

УДК 57.083.16+576.526

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БАКТЕРИАЛЬНОЙ СИСТЕМЫ C-DAG ДЛЯ АНАЛИЗА СПОСОБНОСТИ АМИЛОИДОВ ИНДУЦИРОВАТЬ АГРЕГАЦИЮ БЕЛКА *IN VITRO*

© 2024 г. Н. П. Трубицина^a, О. М. Землянко^{a, b}, Г. А. Журавлева^{a, b}, С. А. Бондарев^{a, b, *}

^aСанкт-Петербургский государственный университет, кафедра генетики и биотехнологии,
199034, Санкт-Петербург, Россия

^bСанкт-Петербургский государственный университет, Научная лаборатория биологии амилоидов,
199034, Санкт-Петербург, Россия

*e-mail: s.bondarev@spbu.ru; stanislavspbg@gmail.com

Поступила в редакцию 15.10.2023 г.

После доработки 15.12.2023 г.

Принята к публикации 21.12.2023 г.

Поиск новых амилоидных белков, а также изучение их свойств является актуальной задачей, решать которую позволяет ряд различных модельных систем. Одной из наиболее популярных является методика C-DAG. Она основана на анализе агрегации исследуемых белков на поверхности клеток *Escherichia coli*. Согласно оригинальному протоколу, с ее помощью можно продемонстрировать одно из характерных свойств амилоидов: способность связывать амилоид-специфический краситель Конго красный и демонстрировать при этом двойное зеленое лучепреломление. Кроме этого, методика C-DAG позволяет анализировать морфологию агрегатов и их устойчивость к детергентам. В работе мы проверили на примере Sup35NM, могут ли агрегаты, представленные на поверхности клеток бактерий, выступать в качестве индукторов агрегации соответствующего белка.

Ключевые слова: амилоиды, C-DAG, *E. coli*, кинетика агрегации, Sup35

DOI: 10.31857/S0026365624050156

Амилоиды представляют собой белковые агрегаты с кросс-β структурой, и на сегодняшний день известно более сотни белков с амилоидными или амилоидоподобными свойствами (Матив и соавт., 2020). Идентификация новых амилоидов является трудоемкой задачей, для решения которой был предложен ряд подходов. Удобным инструментом для массового скрининга амилоидов *in vitro* стала тест-система C-DAG (Curlli-dependent amyloid generator) (Sivanathan, Hochschild, 2013). Она основана на способности бактерий образовывать на своей поверхности структуры из амилоидогенных белков. У *Escherichia coli* они носят название “curlli”, а их основным компонентом является белок CsgA. За транспорт этого белка на поверхность клетки отвечает специфическая сигнальная последовательность (CsgAss). Слияние других белков с CsgAss позволяет также направлять их на экспорт из клетки, и если такой белок обладает амилоидными свойствами, то на поверхности бактериальных клеток будут формироваться амилоидные фибриллы. Впервые это было продемонстрировано на примере амилоидогенного фрагмента Sup35NM

(Sivanathan, Hochschild, 2012). Методика C-DAG позволяет в короткие сроки проверять взаимодействие белковых агрегатов с амилоид-специфическим красителем Конго красный. Колонии бактерий с амилоидами, культивируемые на этой среде, становятся красными. Последующий анализ клеток с помощью поляризационной микроскопии позволяет протестировать наличие двойного зеленого лучепреломления образцов. Две эти проверки свидетельствуют о наличии свойств, характерных для амилоидов, а также позволяют выдвинуть предположение о кросс-β структуре агрегатов исследуемого белка. Фибриллярную морфологию агрегатов на поверхности клеток можно продемонстрировать с помощью просвечивающей электронной микроскопии. Наконец, биохимические методы позволяют также протестировать устойчивость исследуемых белковых агрегатов к детергентам (Sivanathan, Hochschild, 2013). Методика C-DAG была успешно использована для проверки амилоидных свойств различных белков: Gas1 и Ygp1 (Ryzhova et al., 2018), RopA и RopB (Kosolapova et al., 2019), Esp (Taglialegna et al., 2020), RAD51 (Kachkin et al.,

2022), FXR1 (Sopova et al., 2019), YghJ (Belousov et al., 2018) и других. Однако методика C-DAG позволяет проанализировать далеко не все свойства амилоидов. В частности, она не дает информации о способности агрегатов индуцировать агрегацию такого же белка, хотя это также является характерным свойством амилоидов (Chiti, Dobson, 2017; Матиив и соавт., 2020; Willbold et al., 2021). Мы решили заполнить этот пробел и протестировали это на примере Sup35NM.

Рекомбинантный белок Sup35NM выделяли из клеток *E. coli* BL21(DE3), несущих вектор pET20b-SUP35NM (Allen et al., 2005), согласно ранее опубликованной методике (Serio, Lindquist, 1999). Полученный белок осаждали метанолом и хранили при -80°C . Перед экспериментами осадок белка растворяли в 6 М ГГХ в течение ночи при 4°C . Для получения агрегатов Sup35NM измеряли концентрацию белка и разводили его минимум в 100 раз в буфере для сборки фибрилл (буфер F, 5 мМ калий фосфатный буфер pH 7.5, 150 мМ NaCl) до конечной концентрации 0.5 мг/мл. Полученный раствор инкубировали при 25°C на ротаторе с переворачиванием (60 об./мин) в течение 12–24 ч. Для анализа кинетики агрегации Sup35NM белок разводили в буфере F (минимум в 50 раз) до концентрации не менее 0.5 мг/мл и центрифугировали при скорости 21130 g и температуре 4°C в течение 30 мин. Этот этап был необходим для удаления не растворившихся агрегатов белка.

Для получения клеток *E. coli* в системе C-DAG использовали штамм VS39, который трансформировали плазмидой pVS72, несущей ген *SUP35NM* (Sivanathan, Hochschild, 2013). Подготовку клеток проводили согласно опубликованному протоколу. Для контроля исходный штамм VS39 высевали на среду LB с хлорамфениколом. Чашки с культурами инкубировали при 37°C в течение 48 ч. Клетки собирали с твердой среды и ресуспендировали в 100 мкл буфера F. Суспензию термически инактивировали при 75°C в течение 20 мин. Концентрации клеток в пробах выравнивали на основании оптической плотности суспензий.

Для анализа кинетики агрегации белка использовали следующие компоненты в различных сочетаниях (указаны конечные концентрации в реакционной смеси): мономерный Sup35NM (0.1 мг/мл), фибриллы Sup35NM (0.002 мг/мл), бактериальные клетки ($\text{OD}_{600} = 0.01$), краситель тиофлавин Т (2.5 мМ). Конечный объем одной пробы составлял 150 мкл, реакция проходила в буфере F. Изменение флуоресценции тиофлавина Т (широко используемый амилоид-специфический краситель) в пробах проводили в планшетах с темными стенками (Corning 3603) на приборе Clariostar Plus (“BMG Labtech”) через каждые 240 с. Флуоресценцию считывали при длине волны 483 ± 10 нм (возбуждение при 448 ± 10 нм).

Результаты нормировали, принимая за ноль минимальное значение, а за единицу – медиану флуоресценции на стадии “плато”. Затем для каждой реакции мы подбирали параметры следующей модели (Vaneysck et al., 2021):

$$y = A_2 + \frac{A_1 - A_2}{1 + e^{-\frac{(x-x_0)}{dx}}},$$

где A_1 и A_2 – начальный и финальный уровень флуоресценции, x_0 – время полуреакции, dx – величина, обратная скорости агрегации. С учетом подобранных параметров мы также рассчитывали время lag-фазы реакции: $\text{lag} = x_0 - 2dx$.

Нам удалось проследить процесс агрегации Sup35NM в присутствии бактериальных клеток. В этом эксперименте в качестве положительного контроля мы использовали фибриллы Sup35NM, полученные *in vitro*. Ранее в ряде работ было показано, что агрегаты Sup35NM ускоряют агрегацию этого белка (Glover et al., 1997; Chen et al., 2007; Sant’Anna et al., 2016). Мы продемонстрировали, что амилоидные фибриллы Sup35NM, а также бактериальные клетки штамма VS39 с агрегатами этого белка на поверхности клеток, сокращают время начала агрегации (lag-фазы) Sup35NM *in vitro* (рисунок).

При этом клетки VS39, не продуцирующие гетерологичных белков, не имеют подобного эффекта.

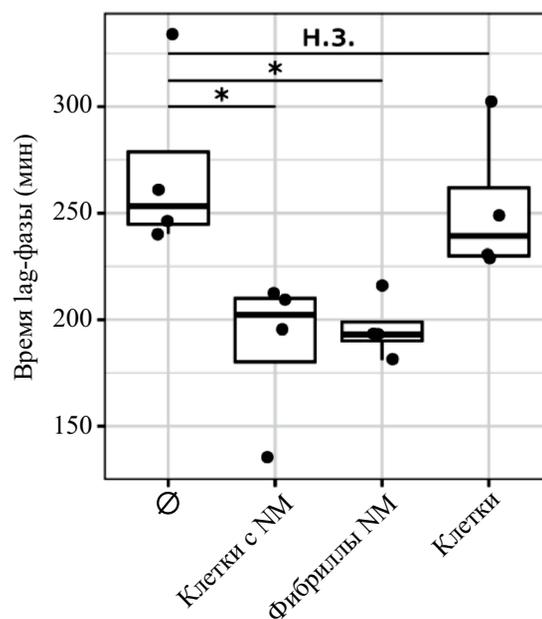


Рисунок. Бактериальные клетки с фибриллами Sup35NM ускоряют агрегацию белка Sup35NM *in vitro*. □ – спонтанная агрегация Sup35NM. “Н.з.” – отсутствие значимых отличий; * – p-value < 0.05 (критерий Вилкоксона).

Таким образом, мы показали, что амилоидные агрегаты на поверхности бактериальных клеток могут индуцировать агрегацию белка *in vitro*.

БЛАГОДАРНОСТИ

Статья посвящается 300-летию СПбГУ. Работа выполнена с использованием ресурсного центра “Развитие молекулярных и клеточных технологий” СПбГУ. Авторы также благодарят Л.Г. Данилова за техническую помощь в экспериментах.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФ № 22-74-10042.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Матиив А.Б., Трубицина Н.П., Матвеевко А.Г., Барбитов Ю.А., Журавлева Г.А., Бондарев С.А.* Амилоидные и амилоидоподобные агрегаты: многообразие и кризис термина // *Биохимия*. 2020. Т. 85. № 9. С. 1213–1239.
- Matiiv A. B., Trubitsina N. P., Matveenko A. G., Barbitoff Y. A., Zhouravleva G. A., Bondarev S. A.* Amyloid and amyloid-like aggregates: diversity and the term crisis // *Biochemistry (Moscow)*. 2020. V. 85. P. 1011–1034.
- Allen K. D., Wegrzyn R. D., Chernova T. A., Müller S., Newnam G. P., Winslett P. A., Wittich K. B., Wilkinson K. D., Chernoff Y. O.* Hsp70 chaperones as modulators of prion life cycle: novel effects of Ssa and Ssb on the *Saccharomyces cerevisiae* prion [PSI⁺] // *Genetics*. 2005. V. 169. P. 1227–1242.
- Belousov M. V., Bondarev S. A., Kosolapova A. O., Antonets K. S., Sulatskaya A. I., Sulatsky M. I., Zhouravleva G. A., Kuznetsova I. M., Turoverov K. K., Nizhnikov A. A.* M60-like metalloprotease domain of the *Escherichia coli* YghJ protein forms amyloid fibrils. // *PLoS One*. 2018. V. 13. Art. e0191317.
- Chen B., Newnam G. P., Chernoff Y. O.* Prion species barrier between the closely related yeast proteins is detected despite coaggregation // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2007. V. 104. P. 2791–2796.
- Chiti F., Dobson C. M.* Protein misfolding, amyloid formation, and human disease: a summary of progress over the last decade // *Annu. Rev. Biochem.* 2017. V. 86. P. 27–68.
- Glover J. R., Kowal A. S., Schirmer E. C., Patino M. M., Liu J. J., Lindquist S.* Self-seeded fibers formed by Sup35, the protein determinant of [PSI⁺], a heritable prion-like factor of *S. cerevisiae* // *Cell*. 1997. V. 89. P. 811–819.
- Kachkin D. V., Volkov K. V., Sopova J. V., Bobylev A. G., Fedotov S. A., Inge-Vechtomov S. G., Galzitskaya O. V., Chernoff Y. O., Rubel A. A., Aksenova A. Y.* Human RAD51 protein forms amyloid-like aggregates *in vitro* // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. V. 23. Art. 11657.
- Kosolapova A. O., Belousov M. V., Sulatskaya A. I., Belousova M. V., Sulatsky M. I., Antonets K. S., Volkov K. V., Lykholay A. N., Shtark O. Y., Vasileva E. N., Zhukov V. A., Ivanova A. N., Zykin P. A., Kuznetsova I. M., Turoverov K. K., Tikhonovich I. A., Nizhnikov A. A.* Two novel amyloid proteins, RopA and RopB, from the root nodule bacterium *Rhizobium leguminosarum* // *Biomolecules*. 2019. V. 9. Art. 694.
- Ryzhova T. A., Sopova J. V., Zadorsky S. P., Siniukova V. A., Sergeeva A. V., Galkina S. A., Nizhnikov A. A., Shenfeld A. A., Volkov K. V., Galkin A. P.* Screening for amyloid proteins in the yeast proteome // *Curr. Genet*. 2018. V. 64. P. 469–478.
- Sant’Anna R., Fernández M. R., Batlle C., Navarro S., de Groot N. S., Serpell L., Ventura S.* Characterization of amyloid cores in prion domains // *Sci. Rep.* 2016. V. 6. Art. 34274.
- Serio T. R., Lindquist S. L.* [PSI⁺]: an epigenetic modulator of translation termination efficiency // *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 1999. V. 15. P. 661–703.
- Sivanathan V., Hochschild A.* Generating extracellular amyloid aggregates using *E. coli* cells // *Genes Dev.* 2012. V. 26. P. 2659–2667.
- Sivanathan V., Hochschild A.* A bacterial export system for generating extracellular amyloid aggregates // *Nat. Protoc.* 2013. V. 8. P. 1381–1390.
- Sopova J. V., Koshel E. I., Belashova T. A., Zadorsky S. P., Sergeeva A. V., Siniukova V. A., Shenfeld A. A., Velizhanina M. E., Volkov K. V., Nizhnikov A. A., Kachkin D. V., Gaginskaya E. R., Galkin A. P.* RNA-binding protein FXR1 is presented in rat brain in amyloid form // *Sci. Rep.* 2019. V. 9. Art. 18983.
- Taglialegna A., Matilla-Cuenca L., Dorado-Morales P., Navarro S., Ventura S., Garnett J. A., Lasa I., Valle J.* The biofilm-associated surface protein Esp of *Enterococcus faecalis* forms amyloid-like fibers // *NPJ Biofilms Microbiomes*. 2020. V. 6. P. 15. <https://doi.org/10.1038/s41522-020-0125-2>
- Vaneyck J., Segers-Nolten I., Broersen K., Claessens M. M. A. E.* Cross-seeding of alpha-synuclein aggregation by amyloid

fibrils of food proteins // J. Biol. Chem. 2021. V. 296.
Art. 100358.
Willbold D., Strodel B., Schröder G.F., Hoyer W., Heise H.
Amyloid-type protein aggregation and prion-like

properties of amyloids // Chem. Rev. 2021. V. 121.
P. 8285–8307.

SHORT COMMUNICATIONS

**Application of the Bacterial C-Dag System
to Analyze the Ability of Amyloids to Seed Protein Aggregation *In Vitro***

N. P. Trubitsina¹, O. M. Zemlyanko^{1,2}, G. A. Zhouravleva^{1,2}, S. A. Bondarev^{1,2,*}

¹*Department of Genetics and Biotechnology, Saint Petersburg State University, 199034, Saint Petersburg, Russia*

²*Laboratory of Amyloid Biology, Saint Petersburg State University, 199034, Saint Petersburg, Russia*

**e-mail: s.bondarev@spbu.ru; stanislavspbg@gmail.com*

Abstract. The search for new amyloid proteins, as well as the study of their properties, is an actual task, which can be solved by a number of different model systems. One of the most popular is the C-DAG approach. It is based on the analysis of aggregation of the investigated proteins on the surface of *Escherichia coli* cells. According to the original protocol, it can be used to demonstrate one of the characteristic properties of amyloids: the ability to bind the amyloid-specific dye Congo red and demonstrate apple-green birefringence. In addition, the C-DAG technique allows one to analyze the morphology of aggregates and their resistance to detergents. In this work, we tested using Sup35NM as an example whether aggregates on the surface of bacterial cells can act as inducers of aggregation of the corresponding protein.

Keywords: amyloids, C-DAG, *E. coli*, aggregation kinetics, Sup35