

УДК 577

## СУПЕРПРОДУКЦИЯ $\alpha$ -СИНУКЛЕИНА В КЛЕТКАХ НЕЙРОБЛАСТОМЫ ПРИВОДИТ К НАКОПЛЕНИЮ ТИОФЛАВИН S-ПОЗИТИВНЫХ АГРЕГАТОВ И УМЕНЬШЕНИЮ ИНТЕНСИВНОСТИ ГЛИКОЛИЗА

© 2020 А.К. Мельникова<sup>1\*</sup>, Д.В. Поздышев<sup>2</sup>, К.В. Баринава<sup>2</sup>,  
С.С. Кудрявцева<sup>1</sup>, В.И. Муронец<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, факультет биоинженерии и биоинформатики, 119234 Москва, Россия; электронная почта: alksmelnikova@gmail.com

<sup>2</sup> Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, 119234 Москва, Россия

Поступила в редакцию 17.02.2020

После доработки 13.03.2020

Принята к публикации 25.03.2020

Важной особенностью синуклеинопатий, в том числе болезни Паркинсона, является ухудшение энергетического метаболизма пораженных клеток. Целью данной работы было изучение взаимосвязи накопления различных форм  $\alpha$ -синуклеина с интенсивностью гликолиза. Нами были получены стабильные клеточные линии нейробластомы SH-SY5Y, продуцирующие  $\alpha$ -синуклеин дикого типа и мутантный белок A53T, присутствующий у больных с наследственными формами болезни Паркинсона. Было показано, что суперпродукция двух типов  $\alpha$ -синуклеина приводит к накоплению тιοфлавинов S-позитивных агрегатов. При этом количество агрегатов существенно выше при суперпродукции мутантной формы  $\alpha$ -синуклеина A53T по сравнению с белком дикого типа. Изменения энергетического обмена, проявляющиеся в уменьшении накопления лактата и потреблении глюкозы, были обнаружены при суперпродукции двух форм  $\alpha$ -синуклеина в стабильных клеточных линиях. Кроме того, снижение интенсивности гликолиза коррелировало со снижением активности глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (ГАФД). Проведенные с выделенными белками эксперименты показали, что инактивация гликолитического фермента ГАФД происходит после его связывания с мономерными и олигомерными формами  $\alpha$ -синуклеина. Таким образом, было показано, что одной из причин ухудшения энергетического обмена при синуклеинопатиях может быть уменьшение активности ГАФД, индуцированное ее взаимодействием с  $\alpha$ -синуклеином.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:**  $\alpha$ -синуклеин, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа, гликолиз, болезнь Паркинсона.

DOI: 10.31857/S0320972520050097

### ВВЕДЕНИЕ

Болезнь Паркинсона – это нейродегенеративное заболевание, характеризующееся образованием в нервных клетках белковых агрегатов, телец Леви, преимущественно состоящих из белка  $\alpha$ -синуклеина, а также изменениями энергетического метаболизма. В то время как многое известно об ухудшении энергетического обмена в митохондриях и сопутствующем окислительном стрессе [1, 2], исследований на тему вовле-

чения метаболизма глюкозы в нейродегенеративные нарушения совсем немного. С одной стороны, повышенный уровень лактата был зафиксирован в мозговых тканях у больных с болезнью Паркинсона *in vivo* с помощью магнитной резонансной спектроскопии [3], а продолжительные инкубации с лактатом приводили к олигомеризации  $\alpha$ -синуклеина в клеточной модели [4]. С другой стороны, было обнаружено, что индуцированные паракватом – веществом, вызывающим спорадические формы болезни Паркинсона – изменения метаболизма включают снижение продукции лактата и накопление глицеральдегид-3-фосфата (Г-3-Ф), являющегося субстратом глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (ГАФД) [5]. Кроме того, индукция продукции  $\alpha$ -синуклеина дикого типа и мутанта A53T с помощью аденовирусного вектора увеличивала токсичность параквата и усиливала нару-

Принятые сокращения: ГАФД – глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа; чГАФД – рекомбинантная ГАФД человека; Г-3-Ф – глицеральдегид-3-фосфат; PBS – фосфатно-солевой буфер, pH 7,4;  $\alpha$ -synWT –  $\alpha$ -синуклеин дикого типа,  $\alpha$ -synA53T –  $\alpha$ -синуклеин мутантной формы A53T, КД – круговой дихроизм, ThT – тιοфлавин T; ThS – тιοфлавин S.

\* Адресат для корреспонденции.

шения метаболизма глюкозы [5]. Эти наблюдения свидетельствуют о возможной роли дисфункции ГАФД в развитии данной патологии. Важно отметить, что исходно в нейронах наиболее активен пентозофосфатный путь метаболизма глюкозы, участвующий в наработке восстановительных агентов, в том числе защищающих клетку от окислительного стресса [6, 7]. Именно нарушения в пентозофосфатном пути считаются одними из первых патологических проявлений при развитии болезни Паркинсона [8].

В данной работе мы изучили зависимость изменений метаболизма глюкозы от содержания различных форм  $\alpha$ -синуклеина в клетке. Известно, что повышенная склонность к болезни Паркинсона у людей обнаруживается как в случае наличия мутаций A53T, E46K, A30P, связанных с аутосомно-доминантным наследованием болезни [9–11], так и в случае дупликации и трипликации участка хромосомы, содержащего ген  $\alpha$ -синуклеина дикого типа, приводящих к повышенной продукции белка [12, 13]. В связи с этим мы разработали клеточные модели болезни Паркинсона на основе клеток нейробластомы SH-SY5Y с повышенной продукцией  $\alpha$ -синуклеина дикого типа ( $\alpha$ -synWT) или мутантной формы A53T ( $\alpha$ -synA53T), полученными методом транзientной трансфекции, либо методом получения клонов со стабильной экспрессией белка.

Мы также сосредоточились на роли гликолитического фермента ГАФД в изменении интенсивности гликолиза при болезни Паркинсона. Уменьшение гликолитической активности ГАФД уже было показано для других нейродегенеративных заболеваний – болезни Альцгеймера и болезни Хантингтона [14, 15]. Иммуноцитохимические данные о колокализации  $\alpha$ -синуклеина и ГАФД в тельцах Леви [16], а также формирование структур, напоминающих тельца Леви при одновременной продукции этих двух белков [17], указывают на их возможное взаимодействие. Ранее нами были получены сведения о взаимодействии ГАФД с  $\alpha$ -синуклеином, вызывающим инактивацию фермента, в системе *in vitro* [18].

Таким образом, в данной работе нами было изучено изменение эффективности гликолиза при продукции в клетках разных форм  $\alpha$ -синуклеина, а также возможная роль взаимодействий между ГАФД и  $\alpha$ -синуклеином в регуляции энергетического обмена.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Культура клеток.** Клетки нейробластомы человека SH-SY5Y были любезно предоставлены

Университетом Катании, Италия. Клетки культивировали в среде DMEM/F-12 («Панэко», Россия) с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки («HyClone», США) и 100× раствора GlutaMAX («Gibco», США), 50 ед/мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина («Панэко», Россия). Клеточные культуры выращивали в увлажненной атмосфере при 5%-ном содержании CO<sub>2</sub> при 37 °C и пересевали при достижении конfluence 80–90%. В экспериментах с транзientной трансфекцией использовали клеточную культуру до 25-го пассажа, полученные моноклональные культуры с продукцией  $\alpha$ -синуклеина использовали до 25-го пассажа с учетом процедур отбора.

**Транзientная и стабильная продукция  $\alpha$ -синуклеина.** Ген дикого типа  $\alpha$ -синуклеина ( $\alpha$ -synWT) был получен, как описано ранее [19], и клонирован в вектор pVax1 («Thermo Fisher», США). Мутантный ген  $\alpha$ -синуклеина A53T ( $\alpha$ -synA53T) был получен с помощью сайт-направленного мутагенеза, используя Phusion site-directed mutagenesis kit («Thermo Scientific», США). Клетки нейробластомы SH-SY5Y были трансфицированы полученными конструкциями pVax- $\alpha$ -synWT и pVax- $\alpha$ -synA53T с помощью реагента Lipofectamine 2000 («Invitrogen», США), согласно протоколу производителя. Для получения моноклонов со стабильной продукцией  $\alpha$ -synWT и  $\alpha$ -synA53T были переклонированы в вектор pcDNA3.1Hygro(+) («Invitrogen», США). Клетки были трансфицированы TransIT-LT1 («Mirus», США), через 2 дня после трансфекции в культуральной среде добавили 200 мкг/мл гиромидина В («Invitrogen», США) и инкубировали еще 10 дней. Устойчивые клетки были использованы для получения моноклонов и протестированы на наличие вставки гена  $\alpha$ -синуклеина методом ПЦР на матрице геномной ДНК, выделенной с помощью TRI REAGENT («Molecular Research Center», США).

**Иммуноцитохимическое окрашивание.** Клетки нейробластомы SH-SY5Y переносили на 24-луночные планшеты по  $15 \times 10^4$  клеток в лунку на покровные стекла диаметром 12 мм («Menzel», Германия). Клетки окрашивали через 3–6 дней после трансфекции или, в случае стабильной продукции  $\alpha$ -синуклеина, на следующий день после рассадки. Клетки промывали холодным раствором фосфатно-солевого буфера (10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,76 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2,7 mM KCl, 137 mM NaCl), pH 7,4 (PBS), фиксировали в течение 20 мин 4%-ным раствором параформальдегида в PBS и пермеабелизовали в течение 10 мин 0,25%-ным раствором Triton X-100. Для блокировки неспецифического связывания препарат инкубировали в течение 30 мин в

1%-ном растворе БСА в PBS (блокирующий раствор). Затем клетки инкубировали с первичными антителами, специфичными к  $\alpha$ -синуклеину, разведенными в блокирующем растворе (1 : 50, клон syn205, «Cell Signaling Technology», США), в течение 1 ч, тщательно отмывали в PBS и инкубировали со вторичными анти-мышинными антителами козы, конъюгированными с FITC (1 : 1000 в блокирующем растворе, «Abcam», США), в течение 1 ч. После отмывки в PBS от вторичных антител ядра клеток в течение 10 мин окрашивали 1 мкг/мл DAPI («Sigma», США). Для окрашивания тиофлавином S (ThS) («Sigma», США) клетки после пермеабилзации инкубировали в течение 20 мин с 0,05%-ным раствором ThS в этаноле, дважды промывали 70%-ным этанолом и один раз PBS перед контрастированием. Покровные стекла заключали на предметных стеклах («Menzel», Германия) с помощью заключающей среды Mowiol («Sigma», США), анализировали и фотографировали с помощью флуоресцентного микроскопа Axiovert 200 M («Carl Zeiss», Германия) и цифровой камеры с охлаждением CCD camera ORCAII-ERG2 («Hamamatsu Photonics», Япония).

**Измерение гликолитических параметров в клеточных лизатах.** Клетки нейробластомы SH-SY5Y переносили в 6-луночные планшеты по  $1 \times 10^6$  клеток в лунку и лизировали на следующий день (в случае стабильной продукции  $\alpha$ -синуклеина) или через 2–3 дня после трансфекции. Клетки открепляли от подложки с помощью 0,25%-ного раствора трипсина-версена («Панэко», Россия). Клетки осаждали центрифугированием («Eppendorf», США), клеточный осадок дважды промывали холодным PBS, затем ресуспендировали в PBS с добавлением коктейля ингибиторов протеаз («Amresco», США) и обрабатывали ультразвуком («Branson Digital Sonicator», США). Клеточные обломки отделяли центрифугированием, концентрацию общего белка измеряли по методу Брэдфорда [20]. Каждую пробу разбавляли буфером PBS для достижения одинаковой конечной концентрации общего белка. Далее каждую пробу разделяли на две части: к первой части добавляли субстрат гликолиза (10 мМ глюкозы) и смесь кофакторов гликолитических ферментов (0,5 мМ АТФ, 1 мМ АДФ, 0,5 мМ  $\text{NAD}^+$ , 0,8 мМ  $\text{Mg}^{2+}$ ), ко второй части вместо указанной смеси добавляли такой же объем растворителя субстратов (воды). Пробу инкубировали при 25 °С и измеряли ферментативную активность ГАФД. Через 2 ч инкубации для остановки гликолиза белки осаждали, как было описано ранее [21], и определяли концентрацию лактата энзиматически, как описано в подразделе

«Определение концентрации лактата». Для расчета скорости продукции лактата концентрацию лактата в пробе без добавок вычитали из концентрации лактата в пробе с добавлением глюкозы и кофакторов гликолитических ферментов и нормализовали на содержание общего белка в пробе и время инкубации.

**Определение активности ГАФД.** Ферментативную активность ГАФД (1.2. 1.12) определяли, как было описано ранее [22]. Для измерения активности в клеточных лизатах в реакционную смесь добавляли пробу, содержащую 20–40 мкг общего белка. Для измерения скорости и степени инактивации ГАФД  $\alpha$ -синуклеином к реакционной смеси добавляли аликвоты (5 мкл), содержащие 1 мкг рекомбинантной ГАФД человека (чГАФД). За единицу ферментативной активности принимали количество мкмоль образовавшегося NADH за 1 мин в расчете на 1 мг белка.

**Измерения глюкозы и лактата.** Для измерения поглощения глюкозы и образования лактата клетки нейробластомы SH-SY5Y переносили в 24-луночные планшеты по  $15 \times 10^4$  клеток в лунку. На следующий день культуральную среду заменяли на свежую, и после 4 ч инкубации отбирали 200 мкл среды. В отобранных аликвотах и некondиционированной среде измеряли концентрацию лактата и глюкозы энзиматическим методом, как описано ниже. Клетки в каждой лунке лизировали в 50 мкл PBS с 1%-ным раствором Triton X-100, и концентрацию общего белка определяли с бицинониновой кислотой, используя BSA Protein Assay Kit («Thermo Scientific», США), согласно протоколу производителя.

**Определение концентрации лактата.** Концентрацию лактата определяли энзиматически с помощью реакции с лактатдегидрогеназой (1.1.1.27), измеряя накопление NADH спектрофотометрически при длине волны 340 нм («Shimadzu», Япония), как описано ранее [21].

**Определение концентрации глюкозы.** Концентрацию глюкозы определяли энзиматически, используя набор Glucose Assay Kit («Sigma», США), согласно инструкции производителя.

**Иммуноблоттинг.** Для подтверждения продукции  $\alpha$ -синуклеина в моноклонах со вставкой рекомбинантного гена клетки лизировали в буфере RIPA (25 мМ Tris-HCl, pH 7,6, 150 мМ NaCl, 1%-ный NP-40, 1%-ный дезоксихолат натрия, 0,1%-ный Ds-Na, 1 мМ PMSF) («Sigma», США) с добавлением коктейля ингибиторов протеаз. Концентрацию общего белка в растворимой части лизатов определяли спектрофотометрически при длине волны 280 нм и разбавляли до одинакового значения перед на-

несением на гель. Для детекции олигомеров  $\alpha$ -синуклеина в лунку наносили 3 мкг общего белка. Ds-Na-ПААГ электрофорез в восстанавливающих условиях проводили в 16%-ном разделяющем геле (в случае клеточных лизатов) или 4–20%-ном градиентном разделяющем геле (в случае олигомеров) с последующим переносом на нитроцеллюлозную мембрану («BioRad», США) в течение 2 ч при постоянной силе тока 150 мА. Перед окрашиванием антителами мембрану фиксировали в 0,4%-ном растворе параформальдегида в PBS [23]. Мембрану блокировали в 5%-ном растворе молока в Tris-солевом буфере (20 мМ Tris-HCl, pH 7,6, 150 мМ NaCl, 0,05%-ный (v/v) раствор Tween 20) и согласно стандартной методике окрашивали мышинными моноклональными антителами к  $\alpha$ -синуклеину (1 : 1000, клон syn205, «Cell Signaling Technology», США или 1 : 2000, клон LB509, «Abcam», США) в течение ночи при 4 °С, затем инкубировали со вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена (1 : 2000, «Jackson ImmunoResearch», США) в течение 1 ч при 25 °С и проявляли с помощью усиленной хемилюминесценции («Advansta WesternBright ECL», США) на ChemiDoc XRS+ («BioRad», США).

**Выделение и анализ рекомбинантных белков. чГАФД.** Рекомбинантная ГАФД человека была выделена согласно ранее опубликованному протоколу [22]. чГАФД хранили в виде сульфат-аммонийной суспензии при 4 °С и обессоливали непосредственно перед экспериментом на гелефильтрационной колонке с G-50 сефарозой («GE Healthcare», США). Концентрацию белка определяли по методу Брэдфорда [20].

**$\alpha$ -синуклеин.** Рекомбинантный  $\alpha$ -синуклеин человека дикого типа и мутантная форма A53T были выделены по ранее описанному протоколу [24]. Концентрацию белка определяли спектрофотометрически, используя удельный коэффициент поглощения  $A_{280\text{ nm}}^{1\%}$  4,12.

**Получение олигомеров и фибрилл  $\alpha$ -синуклеина.** Сульфат-аммонийную суспензию  $\alpha$ -синуклеина осаждали с помощью центрифугирования («Eppendorf», США) и диализовали против буфера PBS, pH 7,4 (для получения олигомеров), или PBS, pH 4,0 (для получения фибрилл). После диализа раствор белка центрифугировали («Eppendorf», США) в течение 10 мин при 12 000 g для избавления от потенциальных агрегатов. Для получения олигомеров 8–12 мг/мл раствор  $\alpha$ -синуклеина в PBS pH 7,4 инкубировали при 37 °С в течение 20–24 ч без перемешивания, далее центрифугировали в течение 10 мин при 12 000 g, после чего супернатант фильтровали через центрифужные фильтры

YM-100 с пределом пропускания 100 кДа («Millipore», США) для обогащения олигомерной фракции. Концентрацию олигомеров определяли либо спектрофотометрически, используя удельный коэффициент поглощения  $A_{280\text{ nm}}^{1\%}$  4,12, либо методом с использованием бицинхониновой кислоты (BCA Protein Assay Kit, «Thermo Scientific», США), согласно протоколу производителя. Для получения фибрилл раствор  $\alpha$ -синуклеина (1 мг/мл) в PBS pH 4,0 инкубировали при 37 °С при перемешивании 600 rpm («Biosan», Латвия) в течение 72 ч. Образование фибрилл контролировали с помощью изменения флуоресценции тиофлавина Т (ThT) («BMG LABTECH GmbH», Германия). Для определения концентрации белка равный объем 6 М гидрохлорида гуанидина добавляли к пробе фибрилл, инкубировали в течение 24 ч при 25 °С, затем измеряли концентрацию белка спектрофотометрически при длине волны 280 нм.

**Анализ флуоресценции ThT.** Для записи спектра эмиссии флуоресценции ThT пробы, содержащие 7 мкМ белка (в расчете на мономер) и 150 мкМ ThT, инкубировали в течение 10 мин при 25 °С. Спектр прописывали в диапазоне 450–600 нм при длине волны возбуждающего света 435 нм на спектрофлуориметре FluoroMax-3 («Horiba Jobin Yvon», Франция). Для контроля образования фибрилл отбирали аликвоты 5 мкл от пробы (70 мкМ (1 мг/мл)  $\alpha$ -синуклеина в PBS pH 4,0), добавляли к 95 мкл 25 мкМ раствора ThT и измеряли флуоресценцию на планшетном ридере CLARIOstar («BMG LABTECH GmbH», Германия), как описано ранее [24].

**Спектроскопия кругового дихроизма (КД).** Образцы с концентрацией белка 70 мкМ в PBS, pH 7,4 исследовали с помощью спектроскопии КД, регистрируя спектры в диапазоне 200–240 нм при 20 °С в кюветках с длиной оптического пути 0,1 мм на спектрометре Applied Photophysics Chirascan («Applied Photophysics», Великобритания). Каждый представленный спектр получали усреднением 5 записей.

**Нативный электрофорез в щелочной среде.** Пробы белка в буфере для образцов (состав 4× буфера: 0,2 М Tris-HCl, pH 6,8; 20%-ный (v/v) глицерин; 0,02%-ный бромфеноловый синий), содержащие 10 мкг белка, наносили на 3%-ный концентрирующий гель (pH 6,8) и разделяли в 3–15%-ном градиентном разделяющем геле (pH 8,8) без Ds-Na. Электрофорез проводили при максимальном напряжении 120 В в течение 3–4 ч в охлажденном до 4 °С буфере (0,025 М Tris-HCl, 0,192 М глицин, pH 8,3).

**Статистическая обработка результатов.** Данные представлены либо в виде диаграммы раз-

маха, усы которой показывают возможные выбросы согласно расчету:  $X_1 = Q_1 - k(Q_3 - Q_1)$ ,  $X_2 = Q_3 + k(Q_3 - Q_1)$ , где  $X_1$  и  $X_2$  – нижняя и верхняя границы усов соответственно;  $Q_1$  и  $Q_3$  – первый и третий квартили;  $k = 1,5$ . Для статистического анализа был использован программный пакет OriginPro b9.2.196 (2015) («OriginLab Corporation», США). Для определения наличия статически значимого отличия между выборками с использованием всех полученных данных был использован однофакторный дисперсионный анализ с апостериорными множественными сравнениями по критерию Фишера (критерию наименьших значимых различий) (<https://www.originlab.com/doc/Origin-Help/ANOVA-CRD>) и тестом Левена ([https://www.originlab.com/doc/Origin-Help/OneWayANOVA-Algorithm#Homogeneity\\_of\\_Variance](https://www.originlab.com/doc/Origin-Help/OneWayANOVA-Algorithm#Homogeneity_of_Variance)) на гомогенность дисперсий с уровнем значимости 0,05. Нормальность распределения определяли с помощью критерия Колмогорова–Смирнова (<https://www.originlab.com/doc/Origin-Help/NormalityTest-Algorithm>). В случае невозможности использования дисперсионного анализа был применен непараметрический  $U$ -критерий Манна–Уитни (<https://www.originlab.com/doc/Origin-Help/MW-Test-Algorithm>) с уровнем статистической значимости  $p = 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для оценки возможного влияния разных форм  $\alpha$ -синуклеина на интенсивность гликолиза нами были получены клетки нейробластомы SH-SY5Y, транзистентно трансфицированные вектором pVax, содержащим ген  $\alpha$ -синуклеина дикого типа ( $\alpha$ -synWT) или мутантной формы A53T ( $\alpha$ -synA53T), склонной к агрегации. На рис. 1 представлены данные по иммуноцитохимическому окрашиванию транзистентно трансфицированных клеток антителами к  $\alpha$ -синуклеину (рис. 1, а и в) и флуоресцентным красителем ThS (рис. 1, б и г), связывающимся с амилоидными агрегатами, имеющими вторичную структуру бета-листа. При окрашивании антителами к  $\alpha$ -синуклеину мы наблюдали диффузное цитоплазматическое окрашивание у 20–25% клеток, продуцирующих  $\alpha$ -синуклеин в результате успешной трансфекции. ThS-позитивные агрегаты при этом наблюдали только в клетках, трансфицированных  $\alpha$ -synA53T, склонным к агрегации. Точечные скопления имели перинуклеарную и цитоплазматическую локализацию (рис. 1, г).

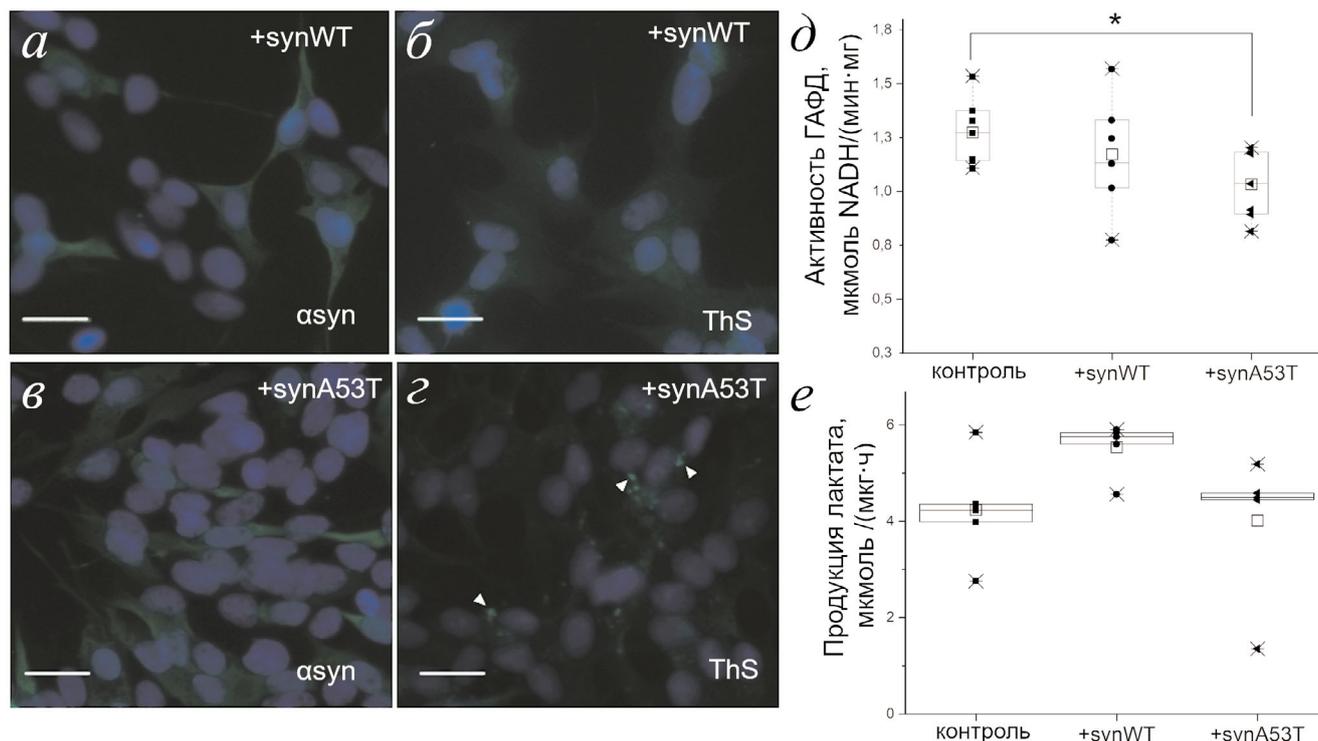
Для оценки влияния продукции и агрегации  $\alpha$ -синуклеина на энергетические процессы

клетки мы определяли активность гликолитического фермента ГАФД (рис. 1, д) и скорость накопления лактата (рис. 1, е) в лизатах клеток SH-SY5Y. В качестве отрицательного контроля использовали клетки, трансфицированные пустым вектором. При измерении активности ГАФД мы предварительно подтвердили, что в отсутствие избытка субстрата ГАФД (Г-3-Ф) активность не регистрируется. Мы также убедились, что добавление глюкозы и смеси кофакторов гликолитических ферментов, которые добавляли для запуска гликолиза и регистрации накопления лактата, не влияло на активность ГАФД. Как можно видеть из рис. 1, д, активность ГАФД в лизатах статистически значимо снижена только в случае транзистентной экспрессии  $\alpha$ -synA53T, но не  $\alpha$ -synWT. При этом скорость накопления лактата при добавлении к лизатам избытка глюкозы и смеси кофакторов гликолитических ферментов статистически достоверно не отличалась для разных типов клеток.

Отсутствие значительных изменений интенсивности гликолиза в опытах с использованием транзистентной трансфекции могло быть связано с тем, что только в 20–25% клеток происходила продукция  $\alpha$ -синуклеина, и нетрансфицированные клетки вносили основной вклад в конечный результат. Для того чтобы исключить влияние нетрансфицированных клеток на измеряемые параметры, нами были получены стабильные клеточные линии, экспрессирующие  $\alpha$ -synWT или  $\alpha$ -synA53T, на основе транзистентно трансфицированных клеток с помощью метода отбора клонов.

Результаты оценки продукции  $\alpha$ -синуклеина в различных стабильных клонах клеточной линии SH-SY5Y с помощью иммуноблоттинга представлены на рис. 2, а. Как следует из приведенных на рис. 2, а результатов, нами было получено несколько клонов с высокой продукцией  $\alpha$ -synWT или  $\alpha$ -synA53T. Однако, стоит отметить, что продукция  $\alpha$ -synWT была в среднем выше, чем  $\alpha$ -synA53T. Возможно, это связано с высокой токсичностью  $\alpha$ -synA53T при суперпродукции для клетки, что было показано ранее [25]. Для дальнейшей работы мы выбрали клон 1, продуцирующий  $\alpha$ -synWT, и клон 4, продуцирующий  $\alpha$ -synA53T (рис. 2, а), как наиболее близкие друг к другу по уровню продукции белка.

При использовании стабильных клеточных линий после окраски антителами, специфичными к  $\alpha$ -синуклеину, положительное окрашивание было обнаружено во всех клетках. При этом происходило скопление  $\alpha$ -синуклеина в точечные агрегаты как в случае продукции  $\alpha$ -synWT, так и  $\alpha$ -synA53T (рис. 2, б и г). Наличие внут-

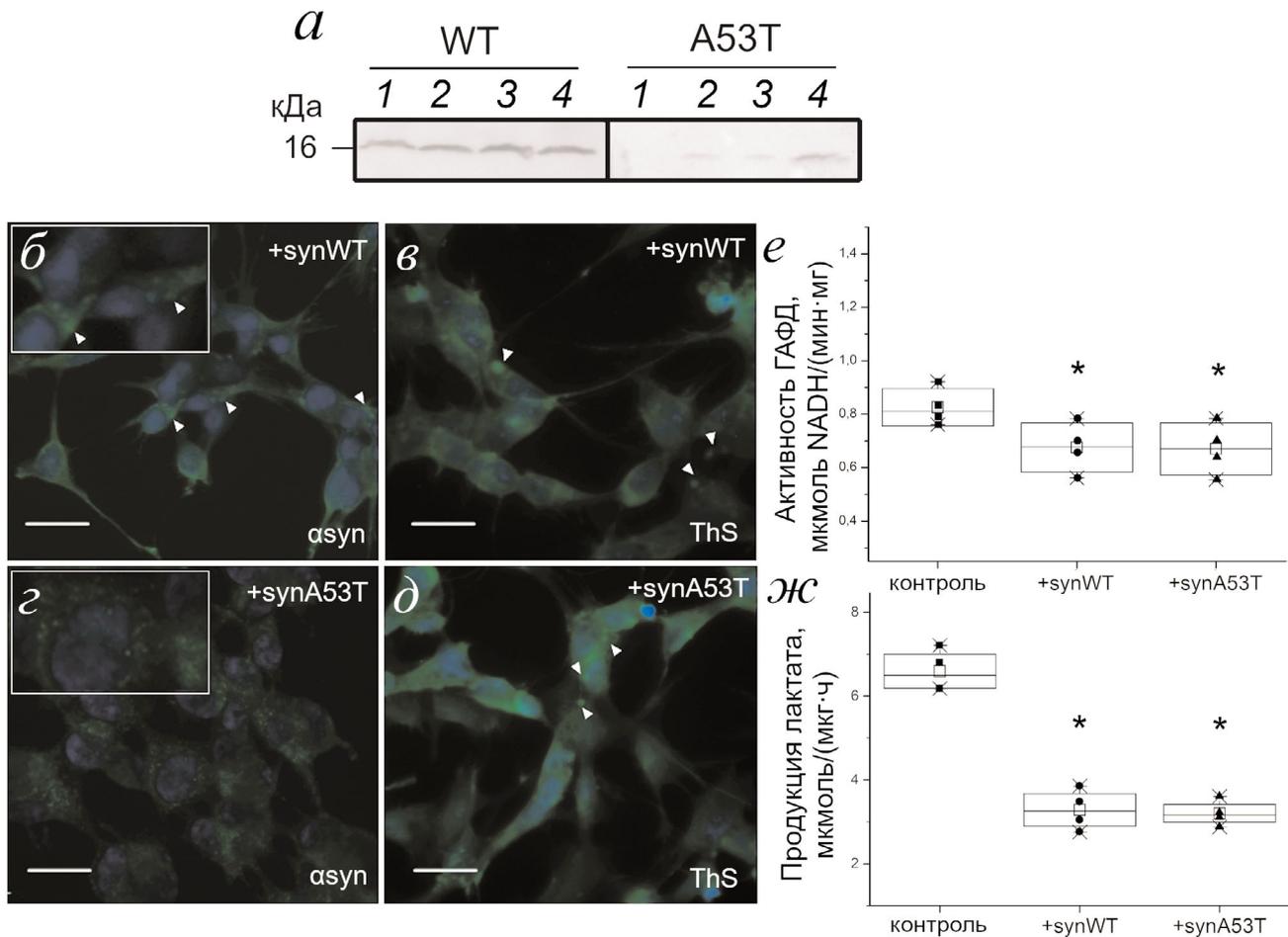


**Рис. 1.** Образование амилоидных агрегатов и оценка гликолитических параметров в клетках нейробластомы SH-SY5Y при транзientной экспрессии  $\alpha$ -synWT или  $\alpha$ -synA53T. *a–d* – Иммуноцитохимическое окрашивание клеток SH-SY5Y, трансфицированных плазмидами pVax-  $\alpha$ -synWT (+synWT) (*a, б*) или pVax-  $\alpha$ -synA53T (+synA53T) (*в, г*), через 72 ч после трансфекции. *a* и *в* – Клетки окрашивали мышиными моноклональными антителами к  $\alpha$ -синуклеину ( $\alpha$ -syn) в разведении 1 : 50 (клон syn204), затем вторичными анти-мышиными антителами козы, конъюгированными с FITC (зеленый цвет), в разведении 1 : 500. *б* и *г* – После фиксации и пермеабелизации клетки окрашивали 0,05%-ным раствором ThS в этиловом спирте. Белые стрелки указывают на ThS-позитивные агрегаты. Полученные препараты исследовали с помощью флуоресцентного микроскопа при 20 $\times$  увеличении. Отрезок шкалы равен 20 мкм. Во всех препаратах ядра были окрашены DAPI (синий цвет). *д* и *е* – Для определения активности ГАФД (*д*) и скорости накопления лактата (*е*) клетки лизировали через 48 ч после трансфекции pVax-  $\alpha$ -synWT (+synWT) или pVax-  $\alpha$ -synA53T (+synA53T), в качестве контроля были использованы клетки, трансфицированные пустым вектором pVax1 (контроль). Данные представлены в виде диаграммы размаха с указанием точками конкретных экспериментальных значений, для определения активности ГАФД  $n = 7$  (*д*) и для определения продукции лактата  $n = 5$  (*е*). \*  $p < 0,05$  (однофакторный дисперсионный анализ с апостериорными множественными сравнениями с помощью критерия наименьших значимых различий). (С цветным вариантом рис. 1, 2, 4 и 5 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>)

рикеточных амилоидных агрегатов в обоих случаях было подтверждено окрашиванием ThS (рис. 2, *в* и *д*). Несмотря на повышенную продукцию  $\alpha$ -синуклеина во всех клетках стабильной линии, амилоидные агрегаты наблюдали только в отдельных клетках. При этом содержание агрегатов было приблизительно вдвое выше в клетках, содержащих мутантную форму белка, согласно ручному подсчету количества агрегатов на количество клеток при микроскопическом исследовании. Для дальнейшего исследования содержания различных форм  $\alpha$ -синуклеина в лизатах мы проанализировали лизаты, использованные для измерения активности ГАФД, и скорости накопления лактата методом иммуноблоттинга после электрофореза в денатурирующих условиях и обнаружили только соответ-

ствующие мономерному  $\alpha$ -синуклеину полосы. Полос, соответствующих высокомолекулярным олигомерным формам, обнаружено не было, в том числе в нерастворимых фракциях (данные не приведены), однако их образование было показано аналогичным методом в других работах [26, 27].

При измерении активности ГАФД (рис. 2, *е*) и скорости накопления лактата (рис. 2, *ж*) в качестве контрольных использовали лизаты не подвергавшихся модификации клеток. Активность ГАФД была снижена на 20% как в клетках, продуцирующих  $\alpha$ -synWT, так и в клетках, продуцирующих  $\alpha$ -synA53T. Скорость генерации лактата в трансгенных клетках была также заметно снижена (на 50–60%) относительно контроля.



**Рис. 2.** Образование амилоидных агрегатов и оценка гликолитических параметров в клетках нейробластомы SH-SY5Y при стабильной экспрессии  $\alpha$ -synWT или  $\alpha$ -synA53T. *a* – Оценка уровня продукции  $\alpha$ -synWT и  $\alpha$ -synA53T в отобранных моноклонах SH-SY5Y методом иммуноблоттинга. 1–4 – Номера моноклонов. *б–д* – Иммуноцитохимическое окрашивание клеток SH-SY5Y, стабильно продуцирующих  $\alpha$ -synWT (+synWT) (*б, в*) или  $\alpha$ -synA53T (+synA53T) (*з, д*). *б, з* – Клетки окрашивали мышиными моноклональными антителами к  $\alpha$ -синуклеину ( $\alpha$ -syn) в разведении 1 : 50 (клон syn204), затем вторичными анти-мышиными антителами козы, конъюгированными с FITC (зеленый цвет), в разведении 1 : 500. В белом прямоугольнике в левом верхнем углу приведено цифровое увеличение фрагмента изображения. *в, д* – После фиксации и пермеабилзации клетки окрашивали 0,05%-ным раствором ThS в этиловом спирте. Белые стрелки указывают на ThS-позитивные агрегаты. Полученные препараты исследовали с помощью флуоресцентного микроскопа при 20 $\times$  увеличении. Отрезок шкалы равен 20 мкм. Во всех препаратах ядра были окрашены DAPI (синий цвет). *е, ж* – Для анализа активности ГАФД (*е*) и скорости накопления лактата (*ж*) клетки SH-SY5Y, стабильно продуцирующие  $\alpha$ -synWT (+synWT) или  $\alpha$ -synA53T (+synA53T), лизировали через 48 ч после пересаживания, в качестве контроля были использованы немодифицированные клетки (контроль). Данные представлены в виде диаграммы размаха с указанием точками конкретных экспериментальных значений, для определения активности ГАФД  $n = 5$  (*д*) и для определения продукции лактата  $n = 4$ . Статистически значимое отличие от контроля с  $*p < 0,05$  (однофакторный дисперсионный анализ с апостериорными множественными сравнениями с помощью критерия наименьших значимых различий)

Для дополнительного подтверждения изменения метаболизма в клетках нейробластомы SH-SY5Y, стабильно продуцирующей  $\alpha$ -synWT или  $\alpha$ -synA53T, мы провели измерение скорости поглощения глюкозы и продукции лактата непосредственно в культуральной среде и обнаружили снижение обоих параметров в клетках с повышенной продукцией  $\alpha$ -синуклеина (рис. 3).

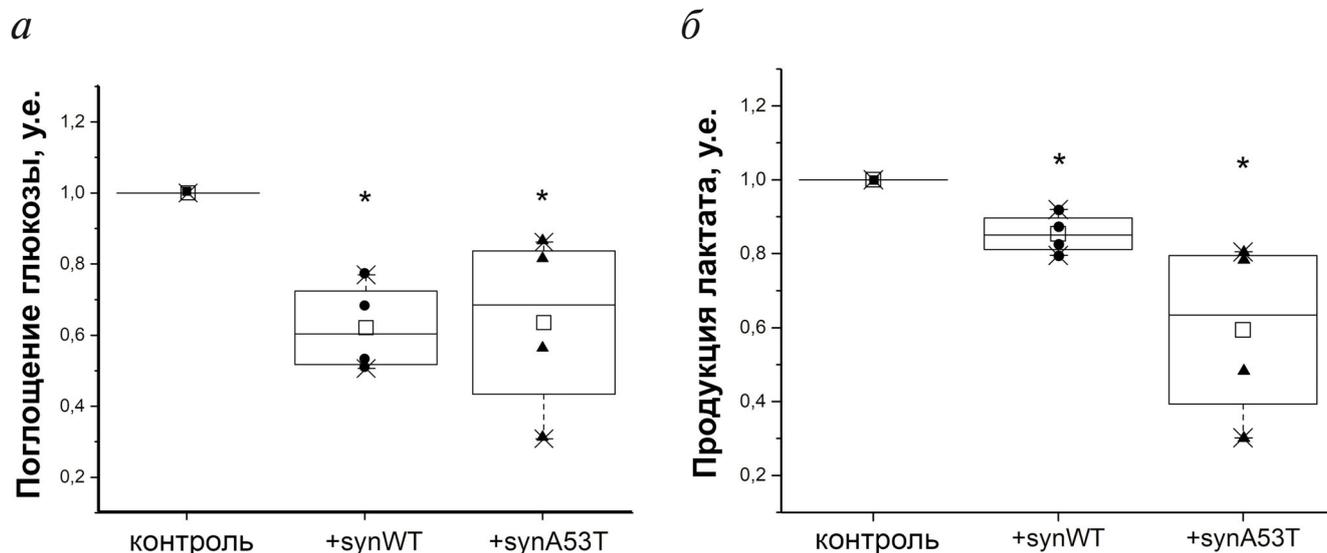
Полученные данные подтверждают изменения в энергетическом метаболизме клеток, ста-

бильно экспрессирующих  $\alpha$ -синуклеин, – гликолиз, а следовательно, и снабжение клетки энергией в данных случаях нарушено. Более того, снижение уровня поглощения глюкозы относительно контроля более выражено, чем продукция лактата. Затрудненная утилизация глюкозы может помимо нарушения гликолиза свидетельствовать о нарушениях в захвате глюкозы клетками или дисфункции пентозофосфатного пути, особо важного для жизнедеятельности нервных клеток [6, 7].

Полученные результаты показывают, что существует корреляция между уменьшением интенсивности гликолиза и присутствием в исследованных клетках различных форм  $\alpha$ -синуклеина, прежде всего, мономеров  $\alpha$ -синуклеина и агрегатов, выявляемых при цитохимическом окрашивании (рис. 2, в, д). Мы предположили, что основной причиной уменьшения активности ГАФД, а следовательно, и эффективности гликолиза в целом, может быть ее инактивация из-за взаимодействия с разными формами  $\alpha$ -синуклеина. Ранее нами была показана инактивация человеческой ГАФД в системе *in vitro* в присутствии мономерного  $\alpha$ -синуклеина дикого типа; необходимым условием было частичное окисление сульфгидрильной группы в активном центре чГАФД [18]. В клеточных лизатах всех использованных клеточных линий ГАФД находится в частично окисленной форме, так как ее активность увеличивается на 30–40% после инкубации с ДТТ. Вероятно, взаимодействие  $\alpha$ -синуклеина именно с такими формами ГАФД приводит к дополнительному снижению активности фермента и к изменению интенсивности гликолиза. Чтобы дополнительно исследовать влияние различных форм  $\alpha$ -синуклеина на активность ГАФД, нами были получены рекомбинантные  $\alpha$ -synWT и  $\alpha$ -synA53T, а также их олигомеры и фибриллы. Полученные олигомеры  $\alpha$ -синуклеина были охарактеризованы с помощью изменения флуоресценции ThT,

спектроскопии КД, иммуноблоттинга с антителами, специфичными к  $\alpha$ -синуклеину, и нативного электрофореза (рис. 4, а–г). Формирование фибрилл подтверждали изменением флуоресценции ThT (данные не приведены). Затем мы протестировали взаимодействие чГАФД с различными формами  $\alpha$ -synWT и  $\alpha$ -synA53T (рис. 4, д).

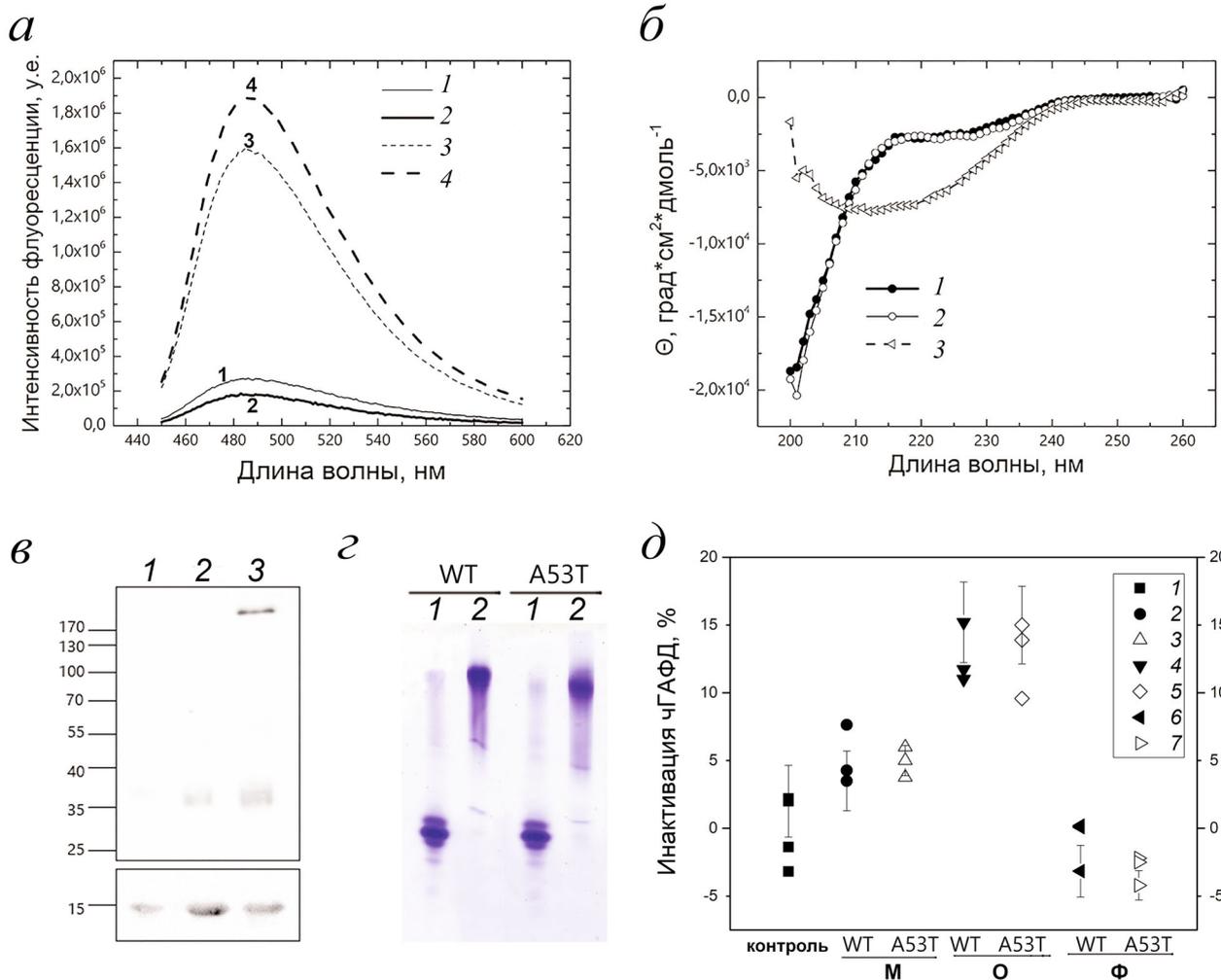
Полученные нами олигомеры  $\alpha$ -синуклеина имели в своем составе бета-структуру, что было подтверждено повышением интенсивности флуоресценции ThT в их присутствии по сравнению с мономерными формами белка (рис. 4, а, кривые 1 и 2 по сравнению с кривыми 3 и 4), а также снижением молярной эллиптичности кривой олигомера (3) относительно кривой мономера  $\alpha$ -synA53T (1) при длинах волн 218–220 нм и 230 нм (рис. 4, б). При этом исходная смесь мономера и олигомера до разделения на центрифужном фильтре с пределом пропускания 100 кДа (рис. 4, б кривая 2) имеет спектр, идентичный спектру мономера белка, что указывает на маленький процент образовавшегося олигомера в исходной смеси. Схожую картину можно наблюдать (рис. 4, в) при окрашивании антителами, специфичными к  $\alpha$ -синуклеину, нитроцеллюлозной мембраны после проведения электрофоретического разделения в восстанавливающих условиях в присутствии Ds-Na. На дорожке, соответствующей смеси мономера и олигомера (рис. 4, в, дорожка 2), можно видеть



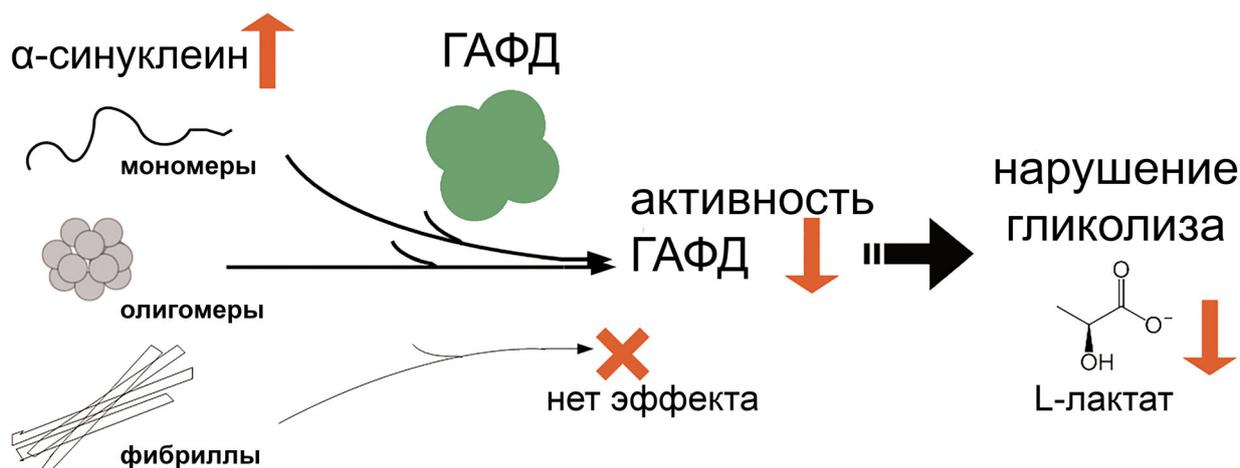
**Рис. 3.** Оценка интенсивности гликолиза в клетках нейробластомы SH-SY5Y, стабильно продуцирующих  $\alpha$ -synWT (+synWT) или  $\alpha$ -synA53T (+synA53T), по поглощению глюкозы (а) и продукции лактата (б) в культуральной среде. На следующий день после пересаживания клеток культуральную среду заменяли на свежую и измеряли изменение концентрации глюкозы и лактата в среде за 4 ч энзиматическим методом. Данные представлены в виде диаграммы размаха с указанием точками конкретных экспериментальных значений,  $n = 4$ . Статистически значимое отличие от контроля с  $*p < 0,05$  ( $U$ -критерий Манна–Уитни)

дополнительную полосу, соответствующую по молекулярной массе (~36 кДа) димеру  $\alpha$ -синуклеина. Однако полоса, соответствующая высокомолекулярным олигомерам (~190–220 кДа), появляется только на дорожке, соответствующей олигомерам, отделенным от низкомолекулярных форм с помощью фильтрования (рис. 4, в, дорожка 3). Также, согласно данным иммуноблоттинга, можно сделать вывод о том, что полученные олигомеры, по крайней мере частично, устойчивы к воздействию Ds-Na. С по-

мощью нативного фореза мономеров и олигомеров  $\alpha$ -синуклеина (рис. 4, г, дорожки 1 и 2 соответственно) мы подтвердили, что препарат мономера содержит преимущественно мономерную форму белка, а препарат олигомера – преимущественно олигомерную форму. Оценить молекулярную массу олигомера данным методом представляется затруднительным, поскольку мономер  $\alpha$ -синуклеина имеет кажущуюся массу 60 кДа на нативном электрофорезе вместо теоретических 14,4 кДа [28].



**Рис. 4.** Получение и анализ различных форм рекомбинантных  $\alpha$ -synWT и  $\alpha$ -synA53T (М – мономеры; М + О – неразделенная смесь мономеров и олигомеров; О – олигомеры; Ф – фибриллы). *а* – Интенсивность флуоресценции ThT в присутствии мономеров  $\alpha$ -synWT и  $\alpha$ -synA53T (1 и 2) и олигомеров  $\alpha$ -synWT и  $\alpha$ -synA53T (3 и 4). 7 мкМ белка (в расчете на мономер) и 150 мкМ ThT инкубировали в течение 10 мин при 25 °С перед записью спектра возбуждения ThT. *б* – Спектроскопия КД различных форм  $\alpha$ -synA53T (1 – мономеры, 2 – неразделенная смесь мономеров и олигомеров, 3 – олигомеры) с концентрацией белка 70 мкМ в расчете на мономер в фосфатно-солевом буфере, pH 7,4. *в* – Анализ методом иммуноблоттинга антителами, специфичными к  $\alpha$ -синуклеину (клон LB509), мономера (1), неразделенной смеси мономера и олигомера (2) и полученного с помощью 100 кДа фильтра олигомера (3)  $\alpha$ -synA53T. *г* – Нативный электрофорез в щелочных условиях мономерных (1) и олигомерных (2) форм  $\alpha$ -synWT или  $\alpha$ -synA53T. На дорожку наносили 10 мкг белка. *д* – Степень инактивации 140 мкМ чГАФД в контрольном образце (1) или в присутствии молярного избытка 1 : 40 = тетрамер чГАФД : мономер  $\alpha$ -синуклеина мономеров (2, 3), олигомеров (4, 5) или фибрилл (6, 7)  $\alpha$ -synWT (2,4,6) или  $\alpha$ -synA53T (3, 5 и 7). Данные представлены как экспериментальные значения ( $n = 3$ ) с указанием стандартного отклонения от среднего



**Рис. 5.** Принципиальная схема полученных результатов. Инактивация ГАФД, происходящая вследствие взаимодействия с мономерными и олигомерными формами  $\alpha$ -синуклеина, коррелирует со снижением интенсивности гликолиза, в частности, со снижением скорости генерации L-лактата

При исследовании снижения активности чГАФД в присутствии разных форм  $\alpha$ -синуклеина (рис. 4, д) нами было обнаружено, что наиболее сильно активность чГАФД снижалась при инкубации с олигомерными формами (снижение на 12%), чуть менее выражено на активность влияли мономеры  $\alpha$ -синуклеина (снижение на 5%), а фибриллярные формы на активность чГАФД практически не влияли; самоинактивации чГАФД в тестируемом временном интервале также практически не происходило.

Поскольку мы видим выраженное падение активности ГАФД в случаях, когда при помощи иммуноцитохимии мы наблюдаем образование амилоидных агрегатов, но при этом мы не наблюдаем влияния больших фибриллярных агрегатов на активность чГАФД *in vitro*, можно предположить, что основное влияние на изменение активности ГАФД в клетках оказывают мономерные и олигомерные формы белка. Более того, мы наблюдали снижение активности ГАФД при работе с растворимой фракцией клеточных лизатов, не содержащей больших агрегатов. Несмотря на то, что мы не смогли обнаружить олигомерные формы  $\alpha$ -синуклеина методом иммуноблоттинга, их образование при повышенной экспрессии этого белка было показано в других работах [27]. Вероятно, не только мономеры  $\alpha$ -синуклеина, но и его олигомерные формы, даже присутствующие в относительно небольшом количестве, оказывают выраженное инактивирующее воздействие на ГАФД и, таким образом, вносят вклад в подавление гликолиза.

Как упоминалось ранее, нарушения в пентозофосфатном пути могут быть одними из первых патологических изменений метаболизма

при развитии болезни Паркинсона [8], что в нашей работе косвенно подтверждается снижением потребления глюкозы при стабильно повышенной экспрессии  $\alpha$ -синуклеина (рис. 3, а). Таким образом, можно предположить, что снижение восстановительного потенциала клетки вследствие нарушения регуляции пентозофосфатного пути может приводить к частичному окислению ферментов, в том числе ГАФД, что, в свою очередь, является одним из механизмов нарушения снабжения клетки энергией путем гликолиза, ведет к накоплению субстрата ГАФД — глицеральдегид-3-фосфата — и снижению продукции лактата, что было показано и на нашей клеточной модели (рис. 2, ж и 3, б).

Полученные результаты позволяют нам сделать выводы о том, что стабильная суперпродукция  $\alpha$ -синуклеина в клетках нейробластомы SH-SY5Y приводит к накоплению амилоидных агрегатов, причем продукция  $\alpha$ -synA53T приводит к накоплению большего количества агрегатов, чем  $\alpha$ -synWT. Повышенная продукция  $\alpha$ -синуклеина также вызывает изменения метаболизма, в частности, снижение скорости генерации лактата и потребления глюкозы. Обнаруженные нарушения гликолиза также коррелируют со снижением ферментативной активности ГАФД. Эксперименты, проведенные на изолированных белках в системе *in vitro*, позволяют предположить, что инактивация ГАФД происходит вследствие взаимодействия с мономерными и олигомерными формами  $\alpha$ -синуклеина (рис. 5).

**Финансирование.** Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда

фундаментальных исследований в рамках научного проекта № 18-34-00132.

**Конфликт интересов.** Авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.

**Соблюдение этических норм.** Настоящая статья не содержит описания выполненных авторами исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Schapira, A., Cooper, J., Dexter, D., Clark, J., Jenner, P., and Marsden, C. (1990) Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease, *J. Neurochem.*, **54**, 823-827, doi: 10.1111/j.1471-4159.1990.tb02325.x.
- Nakamura, K. (2013)  $\alpha$ -Synuclein and mitochondria: partners in crime? *Neurotherapeutics*, **10**, 391-9, doi: 10.1007/s13311-013-0182-9.
- Henchcliffe, C., Shungu, D., Mao, X., Huang, C., Nirenberg, M., Jenkins, B., and Beal, M. (2008) Multinuclear magnetic resonance spectroscopy for *in vivo* assessment of mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1147**, 206-220, doi: 10.1196/annals.1427.037.
- Jiang, P., Gan, M., Ebrahim, A., Castanedes-casey, M., Dickson, D., and Yen, S. (2013) Adenosine monophosphate-activated protein kinase overactivation leads to accumulation of  $\alpha$ -synuclein oligomers and decrease of neurites, *Neurobiol. Aging*, **34**, 1504-1515, doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2012.11.001.
- Anandhan, A., Lei, S., Levysky, R., Pappa, A., Panayiotidis, M., Cerny, R., Khalimonchuk, O., Powers, R., and Franco, R. (2017) Glucose metabolism and AMPK signaling regulate dopaminergic cell death induced by gene ( $\alpha$ -synuclein)-environment (paraquat) interactions, *Mol. Neurobiol.*, **54**, 3825-3842, doi: 10.1007/s12035-016-9906-2.
- Anandhan, A., Jacome, M., Lei, S., Hernandez-Franco, P., Pappa, A., Panayiotidis, M., Powers, R., and Franco, R. (2017) Metabolic dysfunction in Parkinson's disease: bioenergetics, redox homeostasis and central carbon metabolism, *Brain Res. Bull.*, **133**, 12-30, doi: 10.1016/j.brainresbull.2017.03.009.
- Herrero-Mendez, A., Almeida, A., Fernández, E., Maestre, C., Moncada, S., and Bolaños, J. (2009) The bioenergetic and antioxidant status of neurons is controlled by continuous degradation of a key glycolytic enzyme by APC/C-Cdh1, *Nat. Cell Biol.*, **11**, 747-52, doi: 10.1038/ncb1881.
- Dunn, L., Allen, G., Mamais, A., Ling, H., Li, A., Duberley, K., Hargreaves, I., Pope, S., Holton, J., Lees, A., Heales, S., and Bandopadhyay, R. (2014) Dysregulation of glucose metabolism is an early event in sporadic Parkinson's disease, *Neurobiol. Aging*, **35**, 1111-1115, doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2013.11.001.
- Polymeropoulos, M., Lavedan, C., Leroy, E., Ide, S., Dehejia, A., Dutra, A., Pike, B., Root, H., Rubenstein, J., Boyer, R., Stenroos, E., Chandrasekharappa, S., Athanassiadou, A., Papapetropoulos, T., Johnson, W., Lazzarini, A., Duvoisin, R., Iorio, G., Golbe, L., and Nussbaum, R. (1997) Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease, *Science*, **276**, 2045-2047, doi: 10.1126/science.276.5321.2045.
- Krüger, R., Kuhn, W., Müller, T., Woitalla, D., Graeber, M., Kösel, S., Przuntek, H., Epplen, J., Schöls, L., and Riess, O. (1998) Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease, *Nat. Genet.*, **18**, 106-108, doi: 10.1038/ng0298-106.
- Zarranz, J., Alegre, J., Gómez-Esteban, J., Lezcano, E., Ros, R., Ampuero, I., Vidal, L., Hoenicka, J., Rodriguez, O., Atarés, B., Llorens, V., Tortosa, E., Ser, T., Muñoz, D., and Yebenes, J. (2004) The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia, *Ann. Neurol.*, **55**, 164-173, doi: 10.1002/ana.10795.
- Chartier-Harlin, M.-C., Kachergus, J., Roumier, C., Mouroux, V., Douay, X., Lincoln, S., Levecque, C., Larvor, L., Andrieux, J., Hulihan, M., Waucquier, N., Defebvre, L., Amouyel, P., Farrer, M., and Destée A. (2004) Alpha-synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson's disease, *Lancet (London, England)*, **364**, 1167-1169, doi: 10.1016/S0140-6736(04)17103-1.
- Singleton, A. B., Farrer, M., Johnson, J., Singleton, A., Hague, S., Kachergus, J., Hulihan, M., Peuralinna, T., Dutra, A., Nussbaum, R., Lincoln, S., Crawley, A., Hanson, M., Maraganore, D., Adler, C., Cookson, M., Muentner, M., Baptista, M., Miller, D., Blacato, J., Hardy, J., and Gwinn-Hardy, K. (2003) Alpha-synuclein locus triplication causes Parkinson's disease, *Science*, **302**, 841, doi: 10.1126/science.1090278.
- Shalova, I., Cechalova, K., Rehakova, Z., Dimitrova, P., Ognibene, E., Caprioli, A., Schmalhausen, E., Muronetz, V., and Saso, L. (2007) Decrease of dehydrogenase activity of cerebral glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in different animal models of Alzheimer's disease, *Biochim. Biophys. Acta*, **1770**, 826-832, doi: 10.1016/j.bbagen.2007.01.014.
- Mazzola, J., and Sirover, M. (2001) Reduction of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase activity in Alzheimer's disease and in Huntington's disease fibroblasts, *J. Neurochem.*, **76**, 442-449, doi: 10.1046/j.1471-4159.2001.00033.x.
- Tatton, N. (2000) Increased caspase 3 and Bax immunoreactivity accompany nuclear GAPDH translocation and neuronal apoptosis in Parkinson's disease, *Exp. Neurol.*, **166**, 29-43, doi: 10.1006/exnr.2000.7489.
- Tsuchiya, K., Tajima, H., Kuwae, T., Takeshima, T., Nakano, T., Tanaka, M., Sunaga, K., Fukuhara, Y., Nakashima, K., Ohama, E., Mochizuki, H., Mizuno, Y., Katsube, N., and Ishitani, R. (2005) Pro-apoptotic protein glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase promotes the formation of Lewy body-like inclusions, *Eur. J. Neurosci.*, **21**, 317-326, doi: 10.1111/j.1460-9568.2005.03870.x.
- Barinova, K., Khomyakova, E., Semenyuk, P., Schmalhausen, E., and Muronetz, V. (2018) Binding of alpha-synuclein to partially oxidized glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase induces subsequent inactivation of the enzyme, *Arch. Biochem. Biophys.*, **642**, 10-22, doi: 10.1016/j.abb.2018.02.002.
- Barinova, K., Kuravsky, M., Arutyunyan, A., Serebryakova, M., Schmalhausen, E., and Muronetz, V. (2017) Dimerization of Tyr136Cys alpha-synuclein prevents amyloid transformation of wild-type alpha-synuclein, *Int. J. Biol. Macromol.*, **96**, 35-43, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2016.12.011.
- Bradford, M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254, doi: 10.1006/abio.1976.9999.
- Danshina, P., Schmalhausen, E., Avetisyan, A., and Muronetz, V. (2001) Mildly oxidized glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as a possible regulator of glycol-

- ysis, *IUBMB Life*, **51**, 309-314, doi: 10.1080/152165401317190824.
22. Barinova, K., Eldarov, M., Khomyakova, E., Muronetz, V., and Schmalhausen, E. (2017) Isolation of recombinant human untagged glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *E. coli* producer strain, *Protein Expr. Purif.*, **137**, 1-6, doi: 10.1016/j.pep.2017.06.009.
  23. Lee, B., and Kamitani, T. (2019) Improved immunodetection of endogenous  $\alpha$ -synuclein, *PLoS One*, **6**, e23939, doi: 10.1371/journal.pone.0023939.
  24. Medvedeva, M., Barinova, K., Melnikova, A., Semenyuk, P., Kolmogorov, V., Gorelkin, P., Erofeev, A., and Muronetz, V. (2020) Naturally occurring cinnamic acid derivatives prevent amyloid transformation of alpha-synuclein, *Biochimie*, **170**, 128-139, doi: 10.1016/j.biochi.2020.01.004.
  25. Liu, Z., Yu, Y., Li, X., Ross, C., and Smith, W. (2011) Curcumin protects against A53T alpha-synuclein-induced toxicity in a PC12 inducible cell model for Parkinsonism, *Pharmacol. Res.*, **63**, 439-444, doi: 10.1016/j.phrs.2011.01.004.
  26. Mishizen, A. J., Lynch, D. R., Nakashima, A., Nagatsu, T., Giasson, B. I., Ota, A., Thomas, S. A., Mazzulli, J. R., and Ischiropoulos, H. (2006) Cytosolic catechols inhibit  $\alpha$ -synuclein aggregation and facilitate the formation of intracellular soluble oligomeric intermediates, *J. Neurosci.*, **26**, 10068-78, doi: 10.1523/jneurosci.0896-06.2006.
  27. Marmolino, D., Foerch, P., Atienzar, F., Staelens, L., Michel, A., and Scheller, D. (2016) Alpha-synuclein dimers and oligomers are increased in overexpressing conditions *in vitro* and *in vivo*, *Mol. Cell. Neurosci.*, **71**, 92-101, doi: 10.1016/J.MCN.2015.12.012.
  28. Burré, J., Vivona, S., Diao, J., Sharma, M., Brunger, A., and Südhof, T. (2013) Properties of native brain  $\alpha$ -synuclein, *Nature*, **498**, 1-6, doi: 10.1038/nature12125.

## ALPHA-SYNUCLEIN OVEREXPRESSION IN SH-SY5Y HUMAN NEUROBLASTOMA CELLS LEADS TO ACCUMULATION OF THIOFLAVIN S-POSITIVE AGGREGATES AND IMPAIRMENT OF GLYCOLYSIS

A. K. Melnikova<sup>1\*</sup>, D. V. Pozdyshev<sup>2</sup>, K. V. Barinova<sup>2</sup>,  
S. S. Kudryavtseva<sup>1</sup>, and V. I. Muronetz<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Lomonosov Moscow State University, Faculty of Bioengineering and Bioinformatics,  
119234, Moscow, Russia; E-mail: alksmelnikova@gmail.com

<sup>2</sup> Lomonosov Moscow State University, Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, 119234, Moscow, Russia

Received February 17, 2020

Revised March 13, 2020

Accepted March 25, 2020

Deterioration of energy metabolism in affected cells is an important feature of synucleinopathies, including Parkinson's disease. Here, we studied the association between  $\alpha$ -synuclein accumulation and glycolysis using SH-SY5Y neuroblastoma cell lines stably expressing wild-type  $\alpha$ -synuclein or its A53T mutant linked to the autosomal dominant form of the disease. Overexpression of both proteins led to the accumulation of thioflavin S-positive aggregates, more pronounced for  $\alpha$ -synuclein A53T. It also caused changes in the cell energy metabolism manifested as a decrease in the lactate accumulation and glucose uptake. Impairments in glycolysis were also accompanied by a decrease in the activity of the glycolytic enzyme glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH). *In vitro* experiments with purified proteins indicated that GAPDH inactivation might be caused by its binding to the monomeric and oligomeric forms of  $\alpha$ -synuclein. Therefore, a decrease in the GAPDH activity induced by its interaction with  $\alpha$ -synuclein, might be one of the causes of glucose metabolism deterioration in synucleinopathies.

**Keywords:**  $\alpha$ -synuclein, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, glycolysis, Parkinson's disease