

Государственное бюджетное общеобразовательное учреждение  
Гимназия №11 Василеостровского района Санкт - Петербурга.

## **Индивидуальный проект**

**на тему**

**«Получение генетических конструкций для изучения  
механизмов возникновения болезни Паркинсона»**

**Работу выполнила:**

Карманова Дарья, ученица 9 «А» класса

**Руководитель:**

К.б.н. Рогоза Татьяна Михайловна, старший  
преподаватель кафедры генетики и биотехнологии

СПбГУ

Санкт-Петербург, 2023

# Содержание

## **1. Введение \_\_ стр.2**

1.1. Цель, гипотеза, и актуальность проекта

1.2. Практическая значимость проекта

## **2. Обзор литературы \_\_ стр.4**

2.1. Амилоиды

2.2. Болезнь Паркинсона

## **3. Работа и обсуждение результатов \_\_ стр.10**

3.1. План работы над проектом

3.2. Задачи проекта

3.3. Материалы и методы

3.4. Конструирование плазмид

3.5. Получение ПЦР-продукта фрагментов бактериальных генов интереса

3.6. Подготовка вектора и ПЦР-продуктов к лигированию

3.7. ПЦР с колоний

3.8. Анализ результатов секвенирования

## **4. Выводы по работе \_\_ стр.21**

## **5. Список литературы \_\_ стр.22**

# 1. Введение

С развитием медицинских технологий продолжительность жизни людей значительно увеличилась, в связи с чем на одно из первых мест по численности выходят старческие амилоидозы, такие как болезнь Альцгеймера и болезнь Паркинсона. В настоящее время актуальной задачей биологии и медицины является увеличение не просто продолжительности жизни, но увеличение активной жизни человека (физической и социальной), а также улучшение качества жизни пожилых людей. В связи с этим изучение механизмов развития и причин возникновения амилоидозов представляется важнейшей задачей.

## 1.1. Цель, гипотеза и актуальность проекта

**Цель:** создание генетических конструкций, содержащих нуклеотидные последовательности, кодирующие фрагменты бактериальных белков интереса.

**Гипотеза:** Болезнь Паркинсона развивается при накоплении амилоидных агрегатов белка альфа-синуклеина (телец Леви) в моторных нейронах черного тела (отдел головного мозга), что приводит к массовой гибели моторных нейронов и проявлению моторных симптомов заболевания, однако агрегаты  $\alpha$ Syn встречаются не только в ЦНС, их также обнаруживают в периферической нервной системе, в частности, в её части, иннервирующей кишечник, а также в дорсальных моторных ядрах блуждающего нерва. Согласно гипотезе предложенной Браком с соавторами (Braak *et al.*, 2003; Braak *et al.*, 2006) амилоидизация альфа-синуклеина начинается в периферической нервной системе, иннервирующей кишечник, это происходит на ранних стадиях болезни Паркинсона, еще до развития моторных симптомов. В лаборатории СПбГУ был проведен сбор данных о бактериях, ассоциированных с синуклеинопатиями у человека, используя доступные базы данных и информацию из литературы. В результате была составлена таблица, содержащая 1310 бактериальных таксонов, которые статистически значимо различались по представленности у людей с болезнью Паркинсона. Таким образом, было выбрано 40 фрагментов белков (из них в данной работе использовали 10 оставшихся). На следующем этапе необходимо получить генетические конструкции, содержащие нуклеотидные последовательности, кодирующие фрагменты белков. Выполнению части этого этапа и посвящена данная работа.

**Актуальность:** Болезнь Паркинсона является одним из наиболее распространенных социально-значимых амилоидозов. Это мультифакторное заболевание, на данный момент неизлечимое. Изучение причин возникновения, механизмов развития болезни Паркинсона может помочь в поиске подходов к лечению и профилактике этого заболевания. В настоящий момент известно, что существует множество примеров амилоидов, как патологических, вызывающих амилоидозы, так и функциональных, когда белок выполняет свои нормальные функции в амилоидной форме. При этом такие функциональные амилоиды бактерий могут служить затравкой для агрегации белков человека, что в свою очередь может приводить к болезни Паркинсона.

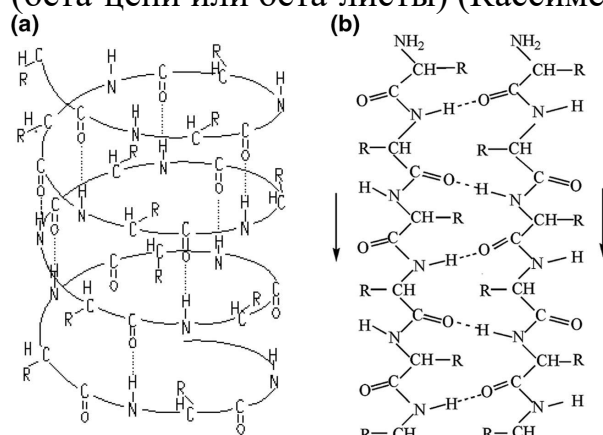
## **1.2. Практическая значимость проекта**

Амилоидозы, инфекционные и неинфекционные, среди последних - болезнь Альцгеймера и Паркинсона, неизлечимые заболевания, причиной которых является переход в амилоидную форму некоторых белков человека и животных. Изучение механизмов амилоидизации позволяет разрабатывать простые модели для изучения механизмов амилоидогенеза, поиска агентов, способных предотвращать амилоидизацию белков или элиминировать амилоидную форму белка из клеток, а также тестировать такие вещества на модельных организмах. Данный проект является частью большого исследования, посвященного изучению взаимодействия амилодогенных белков бактерий, возможно, являющихся функциональными амилоидами, и альфа-синуклеина, амилоидизация которого приводит к возникновению болезни Паркинсона.

## 2. Обзор литературы

### 2.1. Амилоиды

Белки представляют собой полимеры, мономерами которых служат аминокислоты. Помимо первичной структуры – цепочки аминокислот, соединенных друг с другом пептидными связями – белки имеют сложную пространственную структуру. Вторичная структура белка возникает за счет водородных связей, образующихся за счет взаимодействия противоположно заряженных кислорода в карбонильных группах аминокислот и водородов в аминогруппах последующих аминокислот. Основными формами вторичной структуры белков являются альфа-спирали и бета-слои (бета-цепи или бета-листы) (Кассимерис и др., 2016).



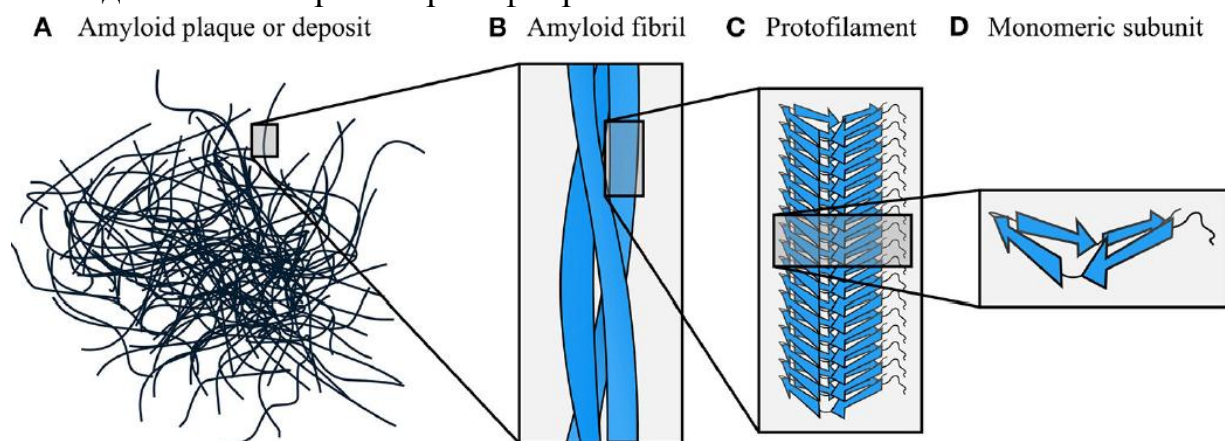
**Рисунок.1.** Вторичная структура белка. А – альфа-спираль, б – бета-слой. (Fu et al., 2015)

Амилоиды представляют собой упорядоченные белковые фибриллы, в которых бета-складчатые листы формируются за счет образования межмолекулярных водородных связей (рис.6) (Kajava *et al.*, 2010). В качестве амилоидов принято рассматривать белковые фибриллы любых организмов, имеющие кросс-бета структуру, вне зависимости от ассоциированных с ними компонентов, а также от их внутриклеточной, межклеточной или внеклеточной локализации.

Большинство выявленных амилоидов человека и животных являются патогенными и демонстрируют цитотоксические эффекты (Нижников и др., 2015). Образование патогенных амилоидных полимеров чаще всего может быть вызвано двумя причинами – аномальным повышением концентрации амилоидогенного белка, или возникновением аминокислотных замен, способствующих агрегации.

Для амилоидов выделяют несколько универсальных физико-химических свойств (Нижников и др., 2015):

- поперечная исчерченность, которая определяется поперечным расположением мономеров белка по отношению к центральной оси протофибриллы;
- связывание с амилоид-специфическими красителями, такими как Конго красный и тиофлавин Т;
- высокий уровень устойчивости к воздействию ионных детергентов, растворяющих почти все белковые комплексы и агрегаты, но не амилоидные фибриллы;
- способность к автокаталитическому росту за счёт присоединения свободных мономеров к протофибрилле.



**Рисунок.2.** Организация амилоидных фибрилл, основного компонента амилоидных бляшек или скоплений амилоидных фибрилл - А,В, формирующихся за счет тесной латеральной (боковой) ассоциации протофиламентов (С). В свою очередь протофиламенты образуются за счет взаимодействия мономерных субъединиц белка, обогащенного бета-слоями (изображены в виде стрелок) (D) ( Taylor and Staniforth, 2022).

Как упоминалось выше, большинство амилоидов высших эукариот приводят к развитию амилоидозов, неизлечимых заболеваний человека и животных. Однако на сегодняшний день известно большое количество так называемых функциональных амилоидов, когда белок в норме образует амилоидные структуры. Что не удивительно, ведь амилоидные фибриллы обладают такими уникальными свойствами, как удивительная устойчивость к различным агентам, механическая прочность, эластичность. Белки, обладающие амилоидными свойствами обнаружены у низших эукариот и в клетках разных тканей у членистоногих и позвоночных (Sergeeva and Galkin, 2022). Некоторые функциональные амилоиды эукариот перечислены в таблице 2

**Таблица 1.** Функциональные амилоиды эукариот (Sergeeva and Galkin, 2020).

Амилоидные	Биологический	Функция амилоида
------------	---------------	------------------

белки	вид/локализация белка	
<i>PMEL17</i> фрагмент	<i>Bos taurus</i> / глазной эпителий, меланосомы	Регуляция синтеза меланина и его полимеризации
<i>ACTH</i> , $\beta$ -эндорфин, пролактин, гормон роста, окситоцин и вазопрессин	<i>Mus musculus</i> / секреторные гранулы в гипофизе	Длительное хранение секретируемых белков, гормонов
<i>FXR1</i>	<i>Rattus norvegicus</i> / кортикальные нейроны	Регуляция стабильности РНК и ее трансляции
<i>EAS hydrophobin</i>	<i>Neurospora crassa</i> / поверхность конидий	Формирование амфифильных пленок в воздушной/водной среде, что снижает поверхностное натяжение, обеспечивает гифальный рост и защищает гифы от дегидратации
<i>SC3 hydrophobin</i>	<i>Schizophyllum commune</i> / поверхность гиф	Формирование амфифильных пленок в воздушной/водной среде, что снижает поверхностное натяжение, обеспечивает гифальный рост и защищает гифы от дегидратации
<i>CPEB</i> и его ортологи <i>Orb2</i> , <i>CPEB-3</i>	<i>Aplysia californica</i> , <i>Drosophila melanogaster</i> , <i>Mus musculus</i> / нейроны	Обеспечение долговременных синаптических взаимодействий и обеспечение долговременной памяти
<i>Het-S</i>	<i>Podospora anserine</i> / цитоплазма гиф	Регуляция вегетативной несовместимости
<i>RIP1/RIP3</i>	<i>Human</i> , линия клеток НТ-29 (колоректальная аденокарцинома)/ цитоплазма клеток	Программируемый некроз
<i>Rim4</i>	<i>S.cerevisiae</i> / цитоплазма клеток	Трансляционный репрессор, необходимый для клеточного цикла
<i>Cdc19</i>	<i>S.cerevisiae</i> / цитоплазма клеток	Регуляция клеточного цикла
<i>ZP1, ZP2, ZP3</i>	<i>Mus musculus</i> , <i>Homo sapiens</i> / <i>zona pellucida</i> , зрелых и	Защита ооцита и эмбрионов от различных факторов (изменение температуры, механического

	незрелых ооцитов	давления, протеазы, бактерии, вирусы и т.д.)
<i>PAP, semenogelins 1, 2</i>	<i>Homo sapience/</i> сперма	оплодотворение
<i>Bgl2, Gas1, Toh1, Ypg1, Muc1, Flo1</i>	<i>S.cerevisiae/</i> цитоплазма клеток	Поддержание клеточной формы и целостности, клеточная агрегация
<i>MaSp1, MaSp2</i>	<i>Nephila clavipes/</i> шелк	Компонент основной нити паутины
<i>ADF-4</i>	<i>Araneus diadematus/</i> шелк	Компонент основной нити паутины

У прокариот также обнаружены функциональные амилоиды, образующие пили, являющиеся компонентом биопленок, организующие белковые комплексы на поверхности клеток и т.д. (Sonderby *et al.*, 2022)

**Таблица 2.** Амилоиды прокариот

Амилоидные белки	Бактерии	Функции амилоидов
<i>Curli (CsgA)</i>	<i>Escherichia coli</i>	Компонент биопленки, адгезия на субстрате
<i>Curli/Tafi (CsgA)</i>	<i>Salmonella ssp.</i>	Компонент биопленки, адгезия на субстрате
<i>Mtp</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Формирование пилей, связывание с ламинином
<i>MccE492</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Антимикробная активность
<i>FapC</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Компонент биопленки
<i>Chaplins (ChpA-H)</i>	<i>Streptomyces coelicolor</i>	Поверхностный белок бактериальных спор
<i>Phenol soluble modulins</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	Компонент биопленки
<i>TasA</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	Компонент биопленки, поверхностный белок бактериальных спор
<i>Harpins (HpaG)</i>	<i>Xanthomonas axonopodis</i>	Цитотоксическая активность

Существует около сорока белков, которые могут формировать патологические амилоидные агрегаты в организме человека и других млекопитающих (Нижников и др., 2015). Целая группа патологических амилоидов связана с нейродегенеративными

заболеваниями такими как болезнь Альцгеймера, болезнь Хантингтона и болезнь Паркинсона.

## 2.2. Болезнь Паркинсона

Болезнь Паркинсона – дегенеративное заболевание головного мозга, сопровождающееся симптомами нарушения двигательной функции и широким спектром недвигательных нарушений (снижение когнитивных функций, психические расстройства, нарушения сна, боли и расстройства чувствительности). Двигательные нарушения, в частности, непроизвольные движения и болезненные непроизвольные сокращения мышц, способствуют расстройствам речи и моторики и ограничивают возможности больного во многих сферах жизни (Всемирная организация здравоохранения, 2022).

Была обнаружена генетическая и нейрпатологическая связь между  $\alpha$ -синуклеином (aSyn, кодируемый геном *SNCA*) и болезнью Паркинсона (Leonidas Stefanis, 2012). aSyn является основным компонентом патологических белковых образований внутри нейронов – тельцах Леви, что является диагностическим признаком болезни Паркинсона (Rochet and Lansbury 2000)

В ряде работ, исследователи обнаруживают связь дисбактериоза и болезни Паркинсона, в частности, уменьшение количества бактерий одних родов и увеличения других (Scheperjans et al., 2015; Keshavarzian et al., 2015; Hasegawa et al., 2015 ). Эти исследования положили начало становлению гипотезы, что дисбактериоз может быть механизмом нейровоспаления, который приводит к неправильному сворачиванию aSyn и развитию болезни Паркинсона. После этого в течение неполных 10 лет интерес к этой тематике активно рос: вышло большое количество статей с метагеномными исследованиями ЖКТ пациентов с болезнью Паркинсона и прочими синуклеинопатиями.

Чтобы собрать воедино результаты различных работ, в лаборатории СПбГУ провели анализ литературы. Общая картина после проведенного мета-анализа свидетельствует о том, что кишечная микрофлора людей с болезнью Паркинсона зависит от роста численности бактерий семейств *Lactobacillaceae*, *Bifidobacteriaceae*, *Desulfovibrionaceae*, *Akkermansiaceae*, *Rikenellaceae*, *Verrucomicrobiaceae*, *Porphyromonadaceae* и *Tannerellaceae*. Сниженная численность в составе микробиома выражена среди бактериальных классов *Oscillospiraceae*, *Lachnospiraceae* и *Clostridiaceae*.

Для болезни Паркинсона в целом показано сокращение бактериальных таксонов, которые связаны с

противовоспалительными/нейропротекторными эффектами, особенно в семействе *Lachnospiraceae* и ключевых членах, таких как *Butyrivibrio*, *Pseudobutyrvibrio*, *Coproccoccus* и *Blautia* (Vascelari *et al.*, 2020). Изменение в представленности семейства *Lachnospiraceae* коррелируют с измененной скоростью метаболизма при болезни Паркинсона (Vascelari *et al.*, 2020).

Агрегаты *aSyn* встречаются не только в ЦНС, их также обнаруживают в периферической нервной системе, в частности в её части, иннервирующей кишечник. Впервые гипотеза о развитии спорадической формы болезни Паркинсона в результате агрегации *aSyn* в нейронах кишечника и последующего распространения патологии в ЦНС была выдвинута Брааком с соавторами (Braak *et al.*, 2003; Braak *et al.*, 2006). В своей работе они изучили локализацию скоплений *aSyn* в различных частях нервной системы пациентов с спорадической болезнью Паркинсона. В частности, были проанализированы препараты энтеральной нервной системы (ЭНС), дорзальных моторных ядрах блуждающего нерва, черной субстанции, височного мезокортекса (промежуточная кора) и неокортекса. Важным наблюдением стало то, что во всех случаях скопления *aSyn* были найдены в ЭНС и блуждающем нерве, а для остальных зон наблюдалась корреляция между наличием агрегатов этого белка и стадией заболевания.

В экспериментах *in vitro* *CsgA* ускоряет агрегацию *aSyn* (Sampson *et al.*, 2020). Важно отметить, что для развития синуклеинопатии важны именно амилоидные свойства *CsgA*. Бактерии, продуцирующие неамилоидогенный вариант *CsgA*, названный «SlowGo», гораздо слабее вызывают описанные симптомы (Sampson *et al.*, 2020). Инъекция амилоидогенными пептидами *CsgA* в кишечную стенку модельных мышей приводит к нарушению моторных функций, а также ускоряет агрегацию *aSyn*. В контрольных экспериментах с неамилоидными пептидами *CsgA* подобных эффектов обнаружено не было (Sampson *et al.*, 2020).

О потенциальной роли *CsgA* в развитии болезни Паркинсона у человека свидетельствуют недавние клинические данные. В крови больных болезнью Паркинсона присутствуют белки, которые дают реакцию с антителами к пептиду *CsgA*. Причём сигнал от этих антител выше в группе больных по сравнению со здоровыми индивидуумами (Jasemi *et al.*, 2022).

Таким образом, амилоидные белки бактерий могут вызывать агрегацию альфа-синуклеина. Данная работа является частью большого проекта по идентификации таких белков.

### 3. Работа и обсуждение результатов

#### 3.1. План работы над проектом

- 1) Конструирование физических карт плазмид, содержащих нуклеотидные последовательности участков генов потенциально амилоидогенных белков бактерий *in silico* с помощью программы Ugene
- 2) Получение ПЦР-продуктов участков генов-кандидатов с помощью досинтеза олигонуклеотидов (поскольку клонируемые фрагменты маленькие)
- 3) Рестрикция ПЦР-продуктов и плазмиды pVS72 по сайтам NotI и XbaI, чтобы получить совместимые липкие концы.
- 4) Гель-электрофрез продуктов рестрикции плазмиды pVS72 и выделение из геля фрагмента, соответствующего по длине основной части вектора.
- 5) Очистка продуктов рестрикции ПЦР-фрагмента
- 6) Лигирование вектора и ПЦР-фрагментов
- 7) Трансформация лигазной смесью штамма *E. coli XL10-gold*
- 8) Отбор устойчивых колоний трансформантов и ПЦР «с колоний» с праймерами к целевым участкам генов
- 9) Подтверждение наличия целевых фрагментов генов на плазидах методом секвенирования

#### 3.2. Задачи проекта

1. Конструирование плазмид *in silico* в программе Ugene для получения референсных последовательностей для сравнения и анализа сиквенсов плазмид.
2. Конструирование плазмид, содержащих ДНК-последовательности фрагментов генов интереса с помощью методов геной инженерии.
3. Секвенирование полученных конструкций и анализ сиквенсов для подтверждения вставки фрагментов генов интереса.

#### 3.3. Материалы и методы

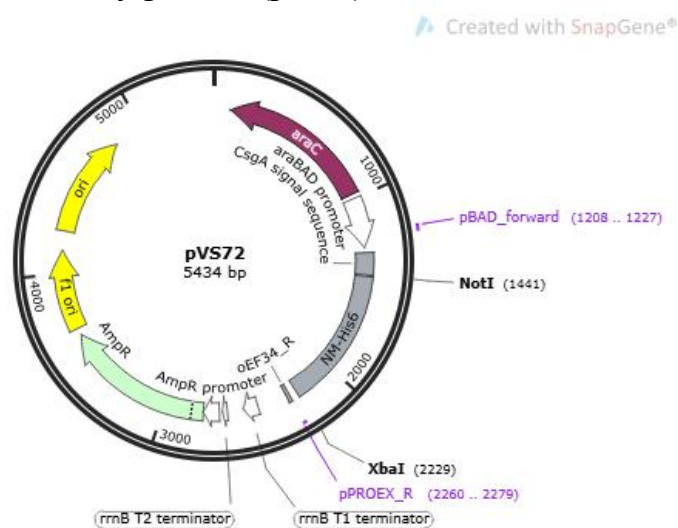
##### Штаммы, среды и условия культивирования

Для конструирования и получения плазмид в препаративных количествах в работе использовали бактериальный штамм штамм *Escherichia coli XL10-gold* генотипа *Tet<sup>r</sup>delta- (mcrA)183 delta- (mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte [F' proAB lacI<sup>q</sup>ZDM15 Tn10 (Tet<sup>r</sup>) Amy Cam<sup>r</sup>]*.

Для культивирования бактерий использовалась богатая среда LB (Miller, J. H., 1972). Для селекции бактерий, содержащих плазмиду pVS72 использовали среду LB, содержащую ампициллин в концентрации 100 мкг/мл среды. *E. coli* выращивали при температуре 37 °C.

## Плазмиды

В качестве исходной плазмиды для конструирования использовали плазмиду pVS72 (рис.5)



**Рисунок 3.** Физическая карта плазмиды pVS72. Плазмиды содержат ген β-лактамазы, определяющий устойчивость клеток к ампициллину (AmpR), ориджин репликации, позволяющий реплицировать плазмиду в клетках бактерий (ori), на карте обозначены сайты рестрикции XbaI, NotI, ограничивающие нуклеотидную последовательность, кодирующую NM-домен белка Sup35, известного дрожжевого приона (инфекционного амилоида). araBAD-promoter – индуцируемый присутствием в среде арабинозы промотор. pBAD\_forward, pROEX\_R – места посадки праймеров. Исходная плазмиды в дальнейшем используется в качестве положительного контроля в системе C-DAG

## Олигонуклеотиды

**Таблица 3.** Праймеры, использованные для плазмидного конструирования, проверочной ПЦР с колоний и секвенирования:

Праймер	Последовательность от 5'-3'
U2KXV3_874-905-R	TTGGTGACGTTGAAGGCGTGTCCCTTATTAGATCT
R6NOL6_148-179-R	ACACCGGCGGCGGCTAAAATGACAGATTAGATCT
A0A0H3JBS4_59-85-R	TTTTCTAGATTA CTCAACAGAAATCATGAACTCT TTCGG CAGTAAACCGACAGCAGTTGCGC
P52143_430-463-R	TCAACGGTTGTGCCACGTCCCTGACTATAGATT AGATCT
A0A663BBE6_80-113-R	GCAATTCTAGTTACTCCGGTCGTTAGACGGCATT AGATCT

W1HUD9_68-92-R	GCCAATTAGATCT
Q8XAH8_58-94-R	GTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGGCTGTTTT GGCGGATGAGAGAAGA
A0A378EB43_535-570-R	CCGCCACTCAACCTAGCAGTTGTTGGTCAGCGT CTCGATTAGATCT
P11000_429-451-R	TAGATCT
Q8XE28_1160-1192-R	AATAGTGCTAGGGGTAAGCTGCCTTTAAATTAG ATCT
U2KXV3_874-905-F	GCGGCCGCAACAACACTACTGCCACTGCCGCGA
R6NOL6_148-179-F	GCGGCCGCAAGAGGTCACCGTAGAGGCTGACC
A0A0H3JBS4_59-85-F	AAAGCGGCCGCAAGCGAATGTTACTGATACTTTT GCTGAAGTTAGCGCAACTGCTGTCGGTTTAC
P52143_430-463-F	GCGGCCGCAAGCGGAGGCTCGCTGATTGTCT
A0A663BBE6_80-113-F	GCGGCCGCAAGCGCCAGCGGCGTCGGCGTGA
W1HUD9_68-92-F	GCGGCCGCAACCGGGCCAGAAGTTGGGGTCA
Q8XAH8_58-94-F	GCGGCCGCAAGCGGAGCTGCTCTTGGAGGTG
A0A378EB43_535-570-F	GCGGCCGCAAAATCCGCCGGGCGGCATGGTGC
P11000_429-451-P	GCGGCCGCAAGCGGCTTTTGTAACTGCTG
Q8XE28_1160-1192-F	GCGGCCGCAAGCGGCTGGGTTTACACA
pBAD_F	ATGCCATAGCATTTTTATCC

## Методы

### Выделение плазмидной ДНК из клеток *Escherichia coli*

Выделение и очистку плазмидной ДНК проводили с использованием набора реагентов Евроген, согласно инструкции производителя.

### Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

Досинтез олигонуклеотидов:

В состав каждой пробы объемом 25 мкл входили

- по 10 мкл праймеров F и R к целевому фрагменту гена с концентрацией 10 пМ/мкл,
- 2,5 мкл 10x буфера для полимеразы с магнием,
- 2,5 мкл dNTPs с концентрацией 2,5 мМ/мкл
- 0,25 мкл hsTaq-полимеразы (hot start) (Thermo scientific, кат. 14966100

<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/14966100?SID=src-h-srp-14966100> )

ПЦР проводили по следующей программе:

1. 95 °C 5 минут для активации полимеразы

2. 95 °С 30 секунд
3. 58 °С 30 секунд
4. 72 °С 30 секунд

Второй этап циклично повторялся 10 раз

1. 10 °С

### **ПЦР с бактериальных колоний:**

Матрицу для ПЦР готовили следующим образом:

1. С чашки отбирали стерильной палочкой или стерильным наконечником одну бактериальную колонию и ресуспендировали клетки в 20 мкл воды.
2. Инкубировали суспензию при 100 °С в течение 2-5 минут.
3. Центрифугировали смесь при скорости 14000 оборотов/мин в течение 10 минут. Для ПЦР использовали 2 мкл надосадочной жидкости.

В состав каждой пробы объемом 10 мкл, входили:

- 2 мкл матрицы
- 1 мкл 10x буфера для полимеразы,
- по 0,1 мкл праймеров рBAD\_F и R, соответствующего целевому фрагменту гена
- 1 мкл dNTPs с концентрацией 2,5 мМ/мкл
- 0,1 мкл hsTaq-полимеразы
- вода до объема 10 мкл

ПЦР проводили по следующей программе:

1. 95 °С 5 минут для активации полимеразы
2. 95 °С 30 секунд
3. 54 °С 30 секунд
4. 72 °С 1 минута

Второй этап циклично повторялся 30 раз

1. 72 °С 10 минута (досинтез)
2. 10 °С

### **Рестрикция**

Рестрикцию плазмиды рVS72 и ПЦР-продуктов проводили по сайтам XbaI и NotI в 10x буфере BamHI при температуре 37 °С 8-10 часов. Использовали по 3 мкг плазмиды.

При рестрикции ПЦР-продукта (по сайтам XbaI и NotI при описанных выше условиях), его объем в рестрикционной смеси составлял 1/7 часть, что позволяло избежать дополнительной очистки ПЦР-продукта. В рестрикционную смесь добавляли по 0,1 мкл эндонуклеаз рестрикции XbaI и NotI и 1 мкл 10x буфера BamHI на каждые 10 мкл реакции.

### **Лигирование фрагментов ДНК**

Лигирование проводили в объеме 10 мкл. К смеси фрагмента плазмиды pVS72 (100 нг) и очищенного ПЦР-фрагмента в пропорции 1:10 в молярном соотношении, добавляли 1 мкл 10X буфера для лигазы, 1 ед. лигазы T4. Реакцию проводили в течение ночи при 4 °С.

#### **Электрофорез фрагментов ДНК (Остерман, 2002)**

Электрофорез продуктов рестрикции pVS72 и продуктов ПЦР с колоний проводили в 1% агарозном геле в буфере TBE (45mM Tris, 45mM борная кислота, 0,02M ЭДТА pH 8.0). Электрофорез продуктов досинтеза проводили в 2% агарозном геле. Электрофорез проводили при напряжённости поля 6-7 В/см. Для того, чтобы контролировать нанесение проб ДНК в гель использовали буфер для нанесения (5x: 0,25 % бромфеноловый синий (w/v); 0,25 % ксиленианол (w/v); 30 % глицерин (v/v).)

Для визуализации ДНК в геле, гель окрашивали в растворе бромистого этидия (0,1–0,5 мкг/мл). Инкубировали в течение 5–10 минут, после чего переносили на трансиллюминатор.

#### **Выделение фрагментов ДНК из агарозного геля**

Выделение фрагмента плазмиды pVS72 из геля проводили набором Thermo Scientific Gel Extraction Kit с помощью реактивов и по рекомендациям, предложенным фирмой-производителем.

#### **Очистка гидролизованного ПЦР-продукта**

Очистку фрагмента ПЦР-продукта после рестрикции проводили набором Thermo Scientific PCR Purification Kit с помощью реактивов и по рекомендациям, предложенным фирмой-производителем.

**Измерение концентрации ДНК** (ПЦР-фрагментов целевых генов, выделенного из геля вектора, плазмид) проводили с помощью спектрофотометра NanoDrop 2000.

#### **Трансформация бактериальных клеток (Hanahan, 1983)**

К 200 мкл компетентных клеток добавляли 10 мкл лигазной смеси, после этого клетки со смесью инкубировали 30 минут при 0 °С. Затем клетки подвергали тепловому шоку в течение 30 секунд при 42 °С в водяной бане. Для остановки теплового шока клетки помещали в ледяную баню на 15 сек. Клетки растили 1 ч в 900 мкл жидкой LB, а затем высевали на среду с ампициллином, в концентрации 100 мкг/мл среды.

#### **Программное обеспечение**

Конструирование плазмид, создание ПЦР-продуктов *in silico* и анализ данных секвенирования проводили с помощью программ

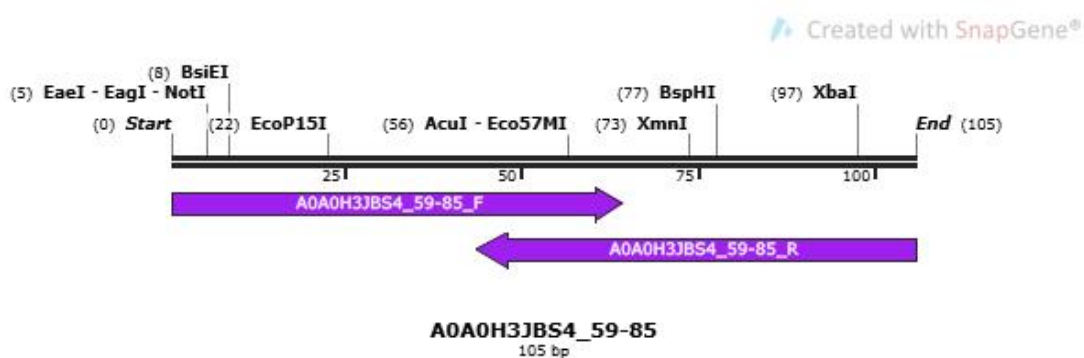
Ugene (<http://ugene.net/ru/download.html>) и Snapgene (<https://www.snapgene.com/snapgene-viewer>)

### 3.4. Конструирование плазмид, содержащих фрагменты бактериальных белков интереса *in silico*

Ранее в нашей лаборатории были подобраны олигонуклеотиды для синтеза фрагментов бактериальных белков интереса. В данной работе использовали праймеры к 10 нуклеотидным последовательностям, кодирующим фрагменты целевых белков. Прямой (F) и обратный (R) праймеры комплементарны друг другу на 3' концах (область комплементарности 20-21 нуклеотидов) для того, чтобы в смеси они образовывали дуплексы, которые в дальнейшем будут достраиваться полимеразой до полноценного двунитевого фрагмента. На 5'-концы праймеров были введены сайты рестрикции: на F-праймер – NotI, на R – XbaI, для дальнейшего конструирования плазмид.

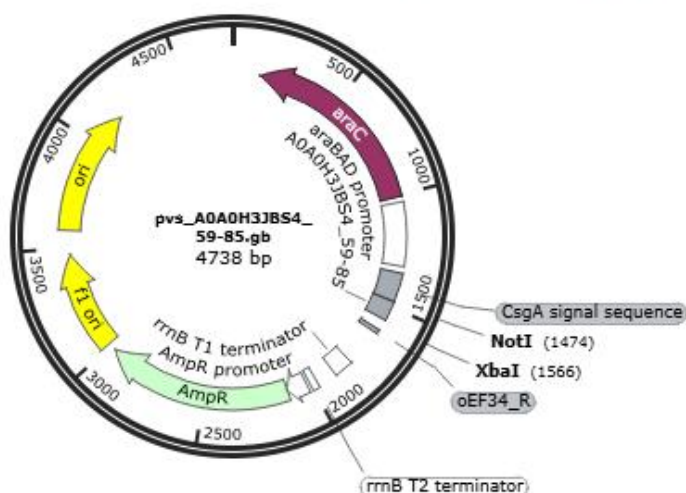
Первым этапом нашей работы было создание физических карт конструируемых плазмид для того, чтобы иметь референсную последовательность для анализа результатов секвенирования плазмид, а также, чтобы иметь возможность прогнозировать результат рестрикционного анализа полученных плазмид.

С помощью программы Ugene были симулированы ПЦР-продукты на основе имеющихся праймеров. Пример подобной симуляции визуализирован с помощью программы SnapGene приведен на рисунке ...



**Рисунок 4.** Физическая карта одного из ПЦР-продуктов. Стрелками обозначены праймеры, использовавшиеся для синтеза ПЦР-продукта.

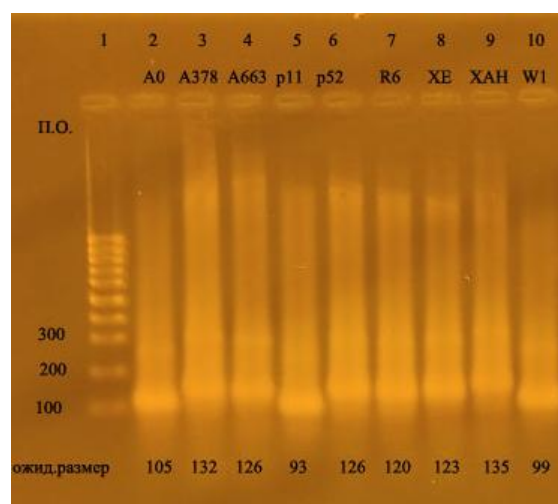
Далее с помощью программы Ugene на основе плазмиды pvs72 (см. Материалы и методы) были сконструированы 10 плазмид, содержащие нуклеотидные последовательности фрагментов генов интереса. Пример такой плазмиды визуализирован с помощью программы SnapGene и приведен на рисунке 11



**Рисунок 5.** Физическая карта плазмиды pvs\_A0A0H3JBS4\_59\_85, сконструированной с помощью программы Ugene и визуализированная с помощью программы SnapGene.

### 3.5. Получение ПЦР-продукта фрагментов бактериальных генов интереса

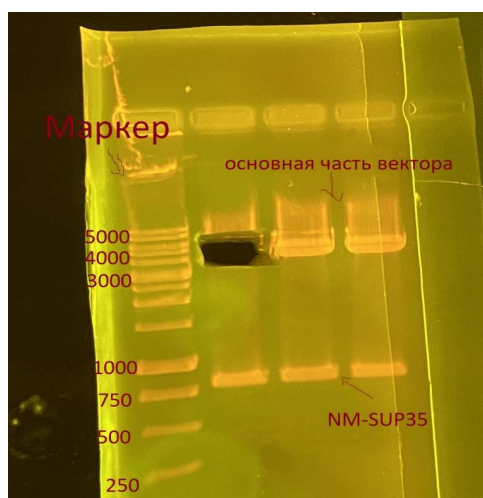
Досинтез олигонуклеотидов для получения ПЦР-продукта, соответствующего фрагменту гена интереса проводили при условиях описанных в разделе «Материалы и методы». По 2 мкл полученных ПЦР-продуктов нанесли в 2% агарозный гель, чтобы убедиться в их наличии. На геле видны бэнды ДНК, примерно соответствующие по размеру ожидаемым фрагментам (рис.12 ...)



**Рисунок 6.** Электрофореграмма ПЦР-продуктов фрагментов целевых генов. Дорожка 1 – 100 bp маркер, слева обозначен вес бэндов в парах оснований (п.о.). Дорожки 2-10 – ПЦР-продукт фрагментов генов интереса, внизу ожидаемый размер фрагментов в п.о.

### 3.6. Подготовка вектора и ПЦР-продуктов к лигированию

В нашем распоряжении имелась плазмида pVS72 для C-DAG, содержащая в качестве экспрессируемой последовательности NM-домен гена *SUP35*, слитый с 7-His тегом (размером 780 п.о.). NM-SUP35 ограничен сайтами рестрикции Not I и XbaI (см. раздел «Материалы и методы»). Для создания плазмид, содержащих фрагменты бактериальных генов интереса, провели рестрикцию pVS72 по этим сайтам, затем продукты рестрикции наносили в агарозный гель и выделяли из геля фрагмент, соответствующий основной части вектора – 4650 п.о. (рис. 13). Рестрикцию и выделение из геля фрагмента проводили с использованием реагентов и в условиях, описанных в разделе «Материалы и методы».



**Рисунок 7.** Электрофореграмма продуктов рестрикции плазмиды pVS72. 1 дорожка – маркер 1kb, слева обозначен вес бэндов в парах оснований (п.о.). Дорожки 2-4 гидролизованная плазмида pVS72.

Концентрацию выделенного из геля фрагмента определяли с помощью спекрофотометра, она составила 27 нг/мкл.

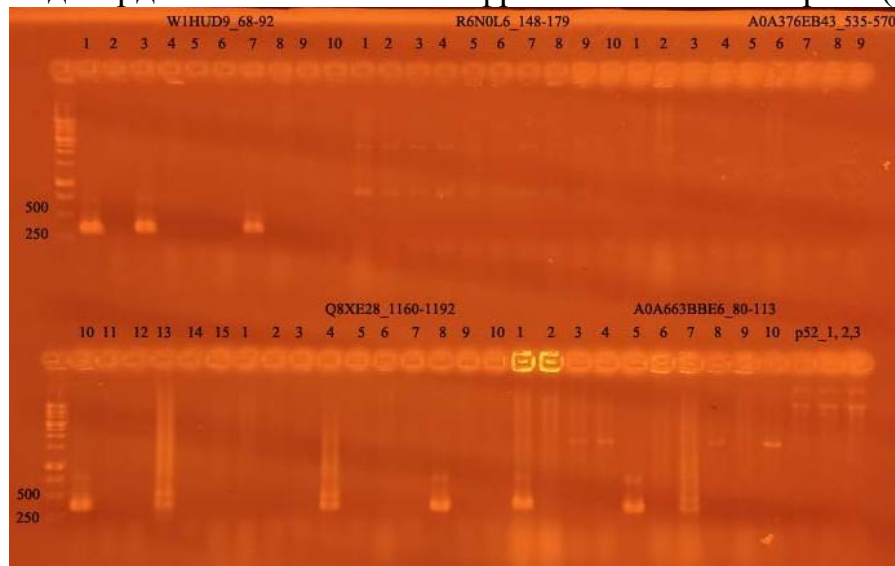
Одновременно с рестрикцией pVS72 проводили рестрикцию ПЦР-фрагментов целевых генов с помощью эндонуклеаз рестрикции NotI и XbaI, для того чтобы создать совместимые липкие концы, затем рестрикционная смесь очищалась с помощью набора реагентов для очистки ПЦР-продуктов (см. «Материалы и методы»). Затем проводили определение концентрации фрагментов ПЦР-продуктов. Она составляла от 60 до 80 нг/мкл. На следующем этапе проводили лигирование подготовленного вектора и ПЦР-фрагментов (см. Материалы и методы).

На следующем этапе проводили трансформацию 200 мкл компетентных клеток штамма *XL10-gold* 10 мкл лигазной смеси (см. Материалы и методы). Трансформантов высевали на среду, содержащую ампициллин, поскольку вектор содержит ген *bla* (кодирующий фермент бета-лактомазу), обеспечивающий

устойчивость бактерий к этому антибиотику. Выросшие колонии отсеивали и проверяли на наличие вставки целевого фрагмента гена с помощью ПЦР.

### 3.7. ПЦР с колоний

Для того чтобы отобрать штаммы бактерий, содержащие плазмиды со вставкой фрагмента гена интереса, колонии бактерий анализировали с помощью ПЦР, используя прямой праймер, комплементарный остову плазмиды – pBAD\_F и обратный праймер, соответствующий олигонуклеотиду фрагмента гена интереса. Ожидаемый размер фрагмента составлял 300 – 350 п.о., в зависимости от размера фрагмента гена интереса (рис 14). Всего было проанализировано около 200 штаммов, из них 49 ПЦР-анализ подтвердил наличие вставки фрагмента гена интереса (табл. 4).



**Рисунок 8.** Пример электрофореграммы ПЦР-продуктов после ПЦР с колоний. Ожидаемый размер ПЦР-продукта около 350 п.о. Наличие ПЦР-продукта ожидаемого размера свидетельствует о наличии вставки.

Отсутствие ПЦР-продукта, ожидаемого размера, свидетельствовало об отсутствии вставки целевого фрагмента гена. Такие плазмиды могли получиться в реакции лигирования, к примеру, при деградации липких концов и лигировании вектора самого на себя по тупым концам или в случае, если гидролиз плазмиды pVS72 прошел не полностью и вместе с фрагментом вектора из геля выделили какое-то количество нативных молекул плазмиды pVS72. Штаммы бактерий, для которых ПЦР-анализ подтвердил наличие целевого фрагмента гена (табл. 4), использовались в дальнейшей работе: из них выделяли плазмиды и проводили секвенирование (секвенирование по методу Сенгера проводили сотрудники Ресурсного центра СПбГУ).

**Таблица 4.** Количество бактериальных штаммов, ПЦР-анализ которых подтвердил наличие вставки фрагмента гена интереса.

Фрагмент гена интереса	Проанализировано штаммов	Количество клонов с геном интереса	Из них секвенировано
U2KXV3_874-905	15	5	2
R6NOL6_148-179	25	3	1
A0A0H3JBS4_59-85	10	4	2
P52143_430-463	15	0	0
A0A663BBE6_80-113	10	3	2
W1HUD9_68-92	10	3	2
Q8XAH8_58-94	10	2	2
A0A378EB43_535-570	15	5	1
P11000_429-451	10	1	1
Q8XE28_1160-1192	15	2	2

### 3.8. Анализ результатов секвенирования

Для того, чтобы убедиться, что нуклеотидные последовательности фрагментов генов интереса на полученных плаزمидях не содержат замен, вставок и выпадений, проводили секвенирование по Сенгеру с праймера pBAD\_F, комплементарному остову плазмиды (см. Материалы и методы). Хроматограммы, полученные в результате секвенирования, были выравнены на референсные последовательности ранее сконструированных *in silico* плазмид (см. раздел 5.1) с помощью программы Ugene. В результате анализа хроматограмм показано, что в отсеквенированных плаزمидях:

1. pVS P11000-429-451 – последовательность фрагмента гена интереса соответствует референсной
2. pVS R6NOL6-148-179-1 – последовательность фрагмента гена интереса соответствует референсной
3. pVS A0A378EBU3-535-570-10 - последовательность фрагмента гена интереса соответствует референсной
4. pVS W1HUD9\_68-92
  - в первом клоне произошло выпадение одного нуклеотида в положении 822 (вторая аминокислота пептида интереса)
  - во втором клоне выпадение 12 нуклеотидов, что приведет к выпадению 4-х аминокислот в положении 53-56 (Asn Ile Ser Val) пептида интереса.
5. pVS A0A663BBE6\_80-113

- в первом клоне произошло выпадение двух нуклеотидов в положении 826 и 829 (3-я аминокислота пептида интереса), что приведет к сдвигу рамки считывания пептида
  - во втором клоне обнаружено выпадение в конце нуклеотидной последовательности 9-и нуклеотидов, что приведет к выпадению трех аминокислот: Ile Asp Glu ( 72-74 аминокислоту пептида) при продукции пептида.
6. pVS Q8XE28\_1160-1192
    - в первом клоне произошло выпадение 1 нуклеотида в положении 824 (2-я аминокислота пептида интереса) ,
    - во втором клоне на плазмиде отсутствует искомая последовательность
  7. pVS A0A0H3JBS4\_59-85 – в обоих клонах на плазмиде отсутствует искомая последовательность
  8. pVS Q8XAN8\_58-94 – в обоих клонах на плазмиде отсутствует искомая последовательность
  9. pVS U2KXV3\_874-905 - в обоих клонах на плазмиде отсутствует искомая последовательность

Таким образом, плазмиды pVS P11000-429-451, pVS R6N0L6-148-179-1 и pVS A0A378EBU3-535-570-10 будут использованы в дальнейшей работе. Второй клон плазмиды pVS W1HUD9\_68-92 содержит последовательность с делецией протяженностью в 4 аминокислоты, а второй клон плазмиды pVS A0A663BBE6\_80-113 – с делецией 3 аминокислоты, но поскольку рамка считывания в нуклеотидных последовательностях, кодирующих оба пептида интереса сохраняется, нами принято решение использовать этот вариант в дальнейшей работе, но продолжить получение плазмид, содержащих нуклеотидную последовательность без замен. Остальные полученные нами плазмиды не пригодны для дальнейшей работы. Будет проведено секвенирование других клонов, содержащих плазмиды с фрагментами этих генов интереса и если не удастся найти плазмиды с последовательностями без замен, процедура клонирования фрагментов генов интереса будет проведена повторно.

Делеции в нуклеотидных последовательностях генов интереса могут возникать по нескольким причинам: неточная работа taq-полимеразы (у этой полимеразы отсутствует корректорская функция и она ошибается с частотой 1 ошибка на 1000 нуклеотидов). Мы руководствовались при выборе этой полимеразы тем, что наши последовательности фрагментов генов интереса – короткие – около 120- 130 нуклеотидов, но в дальнейшем планируем использовать более точные полимеразы, такие как, например, fusion-полимераза.

#### **4.Выводы**

1. В результате процедуры клонирования были получены 3 плазмиды (pVS P11000-429-451, pVS R6N0L6-148-179-1 и pVS A0A378EBU3-535-570-10), содержащие последовательности фрагментов генов интереса, которые будут использованы в дальнейшей работе
2. Плазмиды pVS W1HUD9\_68-92 и pVS A0A663BBE6\_80-113, содержащие небольшие делеции в последовательности фрагментов генов интереса, не нарушающие рамку считывания также будут использованы в дальнейшей работе.

## 5. Список Литературы

1. H. Braak *et al.*, 2006, Gastric alpha-synuclein immunoreactive inclusions in Meissner's and Auerbach's plexuses in cases staged for Parkinson's disease-related brain pathology// PubMed- PMID: 16330147
2. H. Braak *et al.*, 2003, Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease// PubMed- PMID: 12498954
3. Fu *et al.*, 2015, Enzymatic processing of protein-based fibers //DOI 10.1007/s00253-015-6970-x
4. Кассимерис и др., 2016, Клетки по Льюину// Лаборатория знаний.
5. Kajava A.V. *et al.*, Beta arcades: recurring motifs in naturally occurring and disease-related amyloid fibrils. // FASEB J. – 2010. - V. 5. - P. 1311-1399.
6. Нижников и др. 2015 – в списке Нижников А.А., Антонец К.С., Инге-Вечтомов С.Г. Амилоиды – от патогенеза к функции. // Биохимия. – 2015. Т. – 80. - В. 9. - , С. 1356 – 1375.
7. Taylor A.I.P. and Staniforth R.A., 2022, General Principles Underpinning Amyloid Structure//PubMed- DOI: 10.3389/fnins.2022.878869
8. A.Sergeeva and A.Galkin, 2020, Functional amyloids of eukaryotes: criteria, classification, and biological significance// <https://doi.org/10.1007/s00294-020-01079-7>
9. Sonderby, T.V. *et al.*, 2022, Functional Bacterial Amyloids: Understanding Fibrillation, Regulating Biofilm Fibril Formation and Organizing Surface Assemblies
10. Всемирная организация здравоохранения, 2022, болезнь Паркинсона
11. Leonidas Stefanis, 2012,  $\alpha$ -Synuclein in Parkinson's disease //PubMed- PMID: 22355802
12. Rochet and Lansbury, 2000, Amyloid fibrillogenesis: themes and variations//PubMed- PMID: 10679462
13. P. Scheperjans *et al.*, 2015, Gut microbiota are related to Parkinson's disease and clinical phenotype//PubMed- DOI:10.1002/mds.26069
14. Keshavarzian *et al.*, 2015, Colonic bacterial composition in Parkinson's disease//PubMed- DOI:10.1002/mds.26307
15. Hasegawa *et al.*, 2015, Intestinal Dysbiosis and Lowered Serum Lipopolysaccharide-Binding Protein in Parkinson's Disease 10.1371/journal.pone.0142164
16. S. Vascelari *et al.*, 2020, Gut Microbiota and Metabolome Alterations Associated with Parkinson's Disease//PubMed- PMID: 32934117

17. Sampson *et al.*, 2020, A gut bacterial amyloid promotes  $\alpha$ -synuclein aggregation and motor impairment in mice// PubMed- PMID: 32043464
18. S. Jasemi *et al.*, 2022, Antibodies against HSV-1 and Curli Show the Highest Correlation in Parkinson's Disease Patients in Comparison to Healthy Controls// PubMed- PMID: 36499141
19. Остерман Л. А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: Пособие для студентов / — М.: МЦНМО, 2002. — — 248с.
20. Hanahan D., 1983, Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids// PubMed- PMID: 6345791