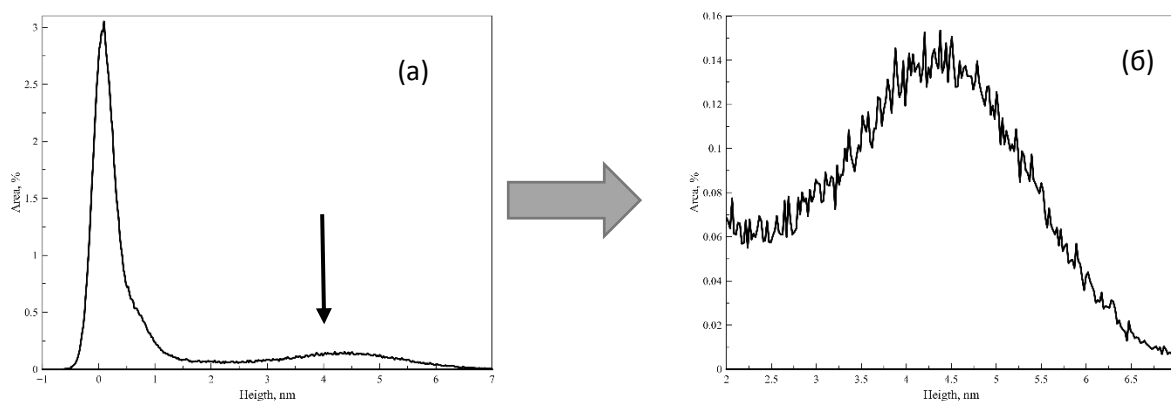


Рис.4.1.1(6) Распределение площади поверхности образца по занимаемым высотам фибрилл и мономерного белка Sup35NMr.

Для фибрилл, образованных из прионного белка дикого типа Sup35NMr wT высота имеет следующее значение  $h = 3.9 \pm 0.5$  нм.

Далее рассмотрим линейные характеристики фибрилл для которых были произведены мутации в прионизирующем домене белка Sup35NMr. Известно, что некоторые из мутаций приводят к потере способности белков прионизоваться *in vivo*. Было интересно посмотреть на линейные характеристики фибрилл, образованных *in vitro*.

#### 4.1.2. Анализ фибрилл прионного белка Sup35NMr-M0

Для прионного белка Sup 35NMr M0 были получены следующие изображения, которые так же обсчитывались с помощью плагина FibrilJ:

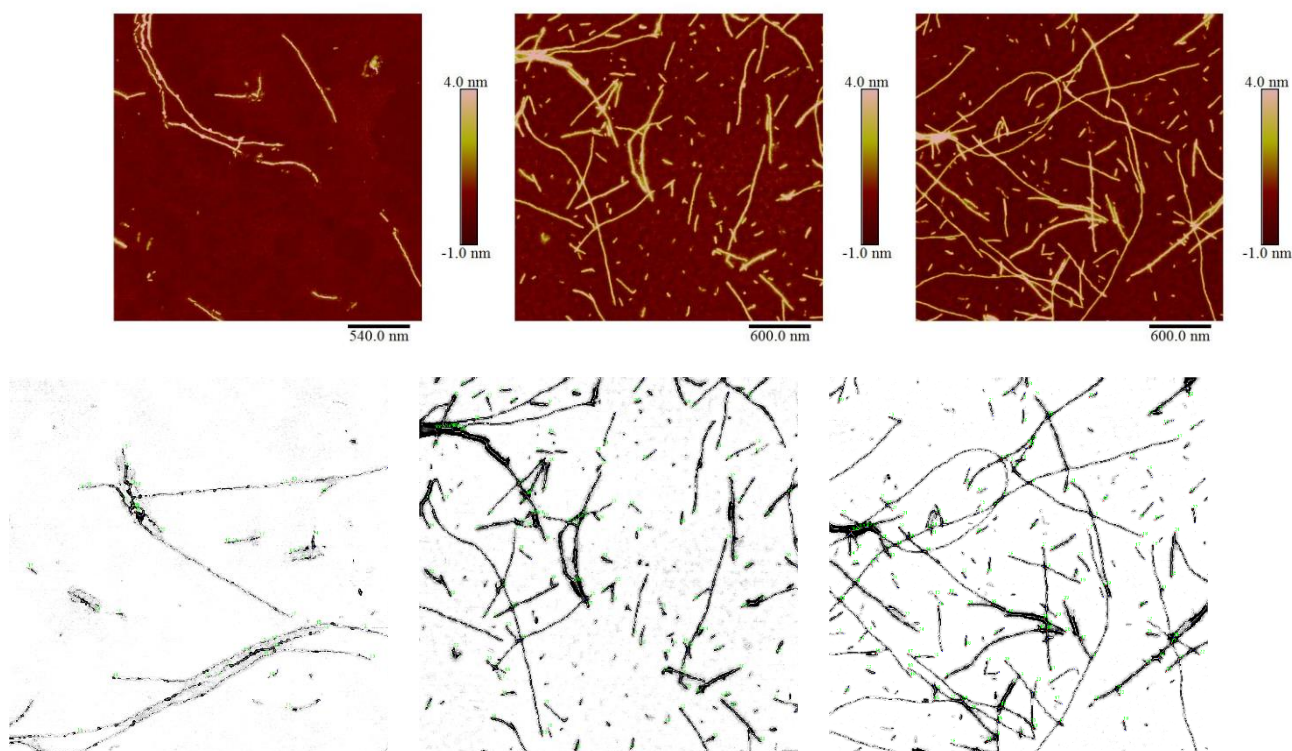


Рис.4.1.2(1) АСМ изображения фибрилл прионного белка Sup35NMr M0 (сверху). Изображения после наложения скелетов с использованием плагина FibrilJ (снизу).

Для этой мутации было сложно получить изображения, содержащее в основном фибриллы. Образцы содержали большие агрегаты, предположительно состоящие из слипшегося мономерного белка. Распределения по диаметрам принимает для мутации Sup35NMr M0 следующий вид:

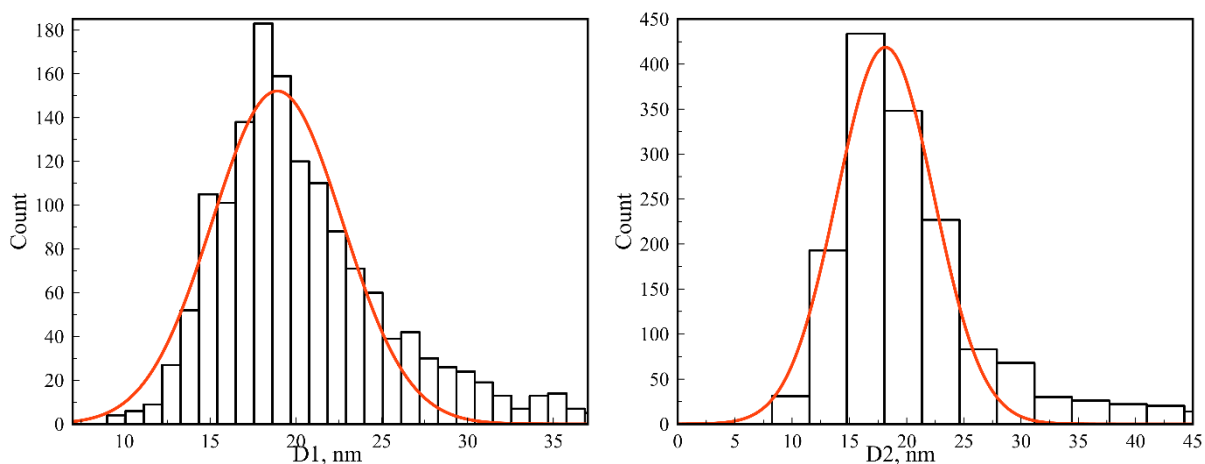


Рис. 4.1.2(2) Распределение средних диаметров D1 и D2 для фибрилл прионного белка Sup35NMr с мутацией M0.

Значения соответственно равны  $D1=18.9\pm0.2\text{nm}$ ,  $D2=18.1\pm0.2\text{nm}$ .

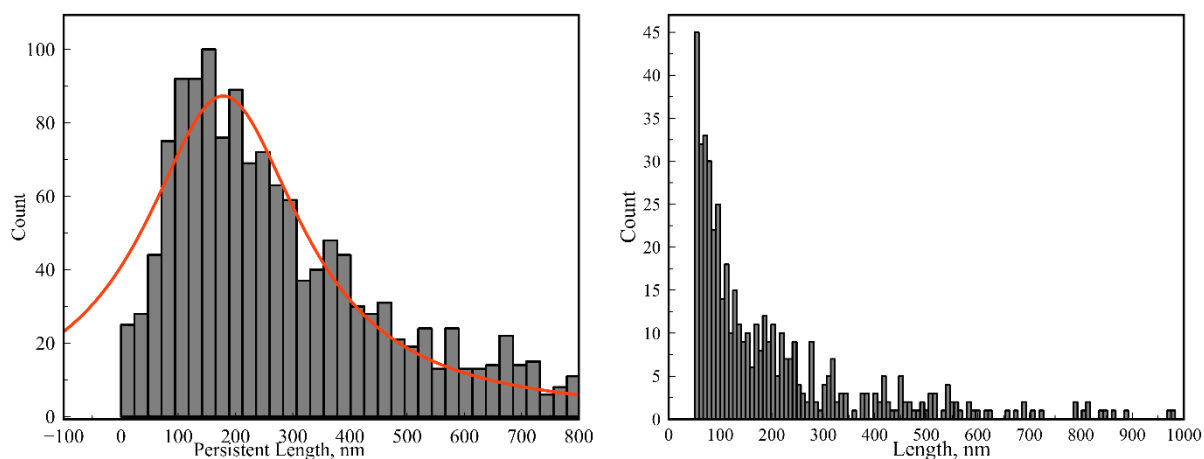


Рис.4.1.2(3) Распределение по персистентным и контурным длинам Sup35NMr M0.

Среднее значение, характеризующее жесткость цепи  $\langle PL \rangle = 178 \pm 2 \text{ nm}$ , значение средней контурной длины  $\langle L \rangle = 156 \text{ nm}$ . Их отношение  $\langle LP \rangle / \langle L \rangle = 1.14 \text{ nm}$ . Высота принимает значение  $h = 3.7 \pm 0.3 \text{ nm}$ .

#### 4.1.3. Анализ фибрилл прионного белка Sup35NMr-M1

Данные для прионного белка Sup35NMr с M1-й мутацией:

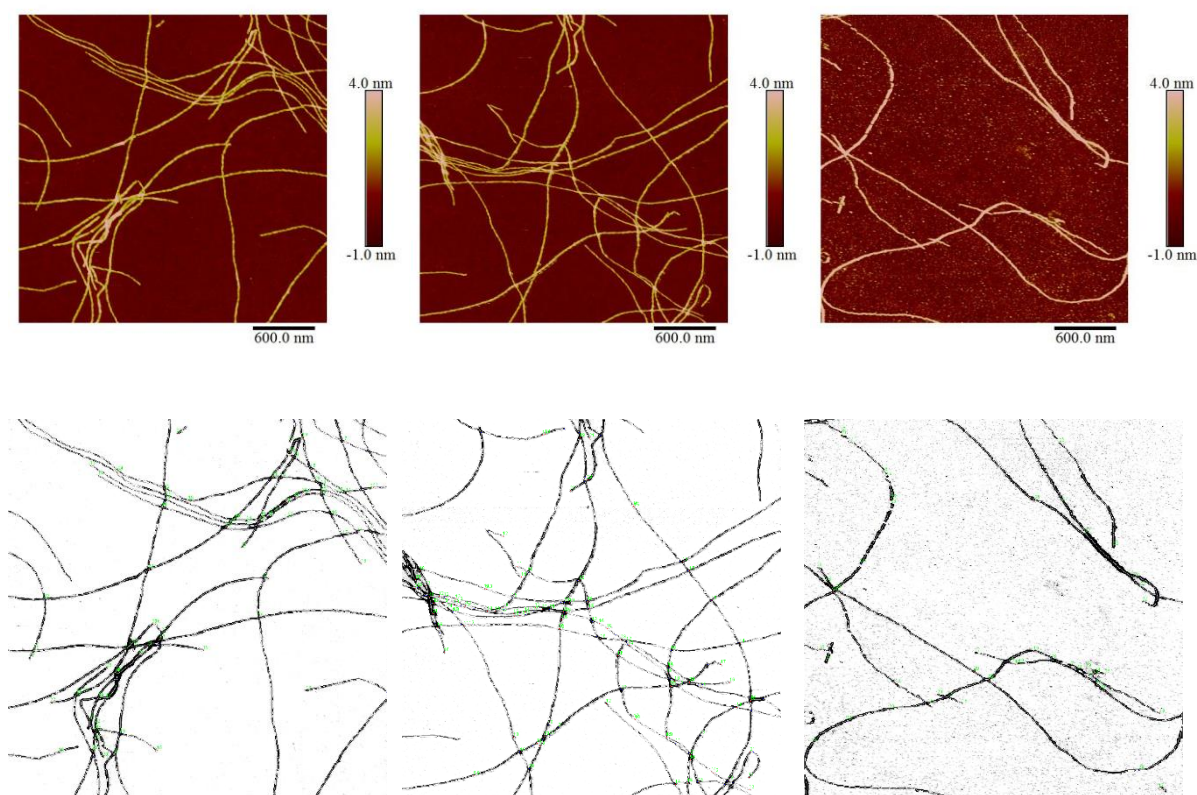


Рис. 4.1.3(1) ACM изображения прионного белка Sup35NMr с мутацией M1(сверху). После наложения скелета (снизу).

Для фибрилл с данной мутацией характерно образование преимущественно длинных, вытянутых структур. После хранения в морозильной камере, частота мелких агрегатов увеличивается.

Распределение по средним диаметрам:

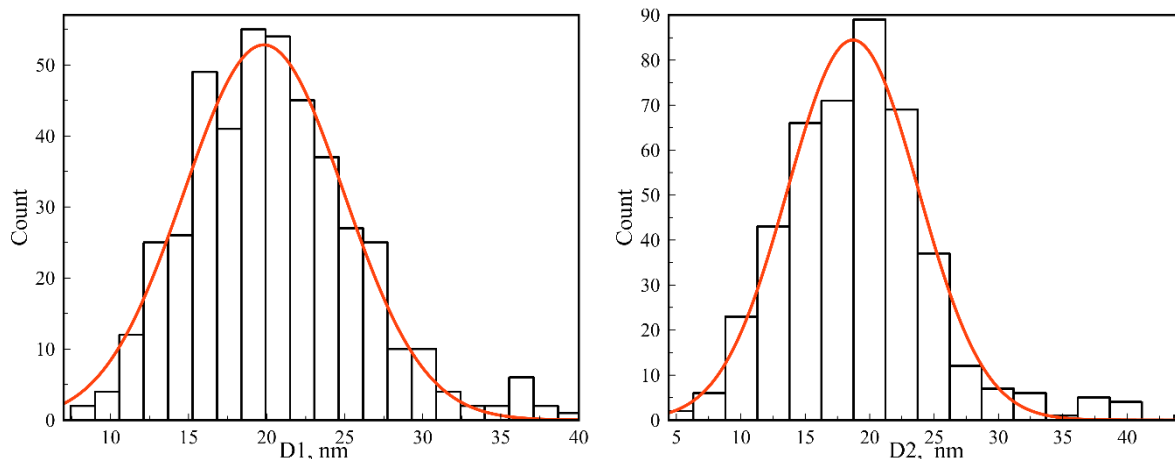


Рис. 4.1.3(2) Распределение средних диаметров D1 и D2 фибрилл прионного белка Sup35NMr M1.

Значения диаметров фибрилл для рассмотренной мутации равны  $D1=19,8\pm 0,2\text{nm}$ .  $D2=18.7\pm 0,1\text{nm}$ .

Среднее значение персистентной длины для фибрилл принимает значение  $\langle PL \rangle = 118 \pm 20\text{nm}$ , значение средней контурной длины  $\langle L \rangle = 240\text{nm}$ . Их отношение  $\langle LP \rangle / \langle L \rangle = 0,49\text{nm}$ . Высота фибрилл равна  $h = 4.4 \pm 0.4\text{nm}$ .

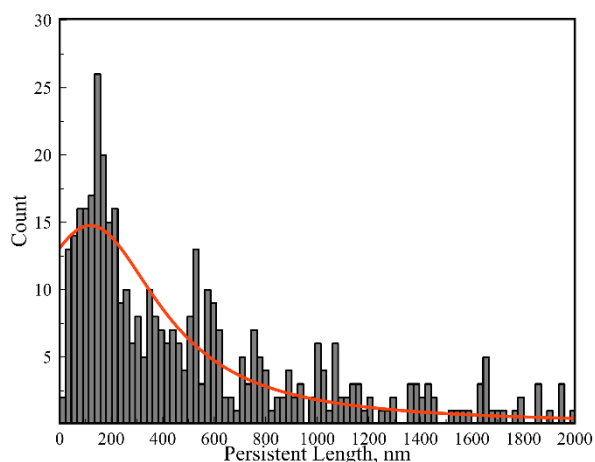


Рис. 4.1.3(3) Распределение по персистентным длинам для прионного белка Sup35NMr с M1 мутацией.

#### 4.1.4. Анализ фибрилл прионного белка Sup35NMr-M2

Данные для фибриллярных структур прионного белка Sup35NMr с мутацией M2:

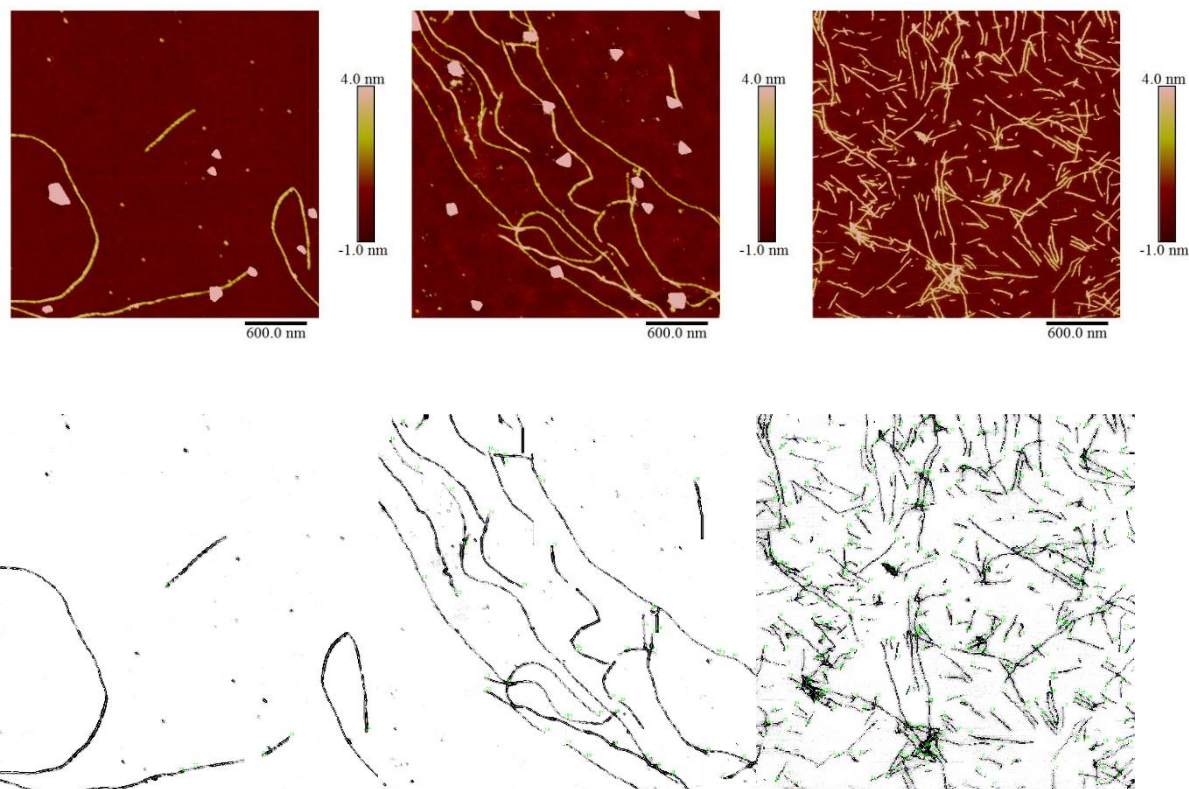


Рис.4.1.4(1) АСМ изображения фибрилл прионного белка Sup35NMr с мутацией M1(сверху). После наложения скелета в FibrilJ (снизу).

В ходе работы с белками данной мутации сложилась схожая ситуация как в случае структур, образованных из Sup35NMr M0. На подложках видны сплишившиеся агрегаты мономерного белка. При разбавлении растворов в 100 раз крупные агрегаты исчезают, но при этом сильно падает количество высадившихся на поверхность фибрилл. При подсчете диаметров часть агрегатов отфильтровывалась параметрами программы FibrilJ, часть была удалена с помощью программы NanoScope Analysis.

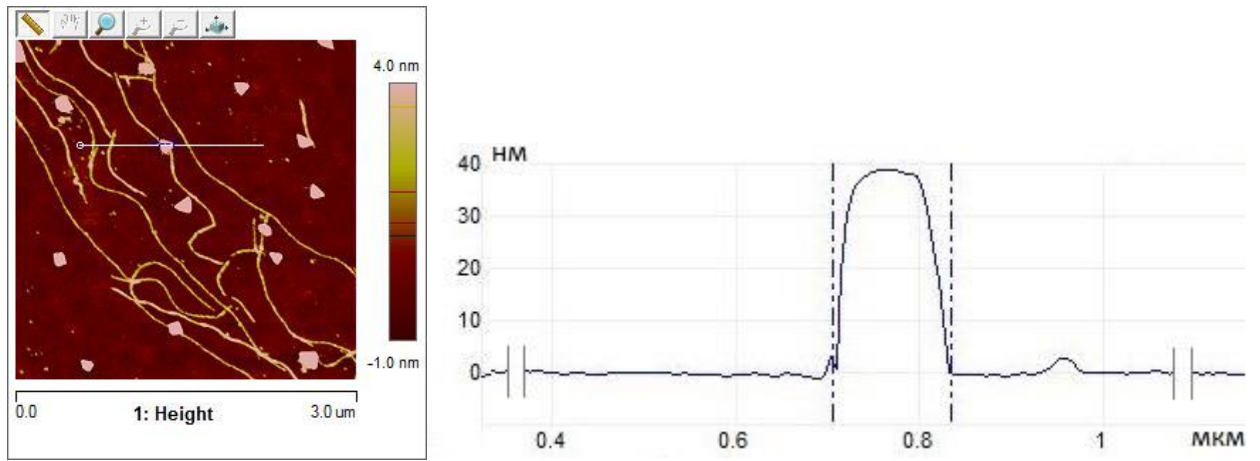


Рис. 4.1.4(2) АСМ изображение фибрилл с мутацией M2 и оценка размера слипшихся структур мономерного белка.

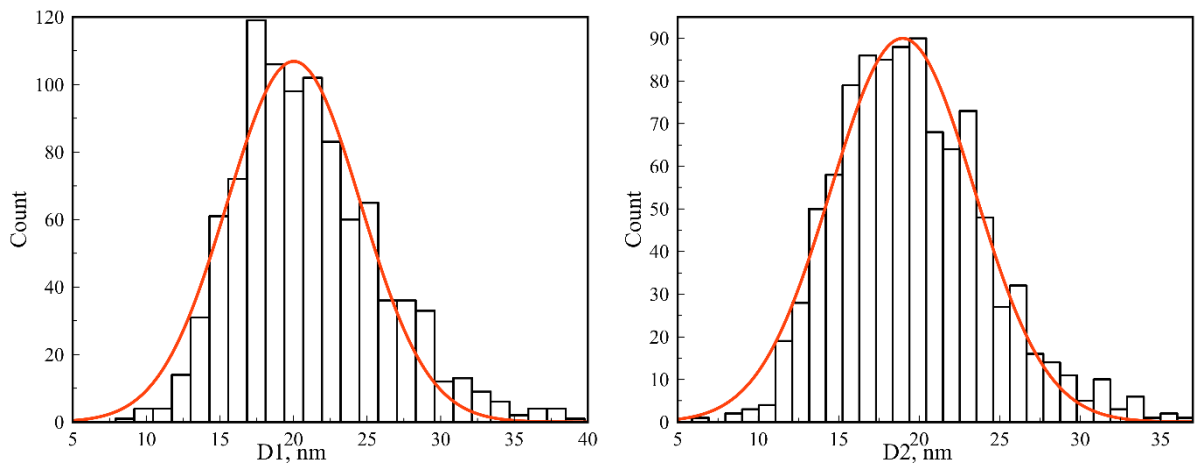


Рис. 4.1.4(3) Распределение диаметров D1 и D2 фибрилл прионного белка Sup35NMr с мутацией M2.

Значение диаметров соответственно составили  $D1=20.0\pm 0.2\text{нм}$ ,  $D2=19.0\pm 0.1\text{нм}$ .

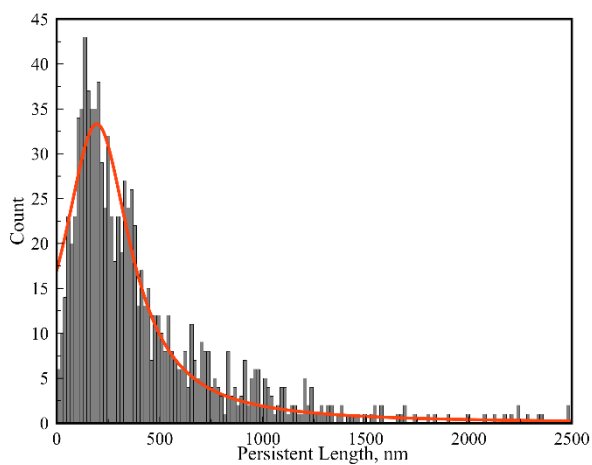
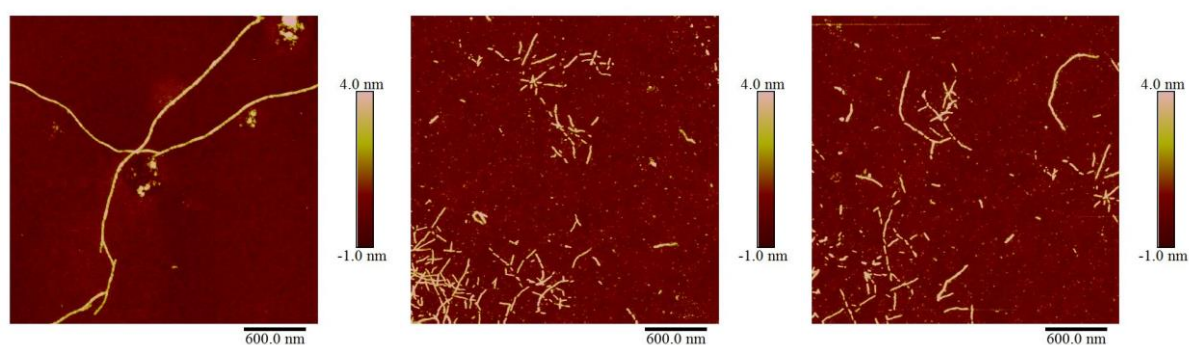


Рис. 4.1.4(3) Распределение по персистентным и контурным длинам для прионного белка Sup35NMp с M2 мутацией.

Для персистентной длины получили значение  $\langle PL \rangle = 194 \pm 5 \text{ нм}$ , при средней контурной длине  $\langle L \rangle = 158 \text{ нм}$ .  $\langle PL \rangle / \langle L \rangle = 1,23$ . Высота фибрилл равна  $h = 3,7 \pm 0,5 \text{ нм}$ .

#### 4.1.5. Анализ фибрилл прионного белка Sup35NMp-M3

Расчет линейных характеристик фибрилл прионного белка Sup35NMp с мутацией M3:





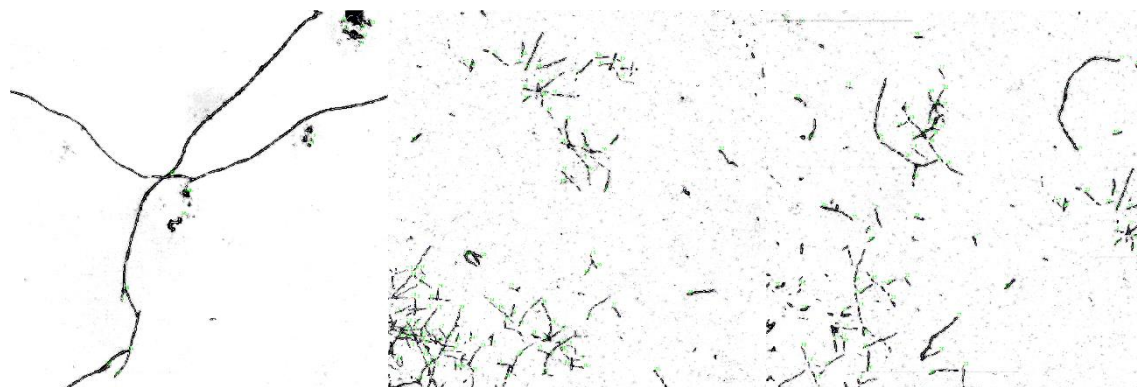


Рис4.1.5(1) АСМ изображение фибрилл прионного белка Sup35NMp с мутацией М3 (сверху). Изображения после наложения скелета в FibrilJ (снизу).

Редко удавалось получить длинные структуры, чаще всего фибриллы были представлены в виде коротких фрагментов.

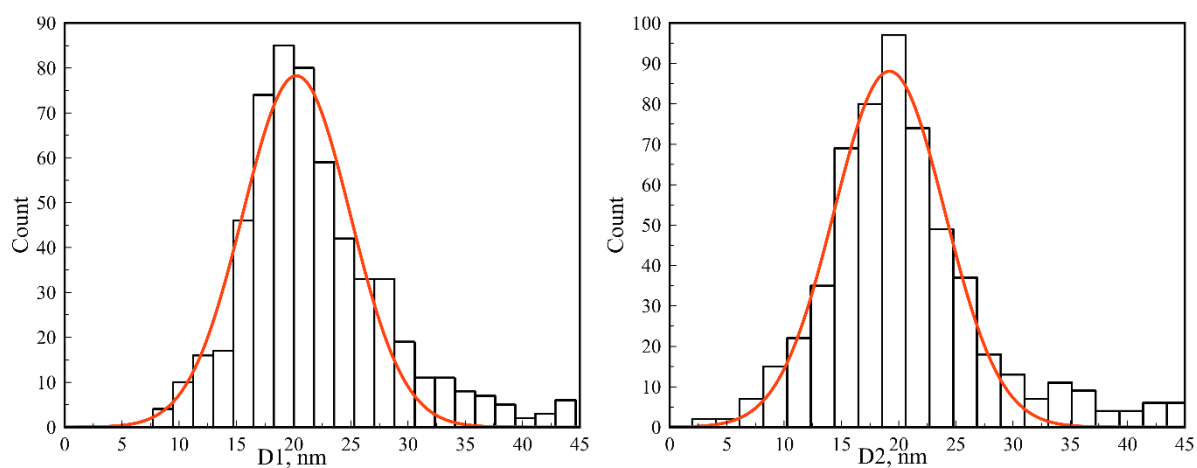


Рис.4.1.5(2) Распределение диаметров D1и D2 фибрилл прионного белка Sup35NMp с мутацией М3.

Значения средних диаметров составили  $D1=20,2\pm,03\text{нм}$ ,  $D2=19,2\pm0,2\text{нм}$ .

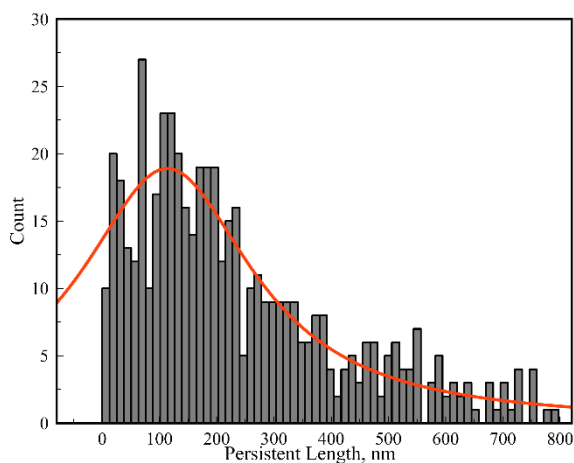
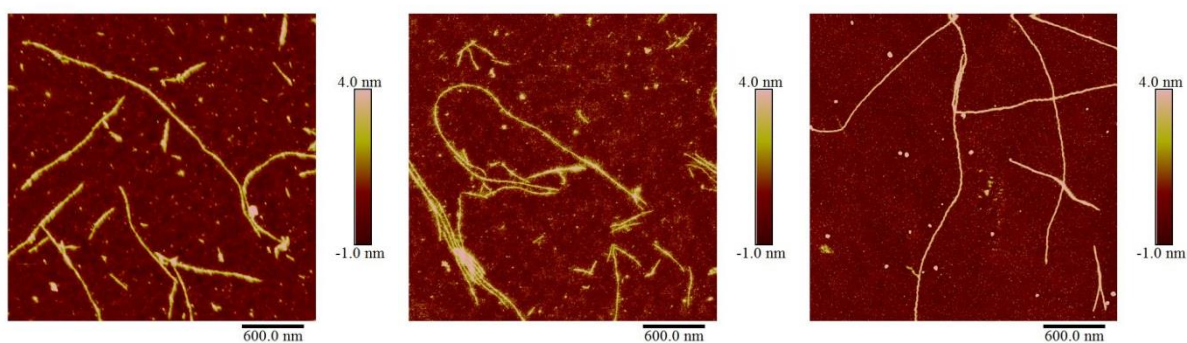


Рис.4.1.5(3) Распределение по персистентным длинам фибрилл белка Sup35 с мутацией М3.

Для персистентной длины получено значение  $\langle PL \rangle = 114 \pm 4$  нм, значение средней контурной длине  $\langle L \rangle = 137$  нм.  $\langle PL \rangle / \langle L \rangle = 0,83$ . Высота фибрилл равна  $h = 4,1 \pm 0,2$  нм.

#### 4.1.6. Анализ фибрилл прионного белка Sup35NMr-M4

Получение линейных характеристик фибриллярных структур прионного белка Sup35NMr с мутацией М4:



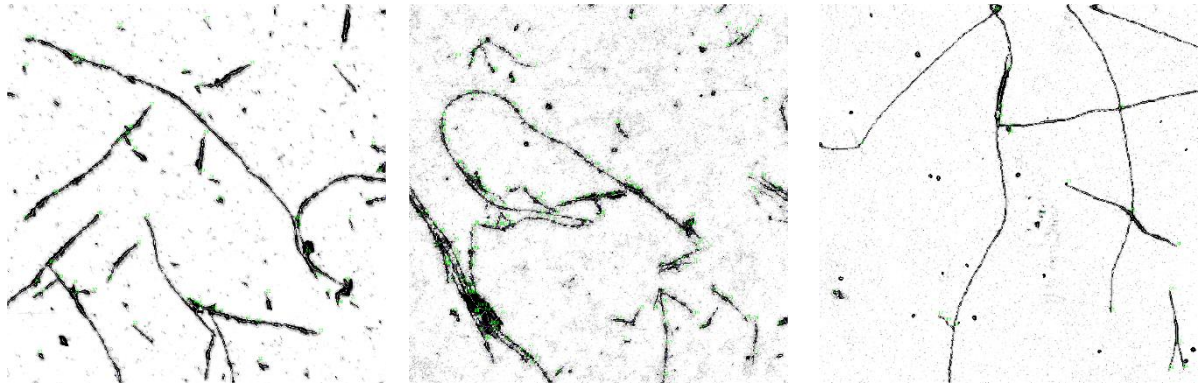


Рис. 4.1.6.(1) АСМ изображения фибрилл прионного белка Sup35NMr с мутацией М4 (сверху). Изображения после наложения скелета в FibrilJ (снизу).

Фибриллы с данной мутацией так же склонны образовывать длинные структуры. Кроме того, длинные фибриллы слипаются между собой, образуя толстые нити. Предположительно, это следующий этап агрегации, в дальнейшем приводящий к образованию амилоидных бляшек. Периодически в растворах с прионами образуются структуры, которые можно различить невооруженным глазом. Изучение этих объектов в дальнейшем может представлять большой интерес.

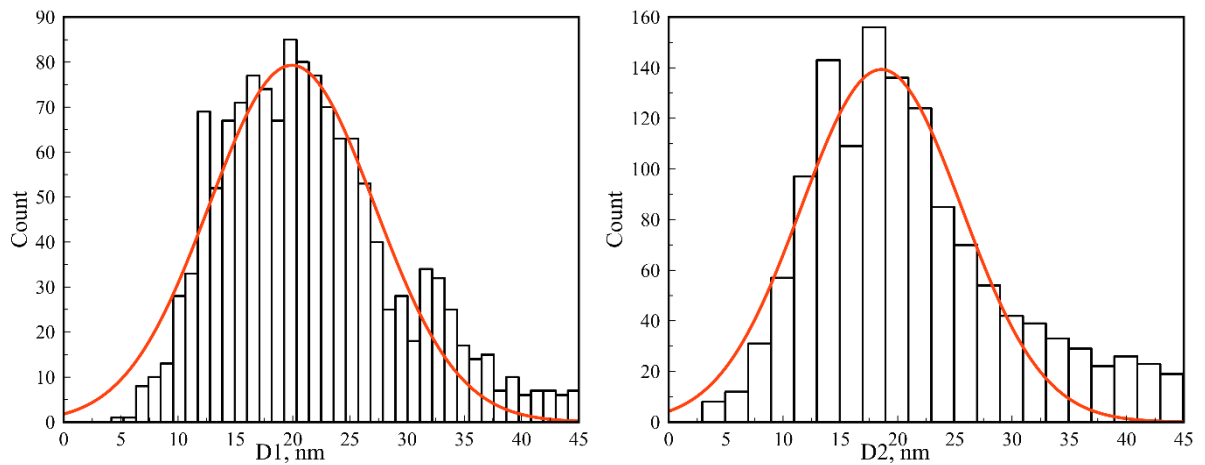


Рис.4.1.6(2) Распределение диаметров D1и D2 фибрилл прионного белка Sup35NMr с мутацией М4.

Значение диаметров соответственно составили  $D1=19,9\pm 0,3\text{нм}$ ,  $D2=18,3\pm 0,3\text{нм}$ .

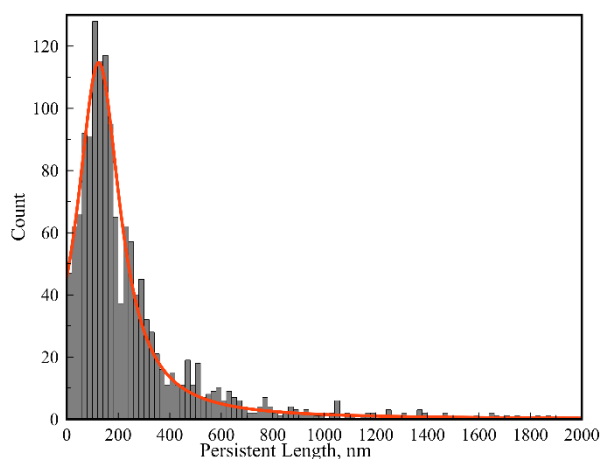


Рис. 4.1.6(3) Распределение по персистентным длинам для фибрилл прионного белка Sup35NMr с M4 мутацией.

Для персистентной длины получено значение  $\langle PL \rangle = 124 \pm 2$  нм, значение средней контурной длине  $\langle L \rangle = 115$  нм.  $\langle PL \rangle / \langle L \rangle = 1,08$ . Высота фибрилл равна  $h = 4,2 \pm 0,5$  нм.

#### 4.1.7. Анализ фибрилл прионного белка Sup35NMr-M5

Для прионного белка SupNMr 35 M5 были получены следующие изображения:

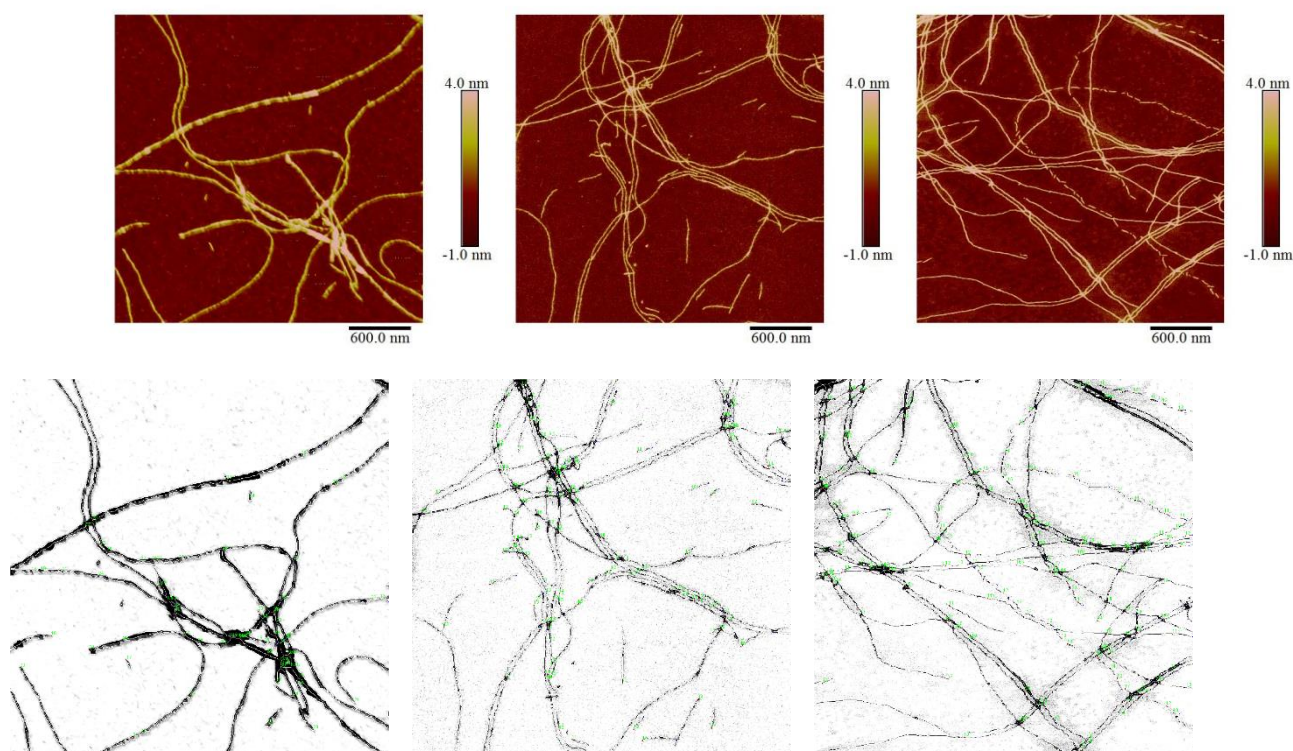


Рис. 4.1.7.(1) АСМ изображения фибрилл прионного белка Sup35NMr с мутацией M5 (сверху). Изображения после наложения скелета в FibrilJ (снизу).

Данные структуры в большинстве случаев длинные и вытянутые. Так же, как и фибриллы прионных белков для M1-й и M4-й мутаций склонны к слипанию, образуя в некоторых случаях «косы» из фибрилл.

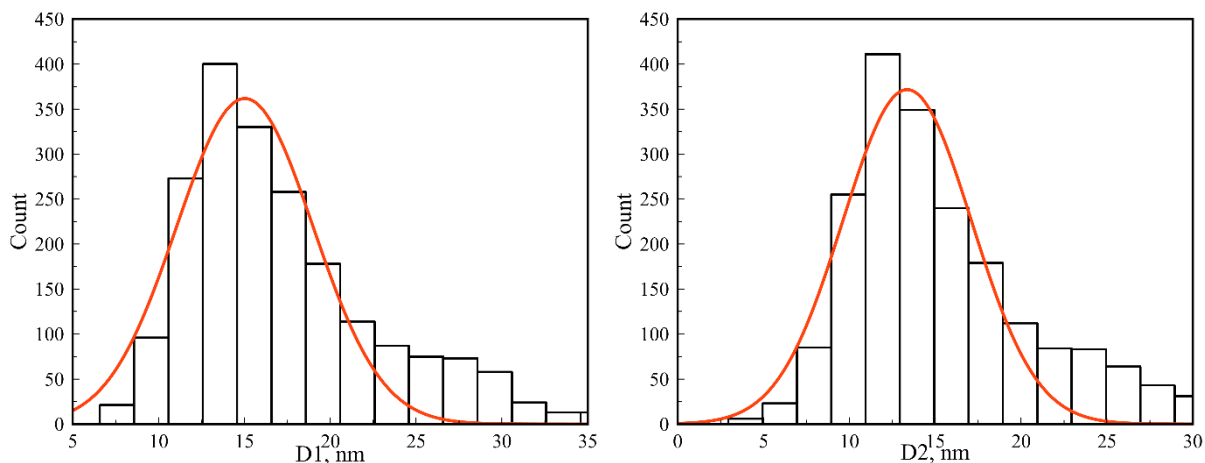


Рис.4.1.7(2) Распределение диаметров D1и D2 фибрилл прионного белка Sup35NMr с мутацией M5.

Значение средних диаметров составили  $D1=15,0\pm0,3\text{nm}$ ,  $D2=13,4\pm0,2\text{nm}$ .

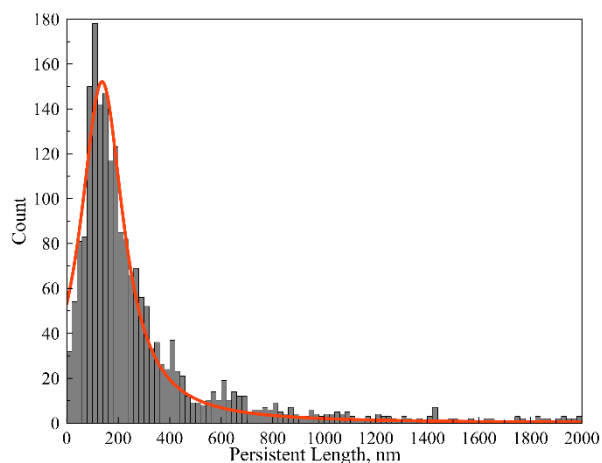


Рис. 4.1.7(3) Распределение по персистентным длинам для фибрилл прионного белка Sup35NMr с M5 мутацией.

Для персистентной длины получено значение  $\langle PL \rangle = 137 \pm 1 \text{nm}$ , значение средней контурной длины  $\langle L \rangle = 138 \text{nm}$ .  $\langle PL \rangle / \langle L \rangle = 0,99$ . Высота фибрилл равна  $h = 4.0 \pm 0,2 \text{nm}$ .

4.1.8. Сводная таблица линейных характеристик для дикого типа белка Sup35N $\mu$ p и его мутантных форм.

Sup35N	D1, нм	D2, нм	<PL>, нм	<L>, нм	<PL>/<L>	h, нм
wT	13,9±0,5	13,2±0,2	178±9	229	0,78	3,9±0,5
M0	18,9±0,2	18,1±0,2	179±2	156	1,14	3,7±0,3
M1	19,8±0,2	18,7±0,1	118±20	240	0,49	4,4±0,4
M2	20,0±0,2	18,9±0,1	194±5	158	1,23	3,7±0,6
M3	20,2±0,3	19,1±0,2	114±4	137	0,83	4,1±0,2
M4	19,9±0,3	18,3±0,3	124±2	115	1,08	4,2±0,5
M5	15,0±0,3	13,4±0,2	137±1	138	0,99	4,0±0,2

Таб.1 Значения средних диаметров D1, D2, средней контурной длины <L>, персистентной длины <PL>, высоты h.

## 4.2. Анализ изображений, полученные методом СЭМ

### 4.2.1. Анализ фибрилл прионного белка Sup35NMr-wT

Для сканирующей электронной микроскопии все фибриллы белка высажены на кремниевую подложку. Предварительно были получены изображения АСМ для каждого образца. Измерения производились в ресурсном центре СПбГУ «Нанотехнологии». Изображения были получены Михайловским В. Ю.

Так же как и в случае с АСМ линейные характеристики исследуемых объектов были посчитаны с помощью плагина FibrilJ. Затем, для каждой мутации строились распределения по диаметрам, персистентным и контурным длинам.

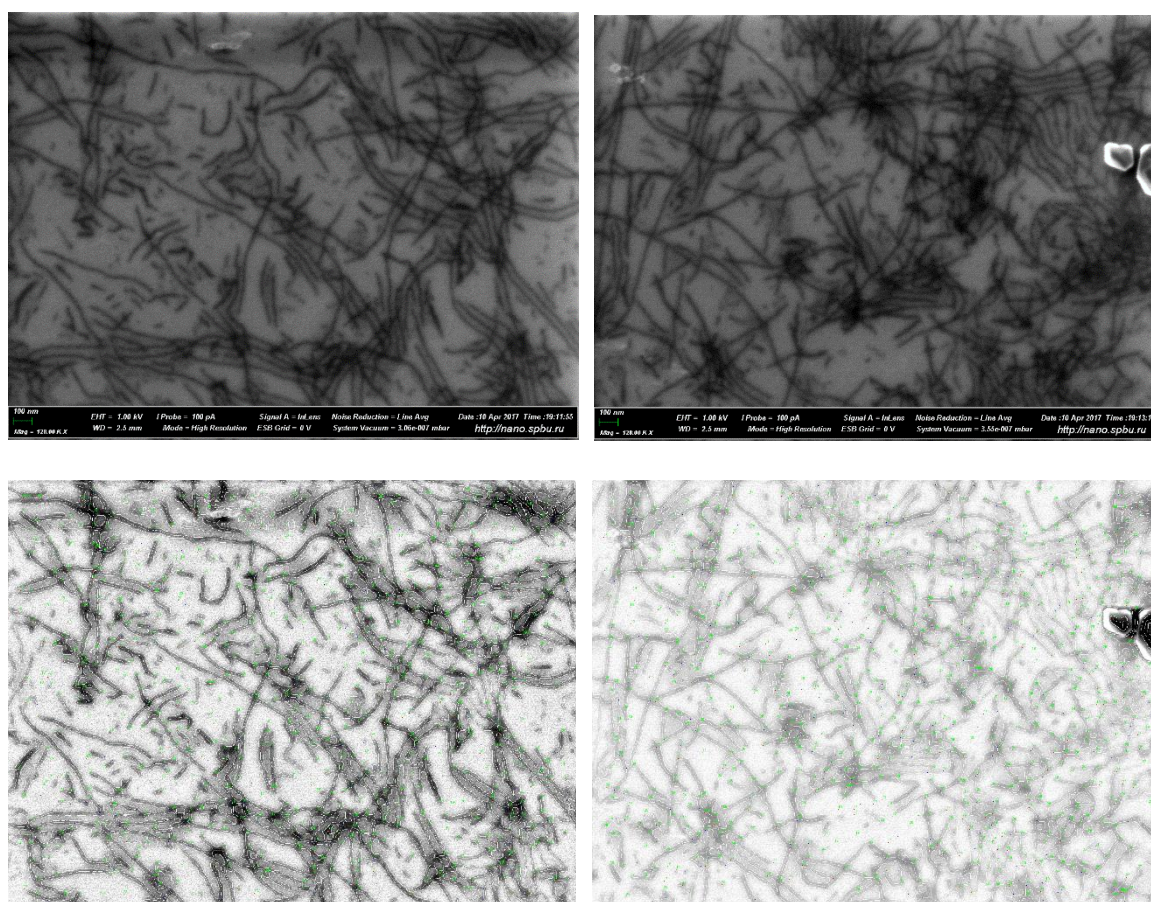


Рис. 4.2.1.(1) СЭМ изображения фибрилл прионного белка Sup35NMr wT (сверху). Изображения после наложения скелета в FibrilJ (снизу).

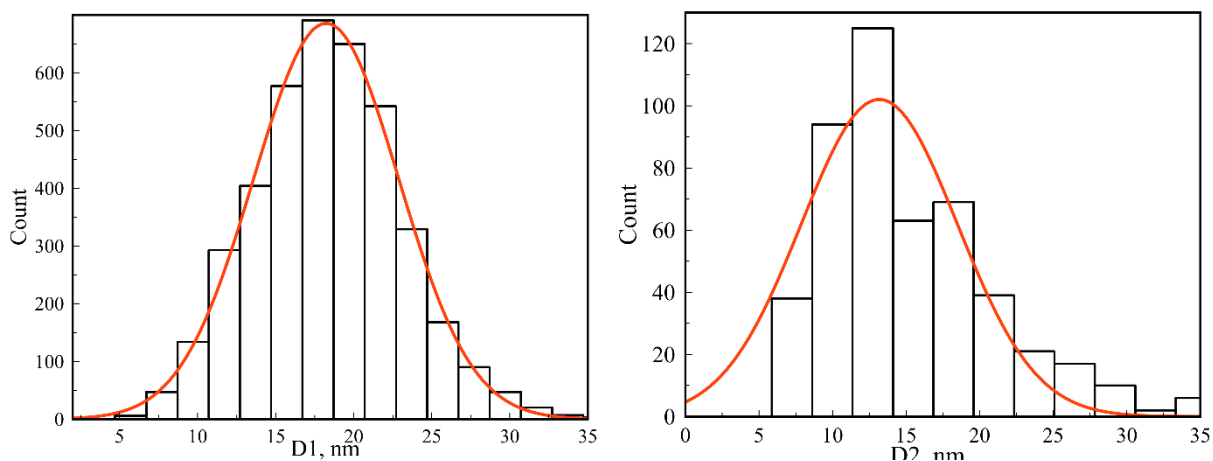


Рис.4.2.1(2) Распределение средних диаметров D1 и D2 фибрилл прионного белка Sup35NMr wt.

Значение средних диаметров составили  $D1=18,2\pm0,3\text{nm}$ ,  $D2=17,2\pm0,2\text{nm}$ .

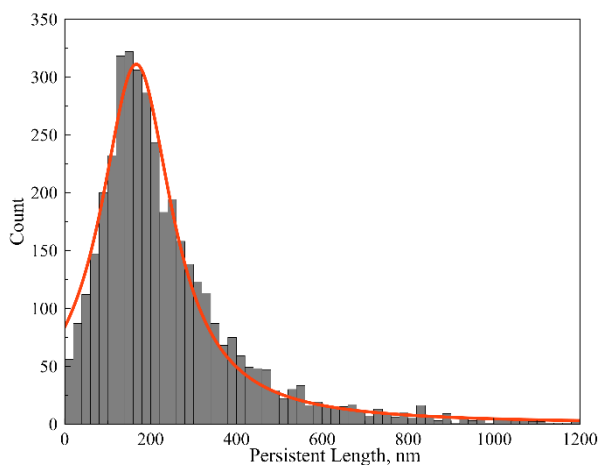


Рис. 4.2.1(3) Распределение по персистентным длинам для фибрилл прионного белка Sup35NMr wt.

Для персистентной длины получено значение  $\langle PL \rangle = 167 \pm 1,2 \text{nm}$ , значение средней контурной длины  $\langle L \rangle = 100 \text{nm}$ .  $\langle PL \rangle / \langle L \rangle = 1,67$ .

#### 4.2.2. Анализ фибрилл прионного белка Sup35NMr-M0

Расчет линейных характеристик фибрилл прионного белка Sup35NMr с мутацией M0:



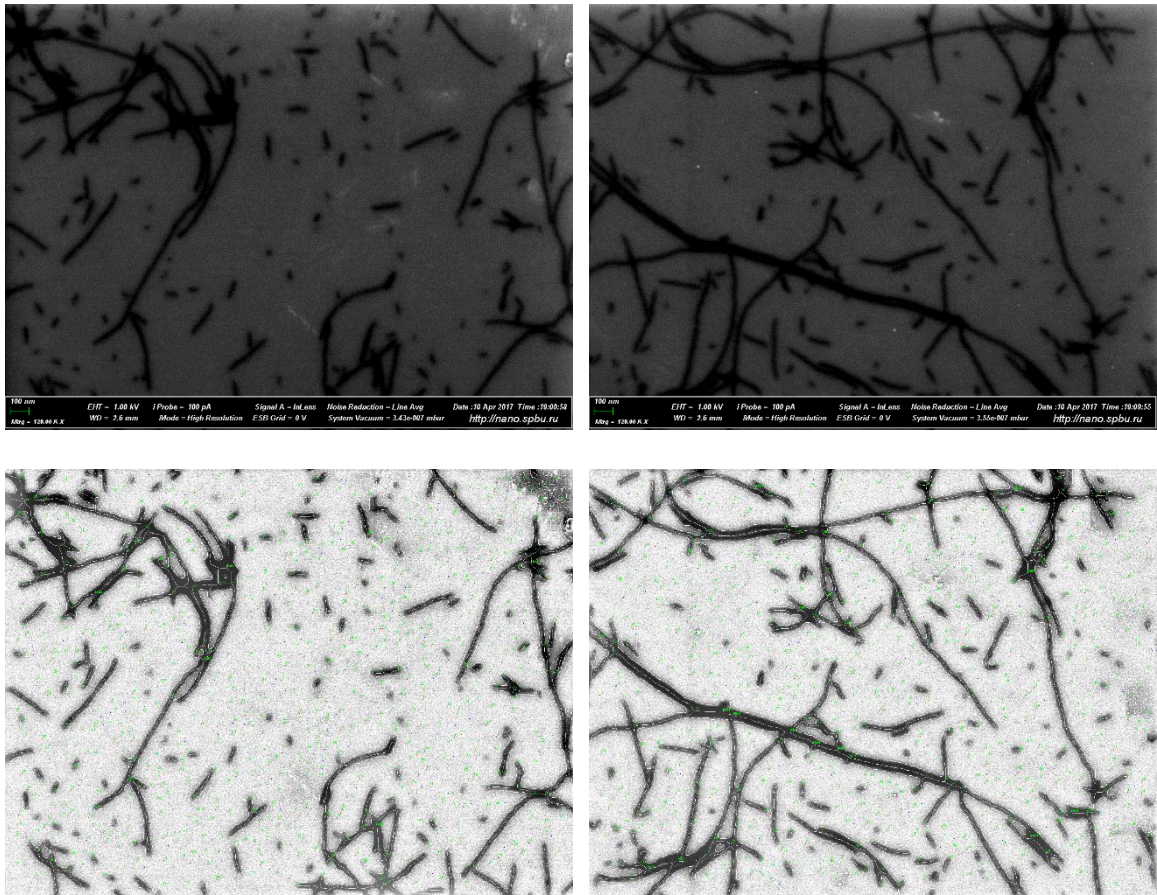


Рис. 4.2.2.(1) СЭМ изображения фибрилл прионного белка Sup35NMpr с мутацией M0 (сверху). Изображения после наложения скелета в FibrilJ (снизу).

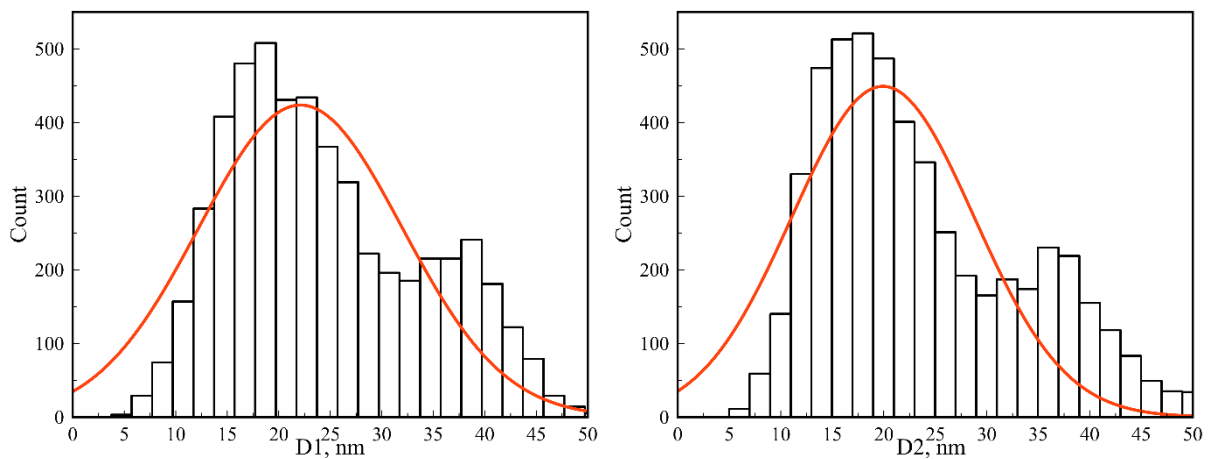


Рис.4.2.2(2) Распределение средних диаметров D1и D2 фибрилл прионного белка Sup35NMpr с мутацией M0.

Значение средних диаметров составили  $D1=22,1\pm 0,9\text{nm}$ ,  $D2=19,9\pm 0,6\text{nm}$ .

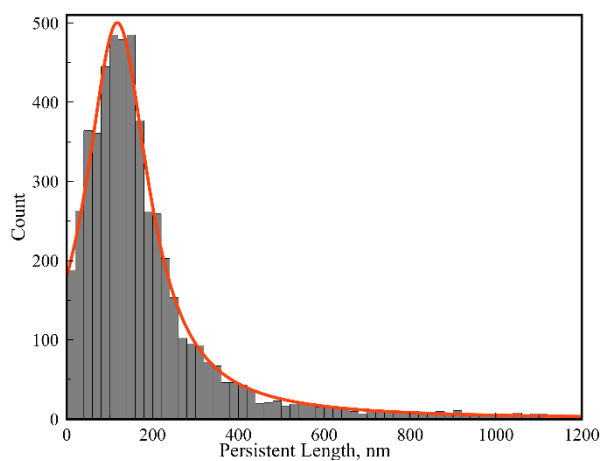
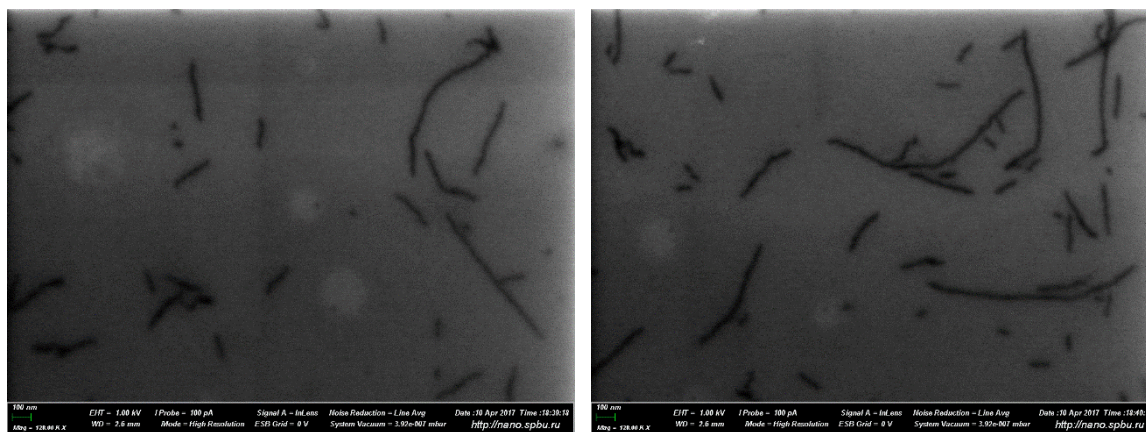


Рис. 4.2.2(3) Распределение по персистентным длинам для фибрилл прионного белка Sup35NMp с M0 мутацией.

Для персистентной длины получено значение  $\langle PL \rangle = 117,9 \pm 0,6$  нм, значение средней контурной длины  $\langle L \rangle = 92$  нм.  $\langle PL \rangle / \langle L \rangle = 1,28$ .

#### 4.2.3. Анализ фибрилл прионного белка Sup35NMp-M1

Данные для фибриллярных структур прионного белка Sup35NMp с мутацией M1:



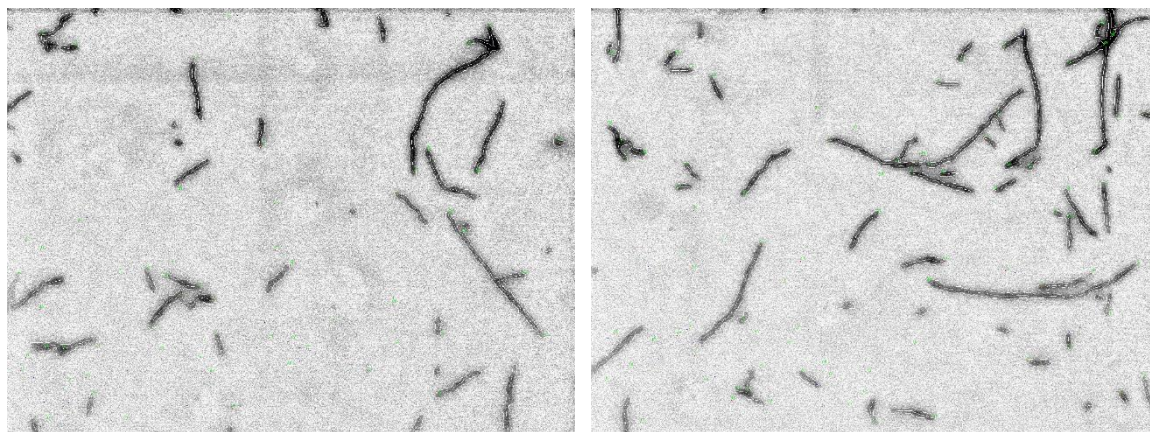


Рис. 4.2.3.(1) СЭМ изображения фибрилл прионного белка Sup35NMp с мутацией M1 (сверху). Изображения после наложения скелета в FibrilJ (снизу).

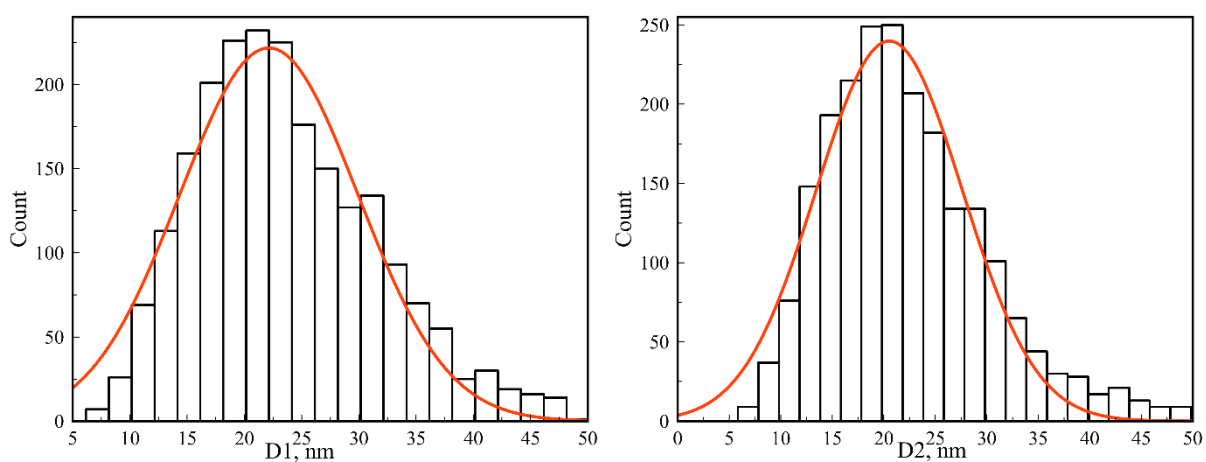


Рис.4.2.3(2) Распределение средних диаметров D1 и D2 фибрилл прионного белка Sup35NMp с мутацией M1.

Значение средних диаметров составили  $D1=22,1\pm0,4\text{нм}$ ,  $D2=20,5\pm0,2\text{нм}$ .

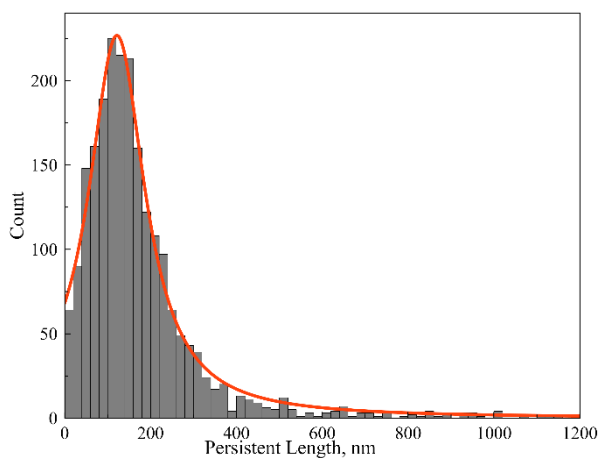


Рис. 4.2.3(3) Распределение по персистентным длинам для фибрилл прионного белка Sup35NMp с M1 мутацией.

Для персистентной длины получено значение  $\langle PL \rangle = 121.6 \pm 0,7 \text{ нм}$ , значение средней контурной длины  $\langle L \rangle = 83 \text{ нм}$ .  $\langle PL \rangle / \langle L \rangle = 1,47$ .

#### 4.2.4. Анализ фибрилл прионного белка Sup35NMr-M2

Для фибрилл прионного белка Sup35NMr с мутацией M2:

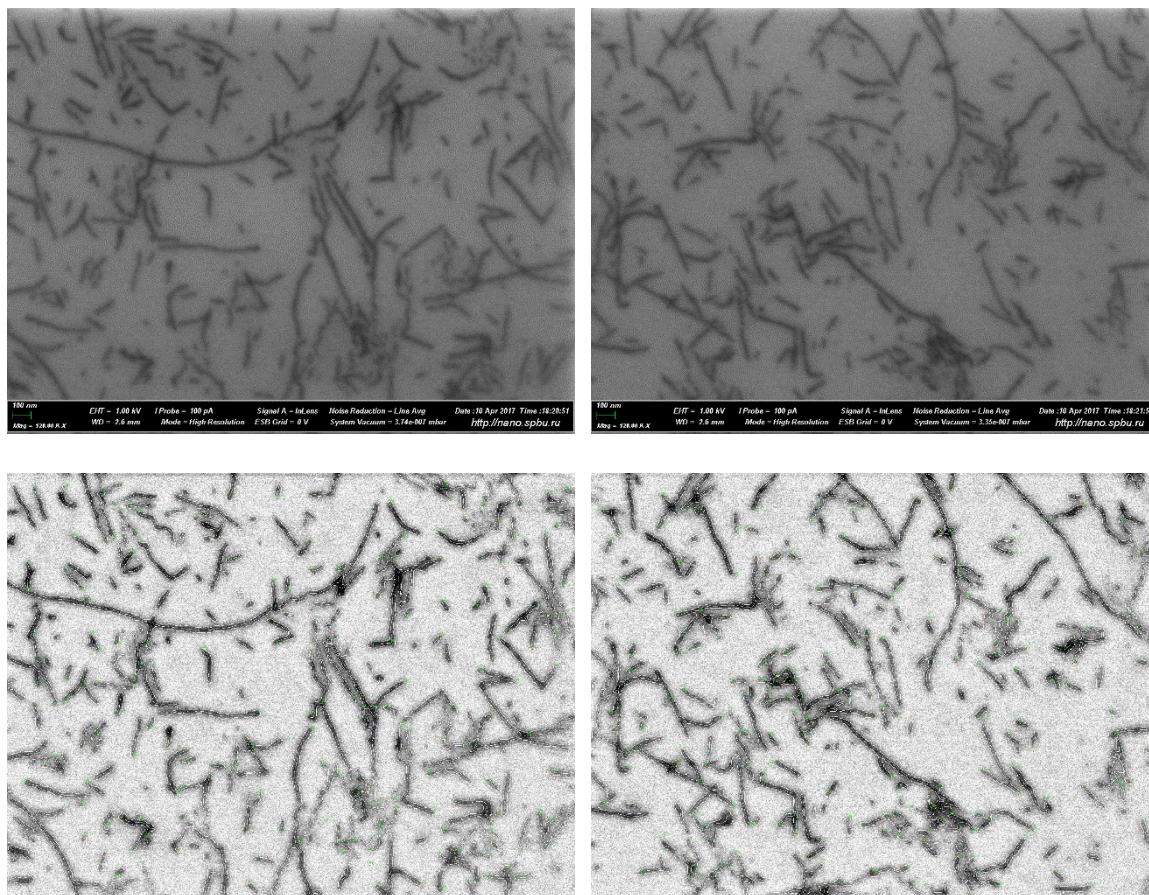


Рис. 4.2.4.(1) СЭМ изображения фибрилл прионного белка Sup35NMr с мутацией M2 (сверху). Изображения после наложения скелета в FibrilJ (снизу).

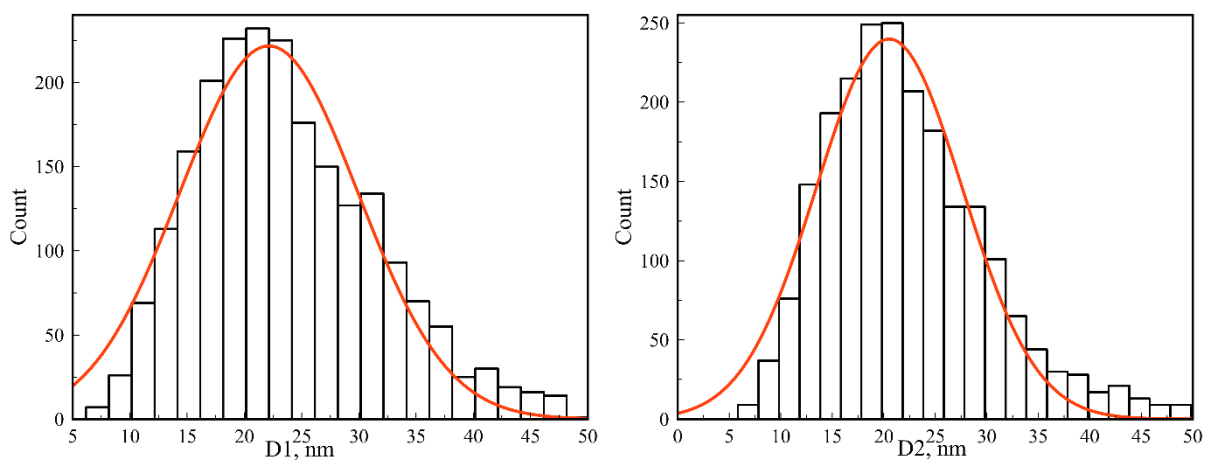


Рис.4.2.4(2) Распределение средних диаметров D1и D2 фибрилл прионного белка Sup35NMr с мутацией M2.

Значение средних диаметров составили  $D1=23,7\pm 0,1\text{нм}$ ,  $D2=21,7\pm 0,1\text{нм}$ .

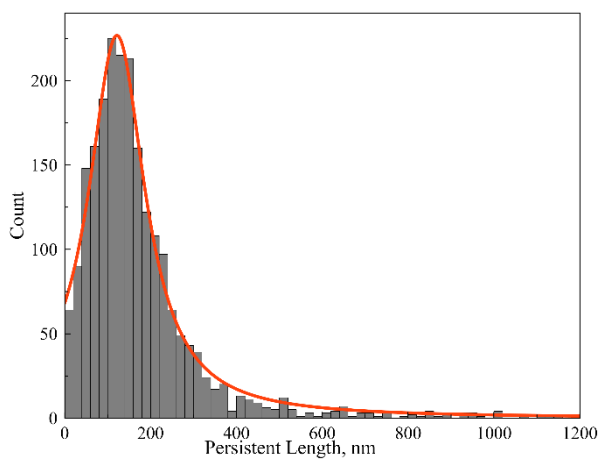


Рис. 4.2.4(3) Распределение по персистентным длинам для фибрилл прионного белка Sup35NMr с M2 мутацией.

Для персистентной длины получено значение  $\langle PL \rangle = 208 \pm 4\text{нм}$ , значение средней контурной длины  $\langle L \rangle = 137\text{нм}$ .  $\langle PL \rangle / \langle L \rangle = 1,5$ .

#### 4.2.5. Анализ фибрилл прионного белка Sup35NMr-M4

Расчет линейных характеристик фибрилл прионного белка Sup35NMr с мутацией M4:

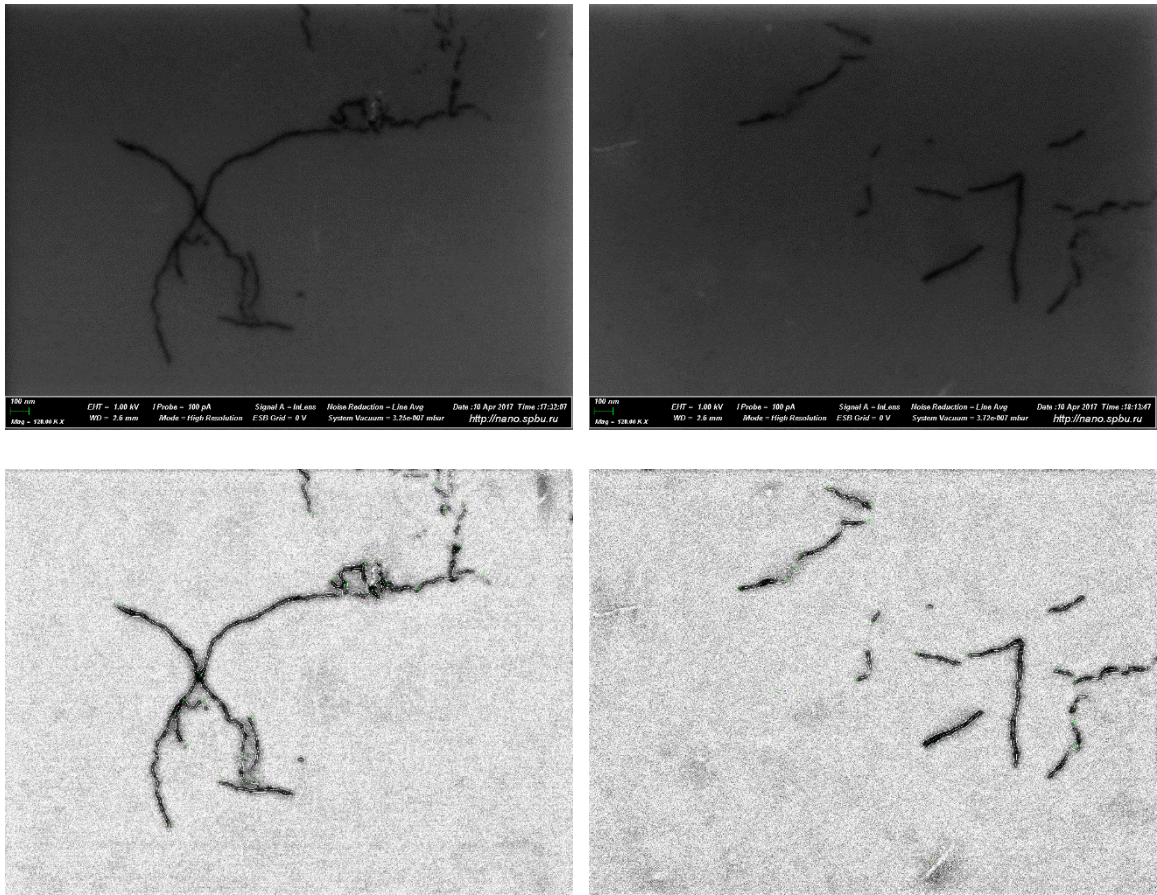


Рис. 4.2.5.(1) СЭМ изображения фибрилл прионного белка Sup35NMp с мутацией M4 (сверху). Изображения после наложения скелета в FibrilJ (снизу).

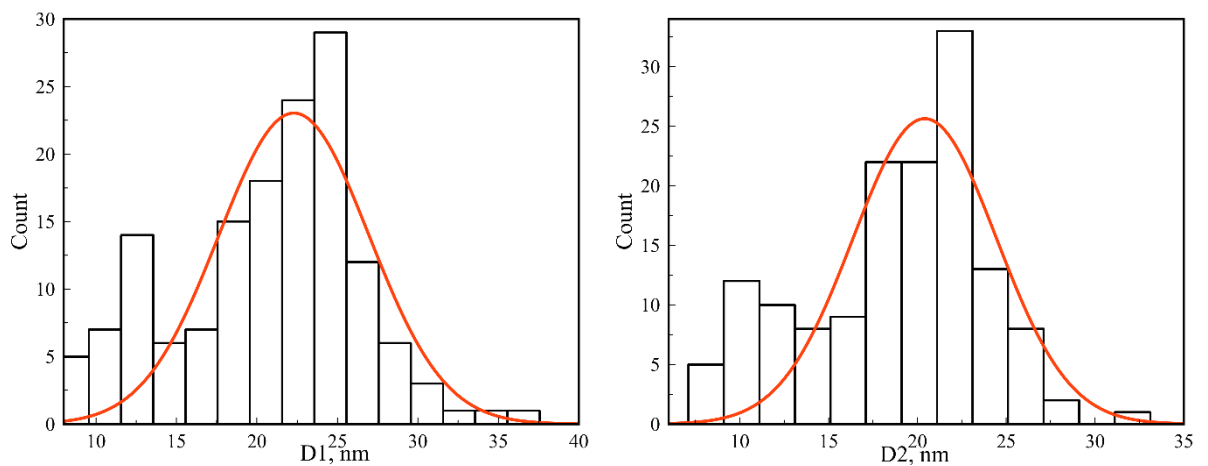


Рис.4.2.5(2) Распределение средних диаметров D1 и D2 фибрилл прионного белка Sup35NMp с мутацией M4.

Значение средних диаметров составили  $D1=22,3\pm 0,7\text{нм}$ ,  $D2=20,4\pm 0,5\text{нм}$ .

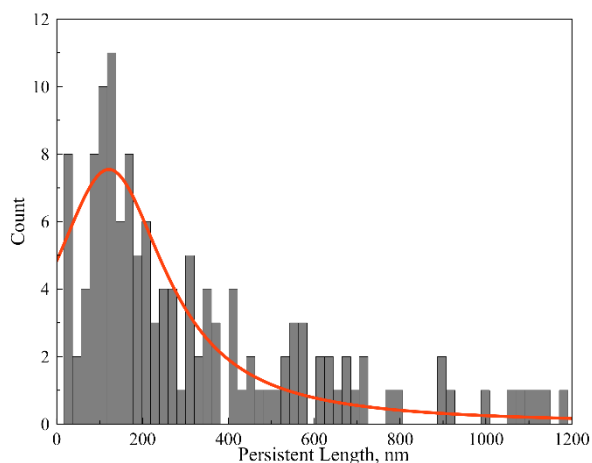
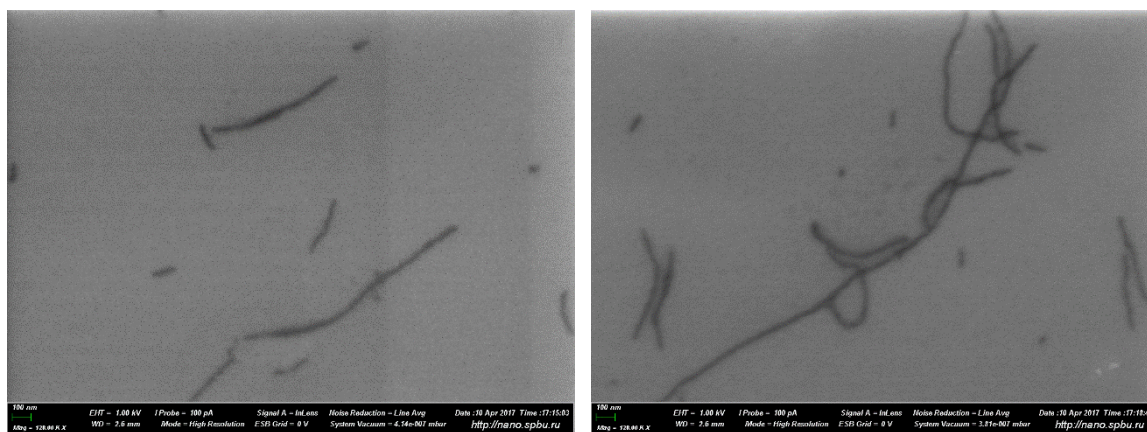


Рис. 4.2.5(3) Распределение по персистентным длинам для фибрилл прионного белка Sup35NMp с M4 мутацией.

Для персистентной длины получено значение  $\langle PL \rangle = 121 \pm 12 \text{ нм}$ , значение средней контурной длины  $\langle L \rangle = 189 \text{ нм}$ .  $\langle PL \rangle / \langle L \rangle = 0,64$ .

#### 4.2.6. Анализ фибрилл прионного белка Sup35NMp- M5

Расчет линейных характеристик фибрилл прионного белка Sup35NMp с мутацией M5:



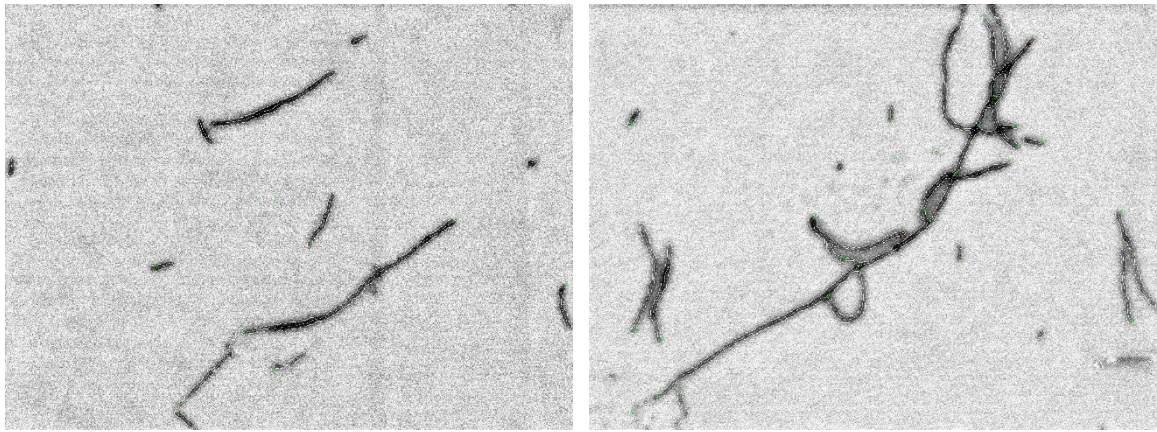


Рис. 4.2.6.(1) СЭМ изображения фибрилл прионного белка Sup35NMpr с мутацией M5 (сверху). Изображения после наложения скелета в FibrilJ (снизу).

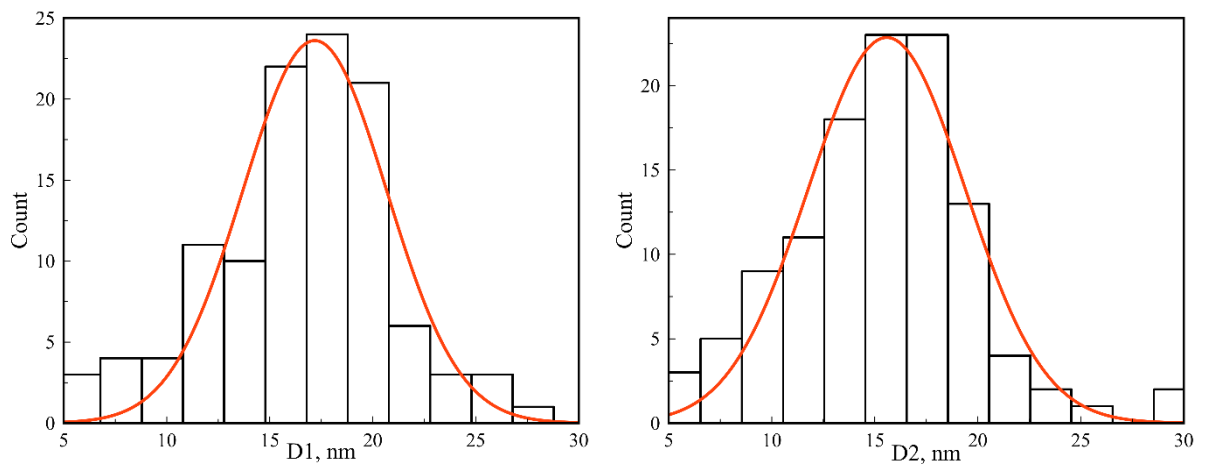


Рис.4.2.6(2) Распределение средних диаметров D1 и D2 фибрилл прионного белка Sup35NMpr с мутацией M5.

Значения средних диаметров составили  $D1=17,2\pm0,4\text{nm}$ ,  $D2=15,6\pm0,3\text{nm}$ .



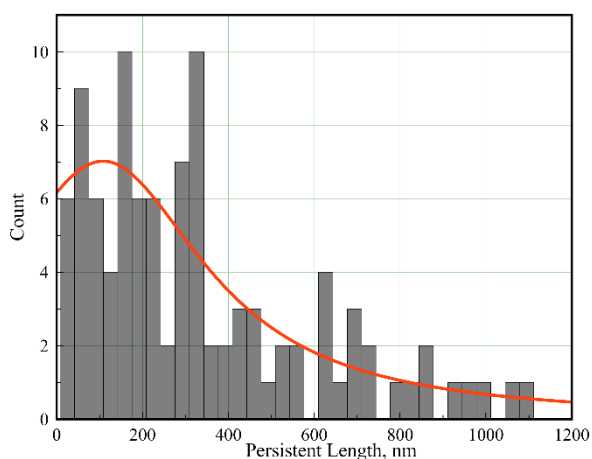


Рис. 4.2.6(3) Распределение по персистентным длинам для фибрилл прионного белка Sup35NMr с M5 мутацией.

Для персистентной длины получено значение  $\langle PL \rangle = 109 \pm 30 \text{ нм}$ , значение средней контурной длины  $\langle L \rangle = 222 \text{ нм}$ .  $\langle PL \rangle / \langle L \rangle = 0,49$ .

4.2.7. Сводная таблица линейных характеристик для дикого типа прионного белка Sup35NMr и его мутантных форм.

Sup35N	D1, нм	D2, нм	$\langle PL \rangle$ , нм	$\langle L \rangle$ , нм	$\langle PL \rangle / \langle L \rangle$
wT	$18,2 \pm 0,3$	$17,2 \pm 0,2$	$167 \pm 1$	100	1,67
M0	$22,1 \pm 0,9$	$20 \pm 0,6$	$117,9 \pm 0,6$	92	1,28
M1	$22,1 \pm 0,4$	$20,5 \pm 0,2$	$121,6 \pm 0,7$	83	1,47
M2	$23,8 \pm 0,1$	$21,7 \pm 0,1$	$208 \pm 4$	137	1,50
M4	$22,3 \pm 0,7$	$20,4 \pm 0,5$	$121 \pm 12$	188	0,64
M5	$17,1 \pm 0,4$	$15,5 \pm 0,3$	$108 \pm 30$	222	0,49

Таб.2. Значения средних диаметров D1, D2, контурной длины  $\langle L \rangle$ , персистентной длины  $\langle PL \rangle$ .

Значения средних диаметров для изображений, полученных методом сканирующей электронной микроскопии оказались выше значений, полученных методом атомно силовой микроскопии. Схожие результаты уже были получены ранее в нашей лаборатории для дикого белка Sup35NMr. Предполагается, что диаметры в случае с СЭМ несколько завышены из-за

принципиальной разницы в построении изображений разными методами. Для СЭМ изображений имеет место быть значительный контраст относительно поверхности кремния и края фибриллы.

Персистентные длины имеют довольно низкие значения относительно указанных в литературе и полученных ранее в лаборатории для дикого типа. В литературе указано значение персистенции для фибрилл, находящихся в растворе и составило 1мкм (С.Е. Castro 2011). В предыдущих экспериментах, проведенных Соколовым П. А. для дикого типа значения персистентных длин, были в районе 113мкм. Это объяснялось влиянием неровности поверхности на высаженные фибриллы. В данном эксперименте так же поверхность оказывала влияние на закрученность фибрилл. До этого, полученные фибриллы были маленького размера, рассматривались в основном короткие фрагменты. В данной работе предпочтение отдавалось длинным структурам, на которые так же повлияли неровности подложки.

Фибриллы разной длины хорошо фиксируются на слюдяных и кремниевых подложках, поэтому для них удобно проводить эксперименты на AFM и SEM.

#### 4.3. «Шубы» дикого типа и мутантов прионного белка Sup35N<sup>Mr</sup>.

Была обнаружена интересная особенность, при разбавлении полученных растворов в 100 раз, а именно при значениях концентрации мономерного белка порядка 0.03 мг/мл на изображении вокруг фибриллы появляется «шуба» из мономерного белка. Ранее высказывалось предположение, что М-домен может быть экспонирован наружу и как раз составлять так называемые «шубы». В данной работе были получены изображения «шуб» для дикого типа и M0-M4 мутаций. В программе NanoScope Analysis был сделан срез на высоте шуб, для дальнейшего обсчета их диаметров в FibrilJ.

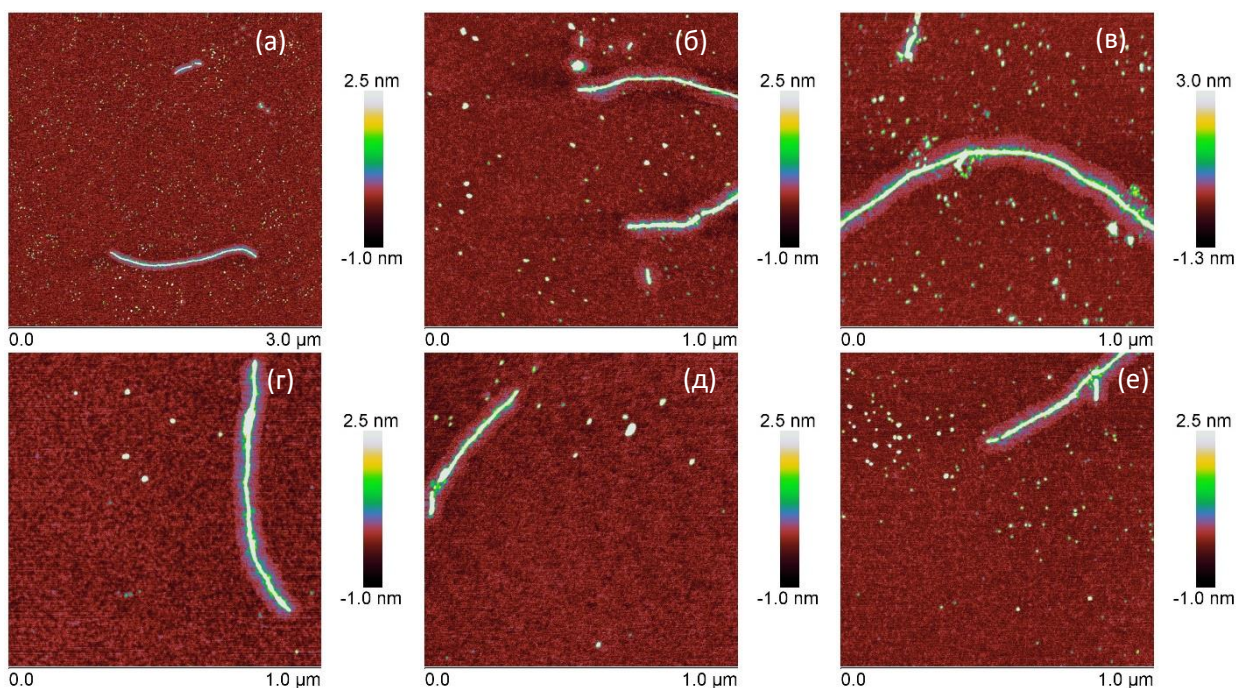


Рис.4.3(1) АСМ изображений «шуб» фибрилл Sup35NMP-wT(a), Sup35NMP-M0(б), Sup35NMP-M1(в), Sup35NMP-M2(г), Sup35NMP-M3(д), Sup35NMP-M4(е).

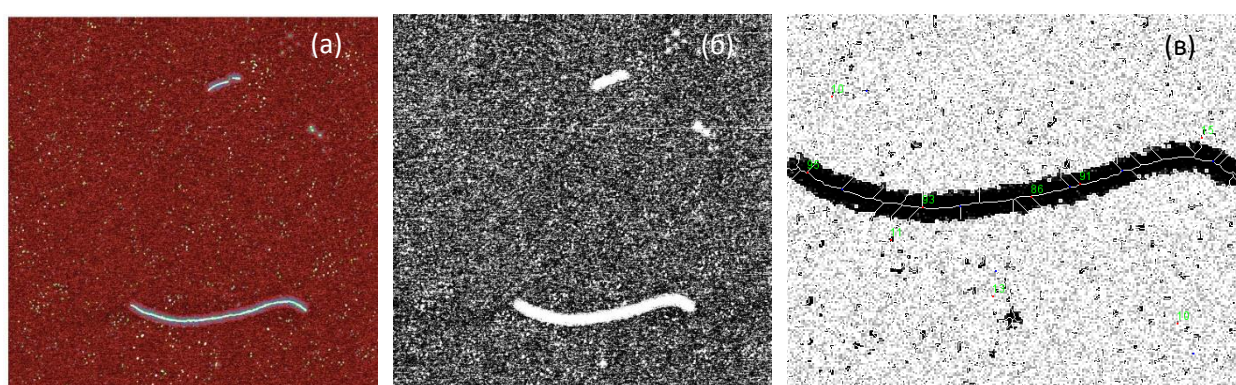


Рис.4.3(2) АСМ изображение фибриллы прионного белка Sup35NMP wT(a), срез «шубы» после NanoScope Analysis(б), наложение скелета в FibrilJ(в).

После анализа изображений полученные данные были сведены в таблицу:

Sup35NMP	D1, nm	D2, nm	h, nm
wT	96±2	83±2	0,6±0,2
M0	92±4	74±3	0,5±0,1
M1	83±1	70±1	0,6±0,1
M2	85±5	72±3	0,5±0,1
M3	84±2	67±2	0,5±0,1
M4	80±2	60±1	0,5±0,1

Таб.3. Значения средних диаметров «шуб» D1, D2 и высот h.

Как уже было сказано ранее, на изображениях видно, как длинные фибриллы агрегируют в большие жгуты. Исходя из полученных данных для радиусов фибрилл, можно высчитать, что средний радиус шубы равен  $R = 35 \pm 3 \text{ нм}$ .

На рисунках представлены примеры слипшихся фибрилл:

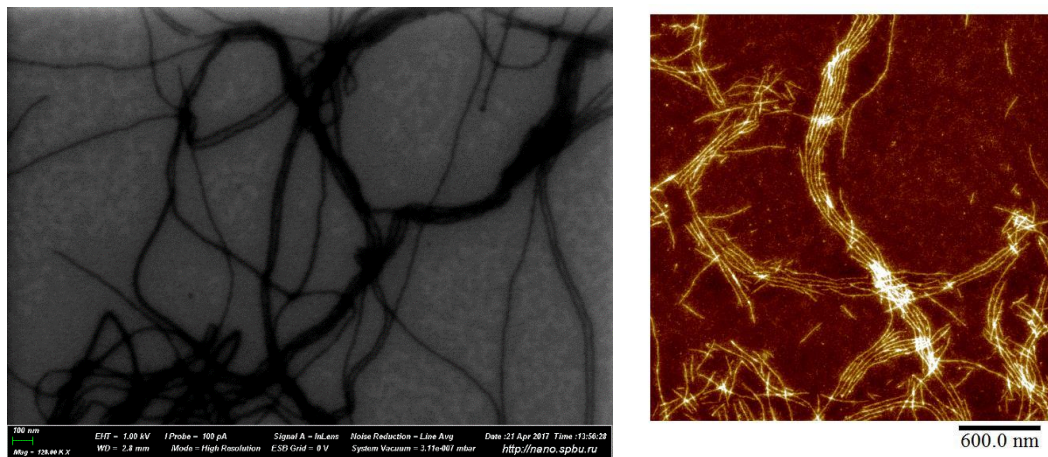


Рис.4.3(3). Изображения агрегировавших фибрилл полученные с помощью СЭМ и АСМ соответственно.

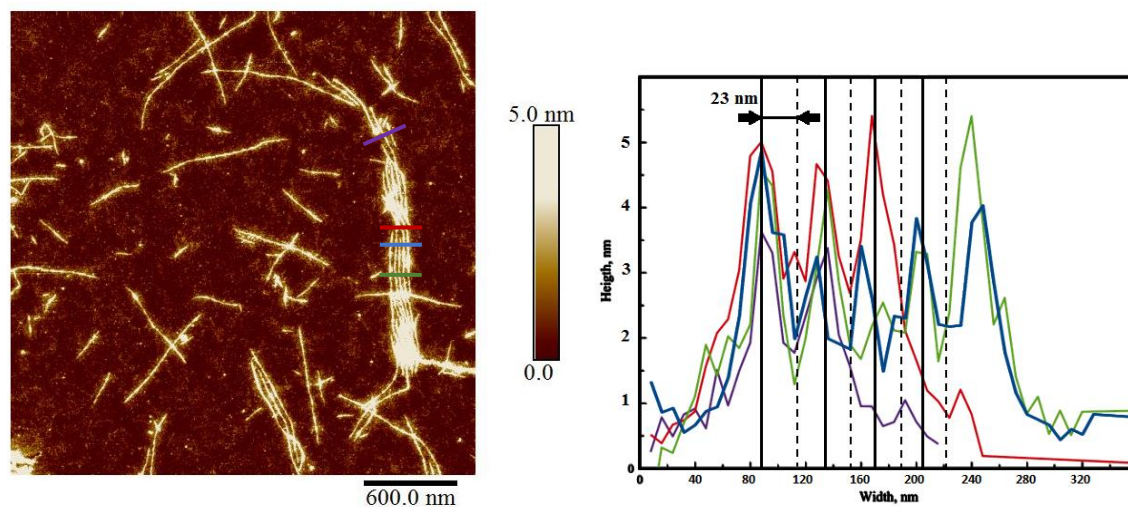


Рис.4.3(4) Изображение сгруппированных фибрилл прионного белка Sup35NMp-M4 (слева), и профили их высот(справа).

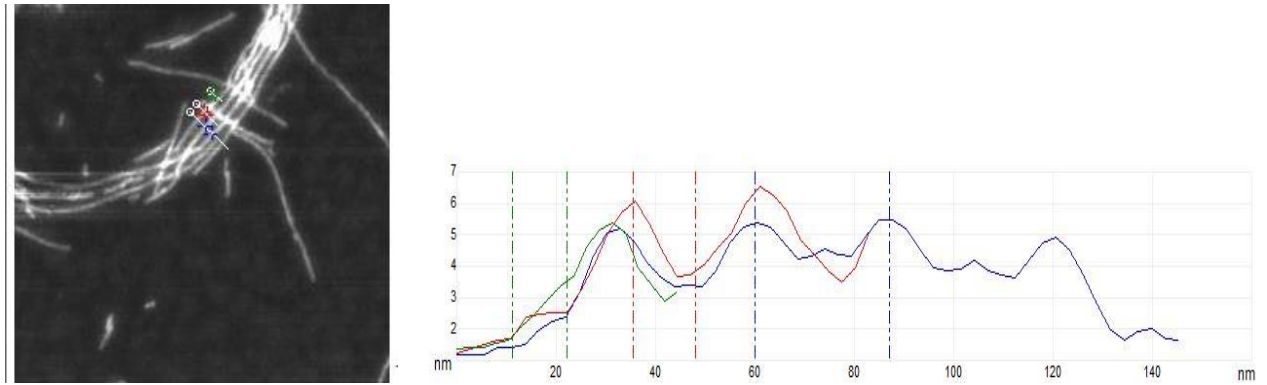


Рис.4.3(5). Изображение сгруппированных фибрилл прионного белка Sup35NMp-M5 (слева), и профили их высот(справа).

В случае сгруппированных фибрилл, расстояние между ними порядка 46 нм. Возможно, часть белка, составляющего шубу распределяется вдоль фибрилл, тем самым стабилизируя крупные фибриллярные агрегаты.

#### 4.4. Результаты

В работе проведено изучение белка Sup35NMp дикого типа и его мутантных форм после формирования фибрилл. Использовали методы атомной силовой и сканирующей электронной микроскопии. Массив полученных данных был обработан с помощью плагина FibrilJ. Проведено сравнение параметров фибрилл, оценка которых была выполнена с использованием набора изображений, полученных АСМ и СЭМ.

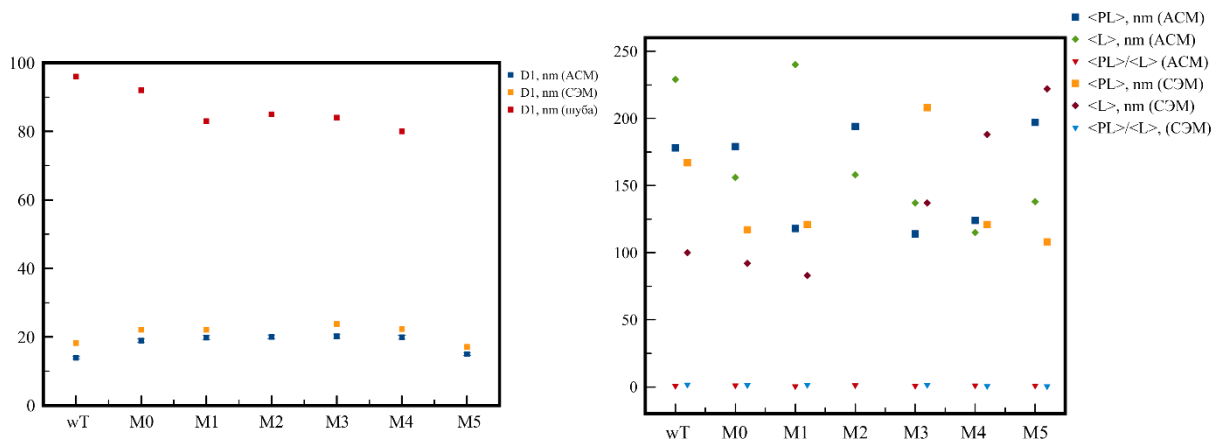


Рис.4.4(1) Значения D1, D2 фибрилл для дикого типа, всех мутаций и «шуб» (слева). Значения <PL>, <L>, <PL>/<L> фибрилл для дикого типа и всех мутаций (справа).

Просматривается закономерность для «шуб» фибрилл и их диаметров, а именно чем больше диаметр фибриллы, тем меньше «шуба». Это свидетельствует об изменении нативной

структуры прионов. В результате мутации нарушается как внутренняя организация (остов), так и внешняя (шубы). Таким образом, мутации затрагивают значимые для формирования участки фибриллы.

В случае длин не прослеживается какой-либо закономерности, что может быть связано с большим разбросом их значений, как видно из распределений, представленных ранее.

## 5. Выводы

- Получили линейные характеристики фибрилл прионного белка Sup35NMr дикого типа и его мутантов с использованием двух методов АСМ и СЭМ. Значения диаметров, полученные методом СЭМ оказались несколько завышенными, по сравнению с АСМ. Это связано с принципом построения изображений в СЭМ.
- Установили, что возникает конкуренция за связывание с гидрофильной подложкой слюды между фибриллярными структурами и мономерным белком.
- Фибриллы, полученные из прионного белка Sup35NMr мутаций M0, M1, M4, M5, склонны к слипанию и образованию длинных, вытянутых структур.
- Фибриллы окружены «шубами», состоящими из мономерного белка, который предположительно, стабилизирует сгруппированные фибриллы.
- Наличие мутаций влияет как на диаметры, так и на «шубы» фибрилл.

## 6. Благодарности

Выражаю благодарность ресурсному центру Научного парка Санкт-Петербургского государственного университета Нанотехнологии. Часть исследования была проведена на базе данного центра.



## 7. Список литературы

1. Citron M. Alzheimer's disease: strategies for disease modification // *Nat. Rev. Drug Discov.* 2010. T. 9. No 5. C. 387–98.
2. Castro C. E., J. Dong, M.C. Boyce, S. Lindquist, M.J. Lang, Physical properties of polymorphic yeast prion amyloid fibers, *Biophys. J.* 101 (2011) 439–448.
3. Cox B.S. [PSI+], a cytoplasmic supresor of super-supresor in yeast // *Genetics.* 1964. C. 505–521.
4. Decker C.J., Parker R. P-bodies and stress granules: possible roles in the control of translation and mRNA degradation // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2012. T. 4. No 9. C. a012286.
5. DePace A.H., Santoso A., Hillner P., Weissman J.S. A critical role for amino-terminal glutamine/asparagine repeats in the formation and propagation of a yeast prion // *Cell.* 1998. T. 93. No 7. C. 1241–52.
6. Doel S.M., Mccready S.J., Nierras C.R., Cox B.S. The dominant PNM2 mutation which eliminates the PSI factor of *Saccharomyces cerevisiae* is the result of missense mutation in the SUP35 gene // *Genetics.* 1994. T. 137. C. 659–670.
7. Eaglestone S.S., Cox B.S., Tuite M.F. Translation termination efficiency can be regulated in *Saccharomyces cerevisiae* by environmental stress through a prion-mediated mechanism // *EMBO J.* 1999. T. 18. No 7. C. 1974–81.
8. Fitzpatrick D.A., O'Brien J., Moran C., Hasin N., Kenny E., Cormican P., Gates A., Morris D.W., Jones G.W. Assessment of inactivating stop codon mutations in forty *Saccharomyces cerevisiae* strains: implications for [PSI] prion-mediated phenotypes // *PLoS One.* 2011. T. 6. No 12. C. e28684.
9. Fowler D.M., Koulov A. V, Alory-Jost C., Marks M.S., Balch W.E., Kelly J.W. Functional amyloid formation within mammalian tissue // *PLoS Biol.* 2006. T. 4. No 1. C. e6.
10. Gilks N., Kedersha N., Ayodele M., Shen L., Stoecklin G., Dember L.M., Anderson P. Stress granule assembly is mediated by prion-like aggregation of TIA-1 // *Mol. Biol. Cell.* 2004. T. 15. C. 5383–5398.
11. Halfmann R., Jarosz D.F., Jones S.K., Chang A., Lancaster A.K., Lindquist S. Prions are acommon mechanism for phenotypic inheritance in wild yeasts // *Nature.* 2012b. T. 482. No 7385. C. 363–368.
12. Hou F, Sun L Zheng H, Skaug B, Jiang Q, Chen Z, MAVS forms functional prion-like aggregates to activate and proragate antiviral innate immune response *Cell* 2001.
13. Kajava A. V., Baxa U., Wickner R.B., Steven A.C. A model for Ure2p prion filaments and other amyloids: the parallel superpleated beta-structure // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2004. T. 101. No21. C. 7885–7890.

14. King C.Y. Supporting the structural basis of prion strains: induction and identification of [PSI] variants // *J. Mol. Biol.* 2001. T. 307. No 5. C. 1247–60.
15. Liebman S.W., Sherman F. Extrachromosomal psi + determinant suppresses nonsense mutations in yeast // *J. Bacteriol.* 1979. T. 139. No 3. C. 1068–71.
16. Maji S.K., Perrin M.H., Sawaya M.R., Jessberger S., Vadodaria K., Rissman R. A., Singru P.S., Nilsson K.P.R., Simon R., Schubert D., Eisenberg D., Rivier J., Sawchenko P., Vale W., Riek R. Functional amyloids as natural storage of peptide hormones in pituitary secretory granules // *Science*. 2009. T. 325. No 5938. C. 328–32.
17. Nakayashiki T., Kurtzman C.P., Edskes H.K., Wickner R.B. Yeast prions [URE3] and [PSI+] are diseases // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2005. T. 102. No 30. C. 10575–80.
18. Nover L., Scharf K.D., Neumann D. Formation of cytoplasmic heat shock granules in tomato cell cultures and leaves // *Mol. Cell. Biol.* 1983. T. 3. No 9. C. 1648–1655.
19. Palmer E., Wilhelm J.M., Sherman F. Variation of phenotypic suppression due to the psi + and psi - extrachromosomal determinants in yeast // *J. Mol. Biol.* 1979. T. 128. No 1. C. 107–10.
20. Rogoza T., Goginashvili A., Rodionova S., Ivanov M., Viktorovskaya O., Rubel A., Volkov K., Mironova L. Non-Mendelian determinant [ISP+] in yeast is a nuclear-residing prion form of the global transcriptional regulator Sfp1 // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2010. T. 107. No 23. C. 10573–7.
21. Saifitdinova A.F., Nizhnikov A. A., Lada A.G., Rubel A. A., Magomedova Z.M., Ignatova V. V., Inge-Vechtomov S.G., Galkin A.P. [NSI (+)]: a novel non-Mendelian nonsense suppressor determinant in *Saccharomyces cerevisiae* // *Curr. Genet.* 2010. T. 56. No 5. C. 467–78.
22. Shewmaker F., McGlinchey R.P., Wickner R.B. Structural insights into functional and pathological amyloid // *J. Biol. Chem.* 2011. T. 286. No 19. C. 16533–40.
23. Shkundina I.S., Kushnirov V. V., Tuite M.F., Ter-Avanesyan M.D. The role of the N-terminal oligopeptide repeats of the yeast Sup35 prion protein in propagation and transmission of prion variants // *Genetics*. 2006. T. 172. No 2. C. 827–835.
24. Sokolov P. A., Belousov M. V., Bondarev S. A., Zhouravleva G. A. , Kasyanenko N.A. FibrilJ: ImageJ Plugin for Fibrils' Diameter and Persistence Length Determination// *Computer Physics Communications*, 2017.
25. stress // *PLoS Biol.* 2008. T. 6. No 11. C. e294.
26. Ter-Avanesyan M.D., Dagkesamanskaya A.R., Kushnirov V. V., Smirnov V.N. The SUP35 omnipotent suppressor gene is involved in the maintenance of the non-mendelian determinant [psi+] in Yeast *Saccharomyces cerevisiae* // *Genetics*. 1994. T. 137. C. 671–676.
27. Tyedmers J., Madariaga M.L., Lindquist S. Prion switching in response to environmental

28. Wang C., Liu X., Wei B. Mitochondrion: an emerging platform critical for host antiviral signaling // *Expert Opin. Ther. Targets*. 2011. T. 15. No 5. C. 647–665.
29. Wickner R.B. [URE3] as an altered URE2 protein: evidence for a prion analog in *Saccharomyces cerevisiae* // *Science*. 1994. T. 264. No 5158. C. 566–9.
30. Wickner R.B., Masison D.C., Edskes H.K. [PSI] and [URE3] as yeast prions // *Yeast*. 1995. T. 11. No 16. C. 1671–85.
31. Wilczynska A., Aigueperse C., Kress M., Dautry F., Weil D. The translational regulator CPEB1 provides a link between dcp1 bodies and stress granules // *J. Cell Sci*. 2005. T. 118. No Pt 5. C. 981–92.
32. Бондарев С. А., Влияние мутация в прионизирующем домене белка Sup35 на свойства приона [PSI<sup>+</sup>] дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, 2014.
33. Шкундина И. С., Тер-Авесян М. Д., Успехи биологической химии, 2006