

Санкт-Петербургский Государственный университет

Рыжкова Кристина Витальевна

Поиск функциональных амилоидов в ооцитах *Drosophila melanogaster*

Выпускная квалификационная работа бакалавра
по направлению подготовки «Биология»
основная образовательная программа бакалавриата «Биология»

Работа выполнена на кафедре
генетики и биотехнологии
биологического факультета СПбГУ

Научный руководитель:
ст. преп., доцент, д.б.н. Алексей П. Галкин

Санкт-Петербург

2019

ОГЛАВЛЕНИЕ

ОГЛАВЛЕНИЕ	2
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ	5
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	7
1.1. Амилоиды.....	7
1.2. Разнообразие амилоидов.....	8
1.2.1. Патологические амилоиды.....	8
1.2.2. Функциональные амилоиды.....	10
1.2.3. Функциональные амилоиды в половом размножении.....	11
1.3. Метод протеомного скрининга амилоидов PSIA LC-MALDI.....	14
1.4. Оогенез <i>Drosophila melanogaster</i>	15
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	20
2.1. Линии мух <i>Drosophila melanogaster</i>	20
2.2. Штаммы микроорганизмов, среды и условия культивирования.....	20
2.3. Плазмиды.....	20
2.4. Методы подготовки и окраски криосрезов.....	21
2.4.1. Изготовление криосрезов.....	21
2.4.2. Окрашивание криосрезов амилоид-специфичным красителем Тиофлавин S.....	21
2.4.3. Окрашивание криосрезов амилоид-специфичным красителем Конго красный.....	22
2.5. Флуоресцентная и поляризующая микроскопия криосрезов.....	22
2.6. Молекулярно-биологические методы.....	22
2.6.1. Протеомный скрининг амилоидов (PSIA LC-MALDI).....	22
2.6.2. Выделение тотальной РНК из гомогенизированной ткани яичников <i>Drosophila melanogaster</i>	24
2.6.3. Стандартные генно-инженерные методы.....	24
2.7. Флуоресцентный анализ агрегации белков.....	26
2.8. Биоинформатический анализ аминокислотной последовательности.....	26
3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ	27
3.1. Связывание белка s36 с амилоид-специфичными красителями Тиофлавин S и Конго красный.....	27
3.2. Проведение протеомных скринингов (PSIA LC-MALDI) яичников <i>Drosophila melanogaster</i>	28
3.3. Биоинформатический анализ амилоидных свойств белка s36.....	30
3.4. Анализ агрегации химерного белка CP36-YFP.....	31
4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ	35

5. ВЫВОДЫ	36
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	37
БЛАГОДАРНОСТИ	43

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РЦ РМиКТ – Ресурсный Центр «Развитие Молекулярных и Клеточных Технологий»

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

p*CUP1* – индуцибельный промотор, активируемый добавлением ионов меди

LC-MALDI – Liquid Chromatography combined Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization (жидкостная хроматография, совмещенная с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией)

MD – minimal dextrose (минимальная дрожжевая синтетическая среда с глюкозой в качестве источника углерода)

PBS – phosphate-buffered saline (натрий-фосфатный буфер)

PFA – paraformaldehyde (параформальдегид)

PMSF – phenylmethylsulfonyl fluoride (фенилметилсульфонил фторид)

PSIA – Proteomic Screening and Identification of Amyloids (протеомный скрининг и идентификация амилоидов)

SDS – sodium dodecyl sulfate (додецилсульфат натрия)

TBS – tris-buffered saline (трис-солевой буфер)

YEPD - yeast extract peptone dextrose (полная дрожжевая питательная среда)

YFP – yellow fluorescent protein (желтый флуоресцирующий белок)

ВВЕДЕНИЕ

Амилоиды представляют собой фибриллярные белковые агрегаты, которые формируются за счет образования упорядоченных межмолекулярных β -складчатых листов. Амилоидным агрегатам присуще несколько физико-химических свойств, которые позволяют отличать их от остальных белковых агрегатов:

- связывание с амилоид-специфическими красителями, такими как Конго красный, а также Тиофлавин S и Тиофлавин T;
- высокий уровень устойчивости к воздействию ионных детергентов;
- способность протофибрилл к автокаталитическому росту за счет присоединения свободных мономеров;

Большинство известных амилоидов являются патогенными и связаны с целой группой заболеваний животных и человека, таких как болезнь Альцгеймера [Reitz et al., 2011], болезнь Хантингтона [Lee et al., 2013], системный амилоидоз AA [Westermarck and Westermarck, 2009] и другие. Однако, наряду с патогенными, были выявлены и функциональные амилоиды, которые в норме присутствуют во многих живых организмах и выполняют жизненно важные функции. Наиболее известными среди них являются белки паутины *Nephila edulis* и шелка *Bombyx mori* и некоторых других насекомых [Andersson et al., 2016] – спидроин и фиброин. Также выявлены функциональные амилоиды бактерий, входящие в состав экстраклеточной биопленки (например, у *Bacillus subtilis* амилоидный белок TasA [Romero, 2010]). У *Saccharomyces cerevisiae* выявлен функциональный белок Bgl2 [Gorkovskii, 2009], стабилизирующий клеточную стенку. У человека был обнаружен амилоидный белок Pmel17, который в норме связывает меланин [Fowler D.M., 2006].

В последние годы появляются данные, что амилоиды присутствуют в норме в ооцитах многих животных. Есть данные, что в оболочке яиц некоторых беспозвоночных, рыб, амфибий, птиц и млекопитающих есть белки, способные образовывать агрегаты, которые связываются с амилоид-специфичными красителями.

В нашей лаборатории был разработан метод протеомного скрининга амилоидов PSIA LC-MALDI, основанный на устойчивости амилоидных фибрилл к ионным детергентам [Nizhnikov et al., 2014]. Этот метод применим для работы с разными организмами и позволяет отделять белки, формирующие высокомолекулярные амилоидоподобные агрегаты, от прочих белков.

В данной работе проведён скрининг белков для выявления наиболее перспективных кандидатов на роль функциональных амилоидов в яичниках *Drosophila*

melanogaster. Плодовая мушка дрозофила удобна в разведении в лабораторных условиях, всесторонне изучена, в том числе у нее хорошо исследован оогенез.

Таким образом, целью данной работы является выявление кандидатов на роль функциональных амилоидов в яичниках *Drosophila melanogaster*.

В соответствии с поставленной целью были сформулированы следующие задачи:

1. Окрашивание срезов яичников *Drosophila melanogaster* амилоид-специфичными красителями Тиофлавин S и Конго красный.
2. Проведение протеомного скрининга для выявления белков-кандидатов на роль функциональных амилоидов в ооцитах *Drosophila melanogaster*.
3. Анализ агрегации наиболее перспективного белка-кандидата в дрожжах *Saccharomyces cerevisiae*.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Амилоиды

Амилоиды представляют собой белковые фибриллярные агрегаты, содержащие регулярно повторенные β -цепи, перпендикулярные оси фибриллы, и формирующие межмолекулярный кросс- β -слой. Мономеры, формирующие амилоидный олигомер могут располагаться по отношению друг к другу как в прямой, так и в противоположной ориентации. В результате присоединения к амилоидному олигомеру новых мономеров образуются поперечно исчерченные протофибриллы, которые объединяются в фибриллы. Типичные амилоидные агрегаты являются высокоупорядоченными гомополимерными структурами, так как межмолекулярные связи образуются между одинаковыми последовательностями взаимодействующих мономеров.

Всем известным амилоидам присущ ряд универсальных физико-химических свойств [Галкин и др., 2018]:

- фибриллы полноразмерного белка связываются с амилоид-специфическими красителями (Тиофлавином Т и S);
- фибриллы белка или его фрагменты связываются с Конго красным, вызывая двойную рефракцию в поляризованном свете;
- амилоидные агрегаты устойчивы к воздействию ионных детергентов, таких как додецил сульфат натрия (SDS);
- протофибриллы способны к автокаталитическому росту за счет присоединения свободных мономеров.

Важно отметить, что соответствие какому-то одному из вышеперечисленных критериев недостаточно для утверждения, что белок является амилоидом. Многие фрагменты белков способны формировать амилоидные фибриллы *in vitro* при определенных условиях, но это не означает, что полноразмерный белок представлен в амилоидной форме в организме-хозяине.

Термин «амилоид» широко используется в научной литературе несколько последних десятилетий, но научное сообщество до сих пор не пришло к единому пониманию этого термина. Медицинское определение «амилоид» отличается от биофизического. С точки зрения медицины амилоиды – это нерастворимые белковые внеклеточные фибриллы, связывающие специфичные красители и вызывающие заболевания, известные как амилоидозы [Sipe et al., 2014]. В молекулярной биологии амилоиды определяют как белковые фибриллы, образующие кросс- β -структуру вне

зависимости от их локализации [Kajava et al., 2010]. В данной работе мы будем придерживаться определения амилоидов, принятого молекулярными биологами.

1.2. Разнообразие амилоидов

1.2.1. Патологические амилоиды

Широкий спектр заболеваний человека возникает в результате неправильной укладки белка (мисфолдинга). Именно патологические амилоиды преимущественно изучались и продолжают изучаться в связи с тем, что амилоидные агрегаты в таких случаях являются цитотоксичными и связаны с многочисленной группой заболеваний – амилоидозами. Так, к настоящему времени известно около сорока различных белков, способных формировать патологические амилоиды в организме человека и других млекопитающих [Nizhnikov et al., 2015].

Наиболее изученным классом являются амилоиды, вызывающие нейродегенеративные заболевания. Повышенный интерес к данной группе патологических амилоидов связан с увеличением средней продолжительности жизни в мире за период с 2000 по 2016 год на 5,5 лет - с 66,5 до 72 лет (по данным ВОЗ). Частота встречаемости нейродегенеративных заболеваний удваивается каждые 5 лет начиная с возраста 55 лет. В 90-95% случаев нейродегенеративные заболевания возникают как спорадические, и только в 5-7% возникновение болезни связано с мутациями [Moreno et al., 2002].

Болезнь Альцгеймера – одно из наиболее известных и распространенных нейродегенеративных заболеваний, для которого характерно прогрессирующее расстройство лимбической и ассоциативной (кортикальной) систем головного мозга, отвечающих за такие жизненно важные функции, как память и логическое мышление. Основным фактором, приводящим к гибели нейронов при болезни Альцгеймера, является накопление амилоидного пептида β ($A\beta$), который образуется в результате процессинга трансмембранного белка APP (Amyloid Precursor Protein) [Selkoe, 2011].

Другим примером нейродегенеративного заболевания является болезнь Паркинсона. В данном случае патология связана с накоплением α -синуклеина, который при локальном повышении концентрации формирует нейротоксичные олигомеры и крупные амилоидные агрегаты (тельца Леви). Олигомеры α -синуклеина поражают нейроны дофаминовой системы в черном теле экстрапирамидной системы головного мозга, что впоследствии приводит к мышечной ригидности, тремору, гипокинезии и неспособности удерживать равновесие при изменении позы [Makin, 2016].

В отличие от вышеперечисленных нейродегенеративных заболеваний, которые в большинстве случаев возникают спорадически, болезнь Хантингтона ("пляска святого Вита") является наследственной. Причина заболевания – экспансия тринуклеотидных повторов ЦАГ, кодирующих глутамин, в гене хантгтингтин (*HTT*) [Lee et al., 2013]. Мутантный белок НТТ формирует патологические амилоидные агрегаты, которые способны инкорпорировать мономеры нормального белка. Чем больше количество полиглутаминовых повторов, тем раньше проявляются первые симптомы заболевания: нарушение моторики, судорожные непроизвольные движения. В дальнейшем развивается танцующая (хореическая) походка, и в конечном итоге болезнь приводит к полной атрофии стриатума и коры головного мозга, и как следствие – к летальному исходу [Vonsattel and DiFiglia, 1998].

Помимо нейродегенеративных заболеваний, поражающих центральную нервную систему, есть также патологии, при которых амилоидные агрегаты накапливаются в других органах и тканях: диабет второго типа (связан с агрегацией пептида IAPP в поджелудочной железе), катаракты (связанные с агрегацией белка γ -кристаллин) и др. [Bleem and Daggett, 2017].

Особую группу составляют инфекционные амилоидозы – заболевания, переносимые белками-прионами, или инфекционными амилоидами. Термин «прион» был предложен Стенли Прусинером в 1982 году для описания особой формы одноименного белка млекопитающих PrP (prion protein). Амилоидные агрегаты белка PrP являются инфекционным агентом, вызывающим в частности, почесуху у овец. В норме этот мембранный белок присутствует в изоформе PrP^C (от «cellular»), амилоидная изоформа PrP^{Sc} (от «scrapie») является прионной и вызывает инфекционные нейродегенеративные заболевания у животных и человека (куру, болезнь Крейтцфельдта-Якоба, фатальная семейная бессонница у людей и аналогичные заболевания млекопитающих – «скрепи» овец, коз, мышей и т.д.) [Prusiner and Scott, 1997].

Таким образом, к настоящему времени описано несколько десятков неизлечимых заболеваний, возникновение и развитие которых связано с накоплением в органах и тканях патологических амилоидов. Число людей, страдающих различными амилоидозами, только увеличивается, из-за чего возникает острая необходимость в изучении амилоидов, а также разработки методов лечения вызванных ими заболеваний.

1.2.2. Функциональные амилоиды

Некоторые амилоиды выполняют жизненно важные функции. Ряд исследований, направленных на выявление функциональной роли амилоидов, был сделан на рубеже XX и XXI веков. Первой работой стала демонстрация амилоидных свойств защитных белков хориона яиц тутового шелкопряда *Bombyx mori* [Iconomidou, 2000]. Схожие результаты были также получены для основного компонента паучьей паутины у *Nephila edulis* – белков спидроинов. В данном случае β -складчатые структуры формируются за счет повторов аланина в центральной части белка [Humenik et al., 2015].

Практически одновременно с открытием фиброина и спидроинов были обнаружены функциональные амилоиды курлины (curli) у бактерий *E. coli* и ряда других энтеробактерий. [Syed and Boles, 2014]. Курлины являются белковым компонентом экстраклеточной биопленки, которая необходима бактериям для колонизации поверхностей и взаимодействия с факторами иммунной системы хозяина. Помимо этого, известны амилоиды бактерий, необходимые для формирования пилей (Mtp у *Mycobacterium tuberculosis*), воздушных гиф (Chaplins у *Streptomyces coelicolor*), цитотоксичных амилоидных олигомеров (Msc у *Klebsiella pneumoniae*) и многих других структур, выполняющих функцию адаптации бактерий к условиям внешней среды [Nizhnikov et al., 2015].

Известны также функциональные амилоиды и у многих видов грибов. Глюкантрансфераза Bgl2p стабилизирует клеточную стенку у различных видов дрожжей, в том числе у *Saccharomyces cerevisiae* [Kalebina et al., 2008]. Оппортунистический патоген человека *Candida albicans* способен связываться с широким спектром тканей хозяина. Наиболее активными участниками адгезии и патогенеза у *C. albicans* являются адгезины семейства Als. Белок Als5p показал способность к формированию амилоидных фибрилл *in vitro*, которые окрашивались Конго красным и Тиофлавином Т [Otoo et al., 2008].

Отдельного внимания заслуживает фактор вегетативной несовместимости у *Podospora anserina*. При плотном контакте гиф грибов происходит слияние их цитоплазмы, что приводит к образованию гетерокариона. Однако, в ряде случаев этот процесс может приводить к гибели гиф из-за отличий между двумя мицелиями по аллелям генов несовместимости (*het*-гены). У *P. anserina* локус *het-s* – один из 9 *het*-локусов, контролирующих вегетативную несовместимость – представлен двумя аллелями (*het-s* и *het-S*). Штаммы с генотипом *het-s* могут иметь два варианта фенотипа: прионный фенотип [Het-s], несовместимый с гифами генотипа *het-S*, и неприонный фенотип [Het-s*], совместимый с *het-S*. В случае слияния гиф фенотипа [Het-s] и [Het-s*] весь белок

переходит в прионную форму и это не влияет на жизнеспособность. Однако, при слиянии гиф штаммов [Het-s] и [Het-S] в гетерокарионе образуется токсичный продукт белок-белкового взаимодействия, что приводит к вегетативной несовместимости и гибели гетерокарионных клеток, что проявляется в виде барража (полосы из вакуолизованных отмерших клеток на границе между двумя колониями) [Coustou et al., 1997].

Функциональные амилоиды были также обнаружены у высших эукариот. Например, белок Pmel17 образует амилоидные фибриллы, формирующие своеобразный каркас, на котором происходит синтез, а впоследствии и запасание меланина [Fowler et al., 2006].

Список известных белков, способных формировать амилоидные фибриллы и выполняющих свою функцию в амилоидной конформации, постоянно пополняется. За последнее десятилетие был сделан еще целый ряд открытий, подтверждающих, что амилоиды вовлечены в регуляцию разнообразных процессов, таких как запасание пептидных гормонов перед их секрецией [Maji et al., 2009], регуляция некроза [Li et al., 2012], формирование акросомального матрикса [Guyonnet et al., 2014], минерализация эмали зубов [Carneiro et al., 2016], формирование zona pellucida в ооцитах млекопитающих [Egge et al., 2015], а также формирование телец Бальбиани в ооцитах лягушек [Voke et al., 2016].

Таким образом, выявление функциональных амилоидов у самых различных живых организмов подтверждает, что амилоидогенез нельзя рассматривать только как патологическое явление, в ряде случаев это важный функциональный процесс организма.

1.2.3. Функциональные амилоиды в половом размножении

Функциональные амилоиды играют важную роль в таких биологических процессах как гаметогенез, созревание половых клеток и оплодотворение, то есть участвуют во многих фундаментальных процессах полового размножения в целом.

Примечательно, что первым описанным функциональным амилоидом, связанным с гаметогенезом, стал защитный белок хориона яиц тутового шелкопряда *Bombyx mori* [Iconomidou, 2000]. Было показано, что мажорный белок хориона – фиброин – на 80% состоит из глицина, аланина и серина, а β -складчатые слои формируются за счет повторяющейся аминокислотной последовательности (Gly-Ala-Gly-Ala-Gly-Ser)_n [Ruan et al., 2008].

На полной питательной среде диплоидные дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* размножаются вегетативно – почкованием. Однако, в условиях голодания (например, при

замене сахара ацетатом натрия) происходит мейоз с образованием гаплоидных спор, которые сливаются с клетками противоположного типа спаривания (α или α). Во время полового размножения специфичный для споруляции РНК-связывающий белок Rem4 формирует амилоидоподобные SDS-устойчивые олигомеры. Олигомеры этого белка связываются с нетранслируемой областью (5'UTR) мРНК циклина CLB3, ингибируя его трансляцию до начала мейоза II и тем самым обеспечивая гомологичную сегрегацию хромосом в мейозе I [Berchowitz et al., 2015].

Подобные механизмы трансляционного контроля мРНК с формированием SDS-устойчивых агрегатов были выявлены в сперматогенезе и у позвоночных, в том числе у человека. У людей выявлено четыре специфичных для сперматогенеза белка – DAZ1-4, формирующих в норме амилоидоподобные агрегаты [King et al., 2012]. Гены этих белков расположены в виде кластера на Y-хромосоме. У мужчин, страдающих бесплодием, часто данная область Y-хромосомы удалена, а такое состояние называется азооспермией [Reijo et al., 1995]. Аутосомный гомолог DAZL (DAZ-like) встречается у всех позвоночных и также участвует в регуляции трансляции при гаметогенезе [Haag, 2001].

Другой РНК-связывающий белок Xvelo был выявлен в ооцитах *Xenopus laevis*. В основном этот белок представлен в тельцах Бальбиани. В данном случае белок Xvelo образует амилоидный каркас, формирует структуру телец Бальбиани и связывает РНК и митохондрии. Тельца Бальбиани участвуют в определении полярности ооцитов, важны для их нормального оплодотворения, а также необходимы для эмбриогенеза [Voke et al., 2016].

Для формирования телец Бальбиани у *Danio rerio* необходим белок bucket ball. Он играет роль в регуляции полярности ооцита и также важен для оплодотворения [Bontems et al., 2009]. Bucket ball имеет домен, ответственный за агрегацию, но его амилоидные свойства только предстоит проверить. Точно так же у дрозофилы белок Oscar, играющий важную роль в организации полярной плазмы, имеет предсказанные амилоидоподобные домены, но экспериментально его амилоидные свойства проверены не были [Ephrussi et al., 1991].

Показано, что амилоиды играют функциональную роль как в яйцеклетках, так и в сперматозоидах различных организмов. Мужские половые клетки подвергаются метаморфозу, называемому спермиогенезом, и приобретают характерное для зрелых сперматозоидов строение: головка, шейка и хвост. На поверхности головки сперматозоида образуется секреторная гранула – акросома [Berruti et al., 2011]. Акросома содержит как

растворимую фракцию, так и нерастворимую акросомальную матрицу (АМ). Акросомальная матрица выступает в качестве каркаса, обеспечивающего высвобождение АМ-ассоциированных белков, необходимых для оплодотворения и взаимодействия с zona pellucida (ZP), окружающей ооцит [Kim et al., 2003]. Было показано, что в акросоме сперматозоидов мыши присутствуют детергент-устойчивые агрегаты. В состав АМ входит целый ряд потенциально амилоидогенных белков: цистатин С (CST3), цистатин 8 (CRES/CST8), лизоцим 2 (LYZ2), zonadhesin (ZAN), рецептор ZP (ZP3R) и многие другие [Guyonnet et al., 2014]. Белок ZAN имеет 44 предсказанных амилоидных сайта видоспецифичного связывания сперматозоида с ZP яйцеклетки. Нокаутированные по ZAN мыши теряли способность сперматозоидов к видоспецифичному связыванию с ZP [Tardif et al., 2010]. Безусловно, биоинформатические предсказания требуют экспериментальной проверки.

Zona pellucida – это гликопротеиновая оболочка вокруг плазматической мембраны яйцеклетки млекопитающих. Она выполняет функцию видоспецифичного распознавания гамет и защиты от полиспермии. У мыши известно 3 белка zona pellucida: ZP1, ZP2, ZP3 – каждый из них имеет домен полимеризации ZP, разделенный на N-концевой (ZP-N) и C-концевой участки (ZP-C) [Litscher et al., 2008]. В образовании целостной оболочки ооцита принимают разные белки ZP, тем самым образуя гетерополимерную структуру, которая связывает амилоид-специфичный краситель. У других позвоночных и беспозвоночных были обнаружены гомологи белков ZP, содержащие домен ZP и выполняющие идентичные функции [Aagaard et al., 2006]. Три белка ZP ооцитов мыши демонстрируют ряд амилоидных свойств. Кроме окрашивания Конго красным, формирования фибриллярных структур *in vitro* и биоинформатического анализа последовательностей (AmylPred2), оболочку ооцитов мышей окрашивали другим амилоид-специфичным красителем – Тиофлавином S и демонстрировали связывание с конформационно-специфичными антителами к амилоидным олигомерам [Egge et al., 2015]. С помощью методов окрашивания Конго красным, просвечивающей электронной микроскопии и биоинформатических алгоритмов для коротких фрагментов (5-6 аминокислот) белков ZP человека также были показаны амилоидные свойства. Однако, амилоидные свойства полноразмерных белков только предстоит проверить [Louros et al., 2013; Louros et al., 2016].

Одно из первых исследований, выявивших амилоидные структуры в половых клетках, было проведено на ооцитах рыб *Austrofundulus limnaeus* в 2001 году [Podrabsky et al., 2001]. Авторы провели ряд окрашиваний неоплодотворенных яиц и яиц с уже

развивающимися эмбрионами амилоид-специфичным красителем Конго красный. Наблюдаемое двойное лучепреломление в поляризованном свете агрегатов *in vivo* и *in vitro* и фибриллярная структура агрегатов *in vitro*, продемонстрированная с помощью просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ), подтвердили их гипотезу об амилоидной структуре белка или белков, входящих в состав оболочки икринок.

На основе приведённых данных можно предположить, что амилоидные белки оболочки могут служить для защиты ооцитов от механических повреждений, патогенных микроорганизмов, а также играют важную роль в видоспецифическом взаимодействии со сперматозоидами и выступают в качестве барьера от полиспермии [Egge et al., 2015].

1.3. Метод протеомного скрининга амилоидов PSIA LC-MALDI.

Несмотря на значительный прогресс в выявлении новых функциональных и патологических амилоидов, большинство из них были обнаружены в результате анализа свойств конкретных белков, либо при исследовании конкретной патологии. Такие подходы не позволяют выявить совокупность всех амилоидных белков определенной ткани, органа или организма.

Общим свойством всех амилоидов является устойчивость к обработке различными ионными детергентами. В нашей был разработан универсальный метод протеомного скрининга амилоидов PSIA LC-MALDI, основанный на устойчивости амилоидных фибрилл к SDS [Nizhnikov et al., 2014]. Этот метод состоит из трех основных этапов:

- 1) Выделение фракции амилоидоподобных белковых агрегатов, устойчивых к обработке ионным детергентом (SDS);
- 2) Разделение белков при помощи жидкостной обратно-фазовой хроматографии;
- 3) Идентификация белков, совмещенная с ионизационной масс-спектрометрией.

Следует учитывать, что белки, выявленные методом протеомного скрининга, являются лишь кандидатами на роль амилоидов, поскольку во фракции детергент-устойчивых агрегатов могут выявляться и не амилоидные белковые агрегаты. Полученные списки идентифицированных белков требует дальнейшего уточнения и проверки с помощью других методов по установлению амилоидных свойств (проведение окрашиваний амилоид-специфичными красителями, исследование амилоидных свойств *in vitro*, анализ агрегации в дрожжах и т.д.).

С помощью данного протеомного метода ранее уже были идентифицированы прионы и амилоиды в различных штаммах дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* [Ryzhova et al., 2018]. Сейчас ведется активная работа по выявлению функциональных амилоидов в различных органах и тканях у широкого спектра организмов: *Drosophila melanogaster*, *Gallus gallus*, *Rattus norvegicus* и других.

1.4. Оогенез *Drosophila melanogaster*

Поскольку представленная работа посвящена выявлению амилоидов в ооцитах дрозофилы, мы подробно рассмотрим структуру яичников плодовой мушки. Яичники *Drosophila melanogaster* – одна из наиболее популярных модельных систем для исследования широкого спектра биологических процессов: развития половых клеток, мейоза, миграции клеток, морфогенеза, межклеточной передачи сигналов, локализации мРНК и трансляционного контроля.

Главным компонентом яичников *D. melanogaster* являются яйцевые трубки (овариолы), в которых выделяют три области: терминальный филамент, гермарий и желточник. Всего один яичник включает 16-20 овариол, каждая из которых является автономной и содержит цепь созревающих яйцевых камер (фолликулов). Новые яйцевые камеры образуются в передней части овариолы – гермарии, содержащем соматические и первичные половые клетки. Гермарий подразделяется на 4 зоны, в соответствии со стадией развития ооцита (1, 2a, 2b и 3) (рис. 1) [Swevers et al., 2005].

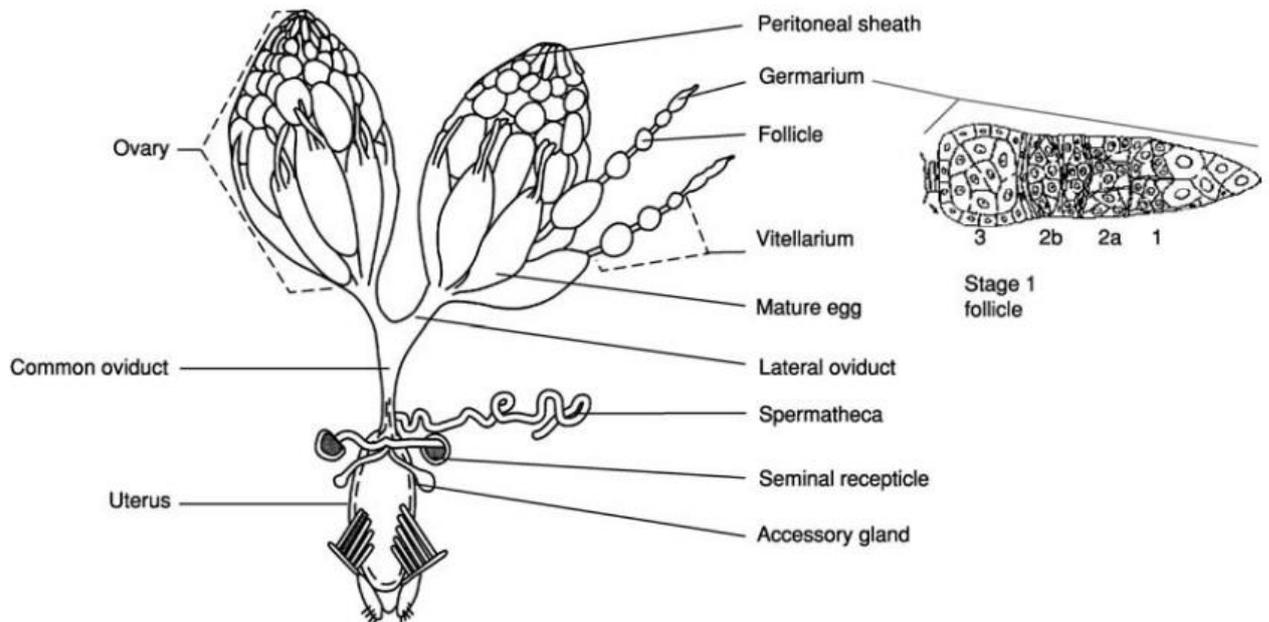


Рисунок 1. Строение яичников *Drosophila melanogaster*, по Swevers et al., 2005. Ovary – яичник, common oviduct – общий яйцевод, uterus – матка, peritoneal sheath – брюшная оболочка, germarium – гермарий, follicle – фолликул (яйцевая камера), vitellarium – вителлярый, mature egg – зрелое яйцо, lateral oviduct – боковой яйцевод, spermatheca – сперматека, seminal receptacle – семяприемник, accessory gland – придаточные железы. Гермарий делится на 4 зоны (1, 2a, 2b и 3), в которых протекают первые стадии развития фолликулов.

Процесс оогенеза у дрозофилы занимает примерно неделю и был произвольно разделен на 14 стадий на основе морфологии. Так, 1 стадия – это отрывание яйцеклетки от зародыша, а 14 стадия – зрелое яйцо (рис. 2А) [Bastock et Johnston, 2008].

На первых стадиях первичные половые клетки делятся ассиметрично с образованием другой стволовой клетки и дочерней клетки, которая вступает на путь дифференцировки. Она делится четыре раза путем митоза с неполным цитокинезом (рис. 2В). В результате образуется киста из 16 клеток, связанных цитоплазматическими мостиками (кольцевые каналы). Только одна из этих 16 клеток будет образовывать ооцит, в то время как другие станут полиплоидными питающими клетками. Основная функция питающих клеток – синтез питательных веществ, белков и РНК и их транспорт в ооцит через кольцевые каналы. Далее идет образование яйцевой камеры. Каждая яйцевая камера содержит фолликулярные клетки соматического происхождения, которые окружают ооцит и питающие клетки [Bastock et Johnston, 2008].

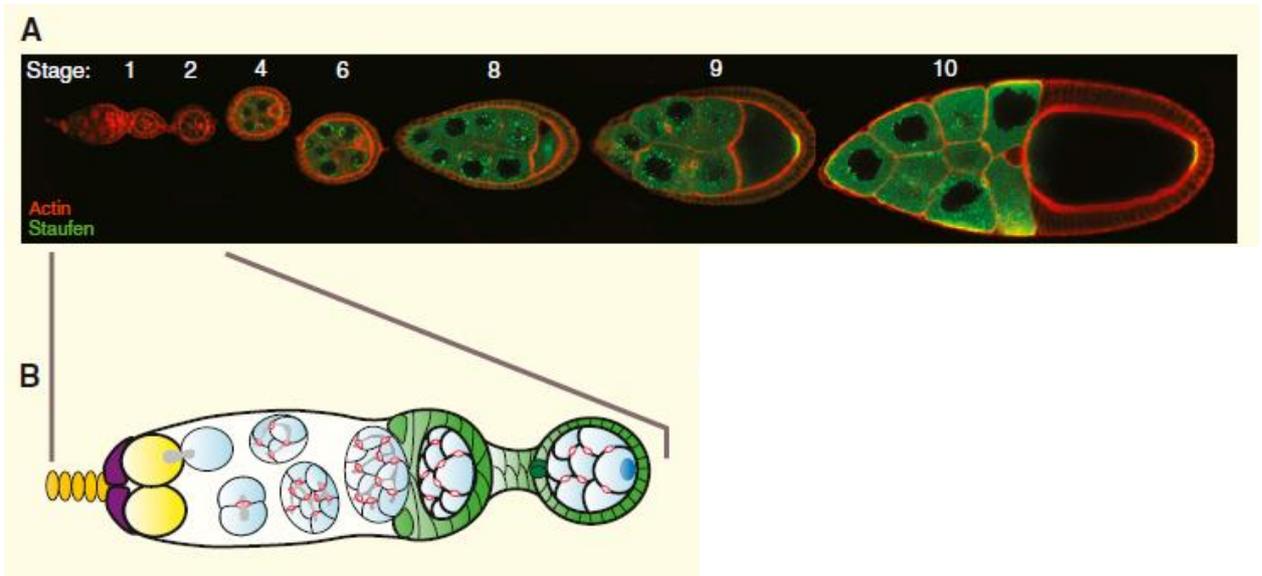


Рисунок 2. Строение яйцевой трубки, по Bastock et Johnston, 2008. Яйцевая трубка (А), экспрессирующая GFP, связанный с белком Staufen (зеленый цвет), и окрашенная фаллоидином, связывающего актин (красный цвет). Гермарий – слева; яйцевые камеры становятся более зрелыми, двигаясь вправо. Гермарий (В). Стволовые клетки – желтый цвет, клетки, образующие кисту – голубой цвет, кольцевыми каналами – красный цвет, фузома – серый цвет, фолликулярные соматические клетки - зеленый цвета.

На следующих этапах развития яйцевая камера удлиняется, фолликулярные клетки мигрируют вокруг ооцита, и начинается образование хориона (рис. 3).

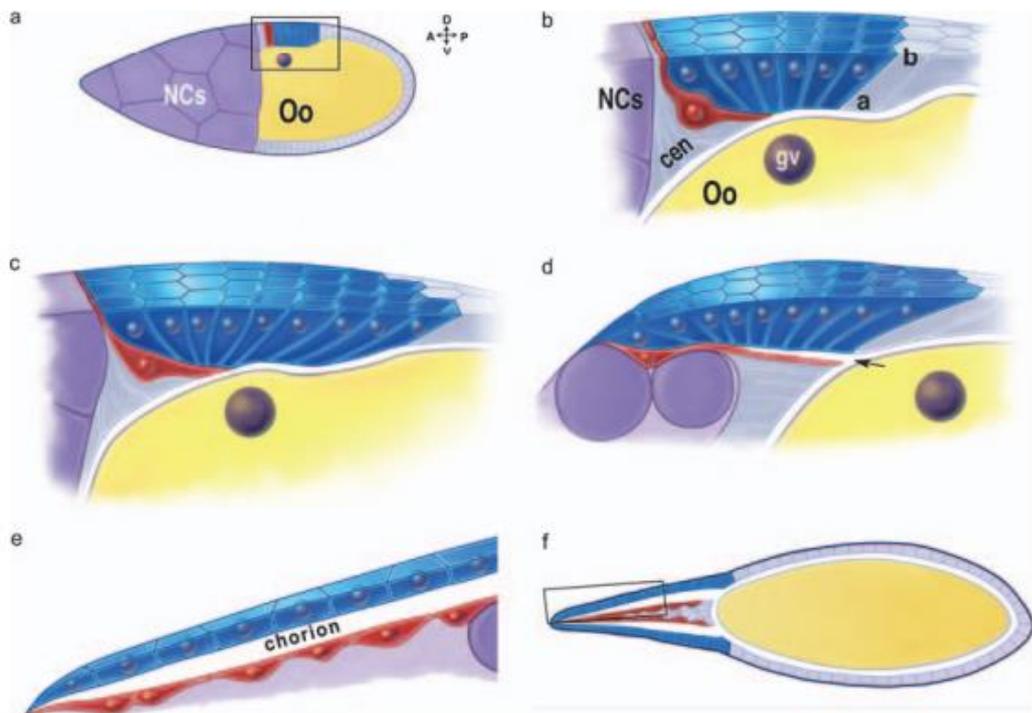


Рисунок 3. Морфогенез дорсального отростка яичной оболочки у *Drosophila melanogaster* (10-14 стадии оогенеза), по Berg, 2008. Стадия 10 (a) – питающие клетки (NS), ооцит (Oo). Стадия 10 в увеличении (b) – клетка пола (floor cell; красная) удлиняется и располагается под клетками крыши (roof cells; синие). Стадия 11 (c) – питающие клетки начинают транспортировать питательные вещества в ооцит. Стадия 12 (d) – образуется просвет. Стадия 13 (e) - клетки крыши синтезируют и выделяют белки хориона в образовавшийся просвет. Стадия 14 (f).

Образование яичной оболочки или хориона происходит, когда клетки фолликулярного эпителия подвергаются их терминальной дифференцировке (floor и roof cells) и начинают синтезировать белки хориона, которые впоследствии собираются внеклеточно в большую макроскопическую структуру [Wu et al., 2008]. В ходе этих событий питающие клетки транспортируют свое содержимое в ооцит и погибают. Начинают формироваться парные дорсальные отростки, в просвет которых фолликулярными клетками крыши синтезируются белки хориона. После завершения хориогенеза фолликулярные клетки также дегенерируют [Berg, 2008].

Яичная оболочка защищает зародыш от агрессивных условий окружающей среды. Кроме того, она также должна обеспечивать достаточный газообмен для дыхания развивающегося эмбриона. В качестве органов дыхания у зародыша выступают дорсальные придатки и аэропилы. Яичная оболочка содержит и другие специализированные структуры, такие как микропиле, расположенное на переднем конце

яйца. Оно формирует канал, который позволяет сперматозоидам проникать в ооцит через яичные оболочки для оплодотворения [Swevers et al., 2005].

Структура хориона у *Drosophila melanogaster* относительно проста и состоит из шести мажорных и 14 минорных белков [Hamodrakas et al., 1989].

Белок s36 – один из шести мажорных белков хориона. Он играет ключевую роль в образовании оболочки ооцита *Drosophila melanogaster*. Все мажорные белки хориона делятся на «ранние», «средние» и «поздние», в зависимости от стадии оогенеза, на которой продуцируется белок. s36 вместе с s38 относится к «ранним» белкам и синтезируется на 11-12 стадиях оогенеза дрозофилы [Fakhouri et al., 2006]. Вместе эти два белка составляют семейство Chorion S36/S38, и каждый из них состоит из центрального домена и двух фланговых «рук». Центральный домен содержит тандемно повторяющиеся пептиды, которые создают вторичную структуру β -листов, чередующихся с β -поворотами. Большая часть аминокислотной последовательности является белок-кодирующей (21-284 аминокислоты), а короткая последовательность в начале – сигнальный пептид (1-20 аминокислоты) необходимый для выхода белка в межклеточное пространство [Hamodrakas et al., 1989].

Известно, что в случае подавления экспрессии путем РНК интерференции гена *Cr36*, кодирующего белок s36, нарушается структура хориона [Velentzas et al., 2016]. Кроме того, на фоне подавления экспрессии этого гена не формируется микропиле, что препятствует оплодотворению и в последствии приводит к стерильности мух.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Линии мух *Drosophila melanogaster*

Яичники для исследования были получены у самок *Drosophila melanogaster* линии Oregon R. Сбор материала осуществлялся на 4-5 день после выхода самок из куколок.

2.2. Штаммы микроорганизмов, среды и условия культивирования

В работе использовали штаммы бактерий *Escherichia coli* DH5 α генотипа *fhuA2 lac(del)U169 phoA glnV44 Φ 80' lacZ(del)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17*.

Для культивирования бактерий использовали жидкие и твердые среды LB. Для отбора трансформантов, устойчивых к ампициллину, использовали твердую среду LB с добавлением ампициллина в концентрации 50 мкг/мл. Культивирование бактерий проводили при температуре 37 °С.

В работе использовали штамм дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* BY4742 генотипа *MAT α his3 Δ 1 leu2 Δ 0 lys2 Δ 0 ura3 Δ 0*.

Для культивирования дрожжей использовались стандартные жидкие и твердые дрожжевые среды: полная среда YEPD и минимальная среда MD. В селективную среду MD добавляли витамины, микроэлементы, а также необходимые азотистые основания и аминокислоты. Для индукции экспрессии генов, находящихся под контролем индуцибельного промотора *pCUP1*, в среду добавляли CuSO $_4$ в концентрации 100 мкМ. Культивирование дрожжей проводили при температуре 30 °С.

2.3. Плазмиды

Для анализа агрегации химерного белка CP36-YFP *in vivo* нами была сконструирована плазида pCup-CP36-YFP из плазмиды pRS316Cup-SIS-YFP, путем вставки фрагмента гена Cp36 по сайтам рестрикции HindIII-BamHI (рис.4). Регуляция экспрессии гена Cp36, слитого с последовательностью YFP, кодирующей желтый флуоресцентный белок, находится под контролем сильного индуцибельного промотора *pCUP1*.

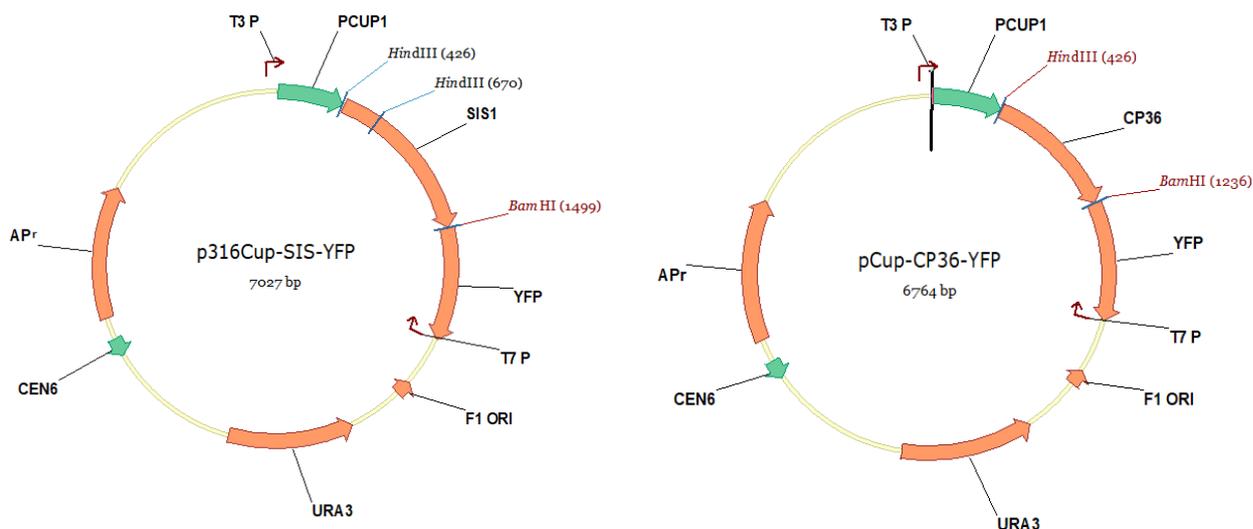


Рисунок 4. Физические карты плазмид pRS316Cup-SIS-YFP и pCup-CP36-YFP. pCUP1 – индуцибельный промотор, активируемый добавлением ионов меди; дрожжевой ген *SIS1*, слитый с последовательностью YFP, кодирующей жёлтый флуоресцентный белок; CP36 – ген, кодирующий белок s36; *URA3* – ген прототрофности по урацилу; T3P, T7P – прокариотические промоторы; F1 ORI – ориджин репликации; CEN6 – участок дрожжевой центromеры; AP^r – ген устойчивости к ампициллину; HindIII и BamHI – сайты рестрикции.

2.4. Методы подготовки и окраски криосрезов

2.4.1. Изготовление криосрезов

Яичники *Drosophila melanogaster* были зафиксированы в PBS, содержащем 4% раствор PFA, и заморожены в криосреде Tissue freezing medium («Leica Microsystems», Германия). Криосрезы толщиной 20 мкм были получены с использованием криотома SM1850UV («Leica Microsystems», Германия).

2.4.2. Окрашивание криосрезов амилоид-специфичным красителем Тиофлавин S

- 1) Приготовленные препараты (криосрезы) отмывали три раза по 5 мин. в буферном растворе PBS.
- 2) Покрывали срезы свежеприготовленным раствором боргидрида натрия (NaBH₄) на 10 мин. для более специфичного связывания красителя и снижения уровня фоновой автофлуоресценции.
- 3) Отмывали срезы в буферном растворе PBS три раза по 5 мин.

- 4) Частично дегидратировали препараты в 70% EtOH 5 мин.
- 5) Далее срезы инкубировали в 1% растворе Тиофлавин S в 70% EtOH 5 мин.
- 6) Отмывали срезы в 70% EtOH три раза по 5 мин.
- 7) Регидратировали образцы в PBS 5 мин.
- 8) Образцы заключали в 10% глицерин для анализа с помощью флуоресцентной микроскопии.

2.4.3. Окрашивание криосрезов амилоид-специфичным красителем Конго красный

- 1) Приготовленные препараты (криосрезы) отмывали 15 минут в буферном растворе PBS.
- 2) Наносили амилоид-специфичный краситель Конго красный на срезы и инкубировали 15 мин.
- 3) Отмывали препараты в буферном растворе PBS три раза по 5 мин.
- 4) Образцы заключали в 10% глицерин для микроскопического анализа.

2.5. Флуоресцентная и поляризирующая микроскопия криосрезов

Препараты исследовали с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа TCS SP5 («Leica Microsystems», Германия) с соответствующим программным обеспечением и инвертированного микроскопа для флуоресцентной микроскопии и ратиометрии Leica DMI6000 с системой OptiGrid («Leica Microsystems», Германия).

2.6. Молекулярно-биологические методы

2.6.1. Протеомный скрининг амилоидов (PSIA LC-MALDI)

а. Выделение фракции белковых агрегатов, устойчивых к обработке детергентами

- 1) Яичники *Drosophila melanogaster* гомогенизировали при помощи криомельницы. Полученный гомогенат хранили при -70 °С.
- 2) К измельчённой ткани (500-800 мг) добавляли ~3 мл раствора (TBS, 10мМ ЭДТА, 2мМ PMSF) и хорошо суспендировали.
- 3) Центрифугировали с помощью CR3i multifunctional Centrifuge («Jouan SA», США) при 3000 rpm (ротор AC 2.14) в течение 5 мин при +4°С.

4) Супернатант отбирали и добавляли 5 мг РНКазы А (75-150 единиц активности/мг) («Sigma-Aldrich», США), доводили объем пробы до 7 мл, инкубировали 30 мин при комнатной температуре. При проведении протеомного скрининга с обработкой хитиназой вместе с РНКазой А добавляли 1 мкл хитиназы (200 единицы активности/г) («Sigma-Aldrich», США).

5) Обработанный белковый лизат наслаивали на 1 мл сахарозной подушки (25% сахара в буфере TBS) в пробирки.

6) Ультрацентрифугировали (Optima L-100 XP Ultracentrifuge; «Beckman Coulter», США) при 50 000 rpm (ротор Ti75) в течение 2 ч при +8°C. Последующие центрифугирования проводились с использованием этой же модели центрифуги и типа ротора.

7) Супернатант сливали, осадок тщательно суспендировали в 1 мл раствора TBS, 10мМ ЭДТА и 2мМ PMSF до гомогенности и доводили объем до 5,4 мл.

8) Добавляли 0,6 мл 10 % SDS до концентрации 1% и аккуратно перемешивали без образования пены.

9) Наслаивали на 2 мл раствора TBS с 20% сахара и 0,1% SDS в пробирки. Инкубировали 8 ч при +18 °С.

10) Ультрацентрифугировали при 50 000 rpm в течение 8 ч при +18°C.

11) Осадок суспендировали в минимальном количестве воды, затем добавляли воды до объема равного 8 мл и ультрацентрифугировали при 50 000 rpm в течение 2 ч при +8°C.

12) Осадок растворяли в 50 мкл воды, добавляли 4-х кратный буфер с SDS (конечный объем примерно 65 мкл) и суспендировали.

13) Осадок кипятили 15 мин. при +100 °С.

б. Идентификация белков

Пробу обессаливали, а затем отдавали в РЦ РМиКТ на проведение высокоэффективной жидкостной хроматографии, совмещенной с масс-спектрометрией. Из списка идентифицированных белков для последующего анализа отбирали белки со счетом масс-спектрометрии не ниже 300.

2.6.2. Выделение тотальной РНК из гомогенизированной ткани яичников *Drosophila melanogaster*

1) К 100 мг образца гомогенизированной ткани яичников *Drosophila melanogaster* добавляли 1 мл тризола. Перемешивали до однородной субстанции и инкубировали в течение 5 мин при комнатной температуре.

2) Добавляли 200 мкл хлороформа. Перемешивали в течение 15 с на вортексе и инкубировали 3 мин при комнатной температуре.

3) Центрифугировали пробу с помощью CR3i multifunctional Centrifuge («Jouan SA», США) при 12 000 rpm (ротор AC 2.14) в течение 15 мин при +4°C. Последующие центрифугирования проводились с использованием этой же модели центрифуги и типа ротора.

4) Отбирали самую верхнюю фракцию и переносили в чистую пробирку.

5) Добавляли 500 мкл изопропанола и инкубировали 10 мин при комнатной температуре.

6) Центрифугировали пробу при 12 000 rpm в течение 10 мин при +4°C.

7) Супернатант удаляли, осадок промывали 500 мкл 80% EtOH.

8) Центрифугировали при 7500 rpm в течение 10 мин при +8°C.

9) Супернатант удаляли, пробирку сушили от EtOH. Растворили осадок в 20 мкл в воде без нуклеаз.

10) Хранили РНК при -20°C.

11) Полученную тотальную РНК проверяли методом электрофореза.

2.6.3. Стандартные генно-инженерные методы

Синтез кДНК проводился на основе тотальной РНК, выделенной из гомогенизированной ткани яичников *Drosophila melanogaster*, с помощью набора реактивов и согласно протоколу набора The OneTaq RT-PCR Kit фирмы «New England Biolabs» (США) (с использованием Taq-полимеразы и oligo (dT) в качестве затравки). Полученную кДНК использовали для амплификации интересующих фрагментов с помощью ПЦР.

Нуклеотидные последовательности использованных в работе праймеров приведены в Таблице 1. Для подбора праймеров использовали последовательность гена Cr36,

кодирующего белок s36, из базы данных NCBI Genbank, применяли программное обеспечение «Oligonucleotide properties calculator» (США), «BioEdit Sequence Alignment Editor» и «Vector NTI Advance» (Life Technologies, США). Синтез праймеров осуществляла компания «Beagle» (РФ).

Таблица 1. Используемые в работе праймеры

Название	Последовательность 5'-3'
For (CP36_HindIII)	CGGAAGCTTTATATGCTGGTGAGCGCTAACTATGGTC
Rev (CP36_BamHI)	GAGGATCCGTAGTTGGGCTGGCCATAGGG

Реакцию амплификации для гена Cp36 проводили в следующих условиях:

95°C – 2 мин. (1 цикл)

94°C – 1 мин., 58°C – 45 сек., 72°C – 1 мин. (1 цикл)

94°C – 1 мин., 70°C – 45 сек., 72°C – 1 мин. (30 циклов)

72°C – 10 мин. (1 цикл)

Амплификация проводилась в амплификаторе «Терцик» («ДНК-Технология», РФ). Анализ полученных фрагментов ДНК проводили путем горизонтального гелевого электрофореза в агарозном геле с добавлением 0,5 мкг/мл бромистого этидия при напряженности электрического поля 5 В/см [Маниатис и др., 1984]. В качестве маркера молекулярного веса и концентрации ДНК использовали ДНК фага λ, гидролизованную по сайтам рестрикции HindIII («Fermentas», Литва).

Выделение ДНК из агарозного геля проводили с использованием наборов «Выделение ДНК из агарозных гелей» («Силекс», РФ).

Сайт-специфический гидролиз ДНК проводили при помощи эндонуклеаз рестрикции HindIII и BamHI производства «Fermentas» (Литва) или «Promega» (США) по протоколу компаний-производителей.

Лигирование гена Cp36 в вектор pJET 1.2 и плазмиду pRS316Cup-SIS-YFP осуществляли с использованием T4 ДНК-лигазы («Fermentas», Литва) по сайтам HindIII и BamHI.

Трансформацию бактерий *E. coli* (штамм DH-5α) также осуществляли по стандартной методике [Inoue et al., 1990]. Выделение плазмидной ДНК из *E. coli* осуществляли при помощи метода щелочного лизиса [Sambrook et al., 1989].

Трансформацию дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* штамма BY4742 осуществляли по стандартной методике [Rose et al., 1990] с использованием ацетата лития и с добавлением 6 мкг ДНК-носителя для повышения эффективности.

Трансформантов выращивали в течение двух суток на среде MD с добавлением меди в концентрации 100 мкМ при температуре +30°C. Трансформантов отбирали на селективной среде MD без добавления аминокислоты урацил.

2.7. Флуоресцентный анализ агрегации белков

Флуоресцентный анализ агрегации химерного белка CP36-YFP проводили при помощи микроскопа Leica DM6000B («Leica Microsystems GmBH», Германия) с программным обеспечением «Leica QWin Standart» версии 3.2.0. Для анализа флуоресценции использовали комплект «GFP» («Leica Microsystems GmBH», Германия).

2.8. Биоинформатический анализ аминокислотной последовательности

Для выявления потенциально амилоидогенных регионов белков, выявленных в протеомном скрининге, использовали программу ArchCandy [Ahmed et al., 2013] со значением scoring threshold равным 0,575 и программу Waltz с параметрами анализа Best Overall Performance Threshold и pH = 7.0 [Oliveberg, 2010].

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

В первую очередь был осуществлен сбор материала: сбор, фиксация (если требовалась) и заморозка яичников *Drosophila melanogaster*.

3.1. Связывание белка s36 с амилоид-специфичными красителями Тиофлавин S и Конго красный

Важным свойством амилоидных агрегатов является их способность связываться с амилоид-специфичными красителями, в том числе с Тиофлавином S. Краситель специфически связывается с фибриллами полноразмерного белка [Галкин и др., 2018].

Из фиксированных яичников *Drosophila melanogaster* были приготовлены криосрезы, которые были окрашены амилоид-специфичным красителем Тиофлавином S (рис.5). Связывание амилоид-специфичного красителя наблюдалось лишь при анализе структуры хориона.

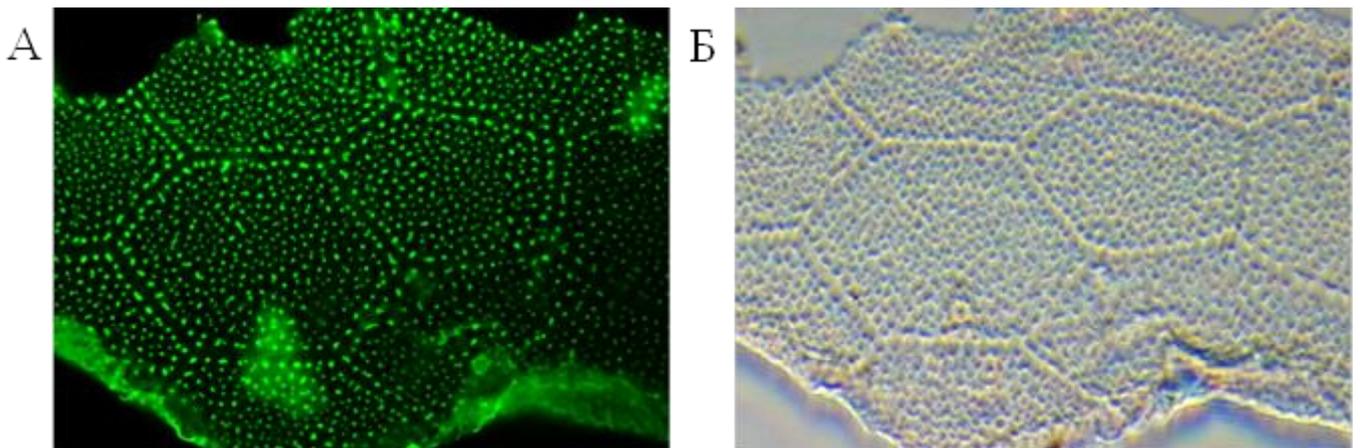


Рисунок 5. Окрашивание криосрезов яичников *Drosophila melanogaster* амилоид-специфичным красителем Тиофлавин S. А - окрашивание хориона амилоид-специфичным красителем Тиофлавином S; Б – хорион в светлом поле

При этом Тиофлавин S связывается неравномерно со всей поверхностью оболочки яйца, краситель активно связывает структуры pillars (столбики), образованные мажорным белком (или белками) хориона. Pillars – это структурный компонент хориона [Margaritis, Kafatos and Petri, 1980].

Дополнительно были проведены окрашивания криосрезов другим амилоид-специфичным-красителем Конго красный (рис.6). Конго красный окрашивает не только

амилоиды, но только при его специфическом связывании с амилоидными фибриллами наблюдается двойная рефракция в поляризованном свете [Teng and Eisenberg, 2009].

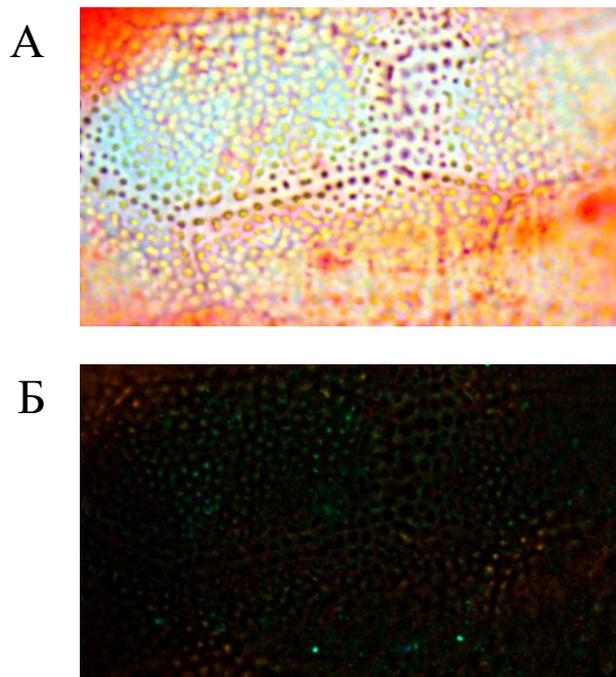


Рисунок 6. Окрашивание криосрезов яичников *Drosophila melanogaster* амилоид-специфичным красителем Конго красный. А - хорион в проходящем свете; Б – хорион в проходящем свете

Окрашивания показали, что структурный компонент хориона (pillars) также активно связывает краситель Конго красный, демонстрируя яблочно-зеленое свечение в поляризованном свете.

Таким образом, мы можем заключить, что в яичниках *Drosophila melanogaster* есть структуры, связывающие амилоид-специфичные красители Тиофлавин S и Конго красный.

3.2. Проведение протеомных скринингов (PSIA LC-MALDI) яичников *Drosophila melanogaster*

В нашей лаборатории был разработан метод протеомного скрининга амилоидов PSIA LC-MALDI, основанный на устойчивости амилоидных фибрилл к ионному детергенту SDS [Nizhnikov et al., 2014]. Метод протеомного скрининга позволяет отделять белки, формирующие высокомолекулярные амилоидоподобные агрегаты, от прочих.

После того, как стало понятно, что в яичниках *Drosophila melanogaster* есть структуры, связывающие амилоид-специфичные красители, нами было проведено два протеомных скрининга материала яичников для идентификации белков, образующих эти структуры. В результате протеомных скринингов с наибольшим счетом масс-спектрометрии были выявлены мажорные белки хориона (Таблица 2). Всего известно шесть мажорных белков и все они были выявлены во фракции детергент устойчивых агрегатов [Fakhouri et al., 2006].

Все белки хориона могут попадать во фракцию детергент-устойчивых агрегатов за счет того, что в образовании хориона принимает участие хитин, который, подобно клею, скрепляет белки и не разрушается при обработках, предусмотренных нашим методом. Для проверки был проведен дополнительный протеомный скрининг с обработкой хитиназой. Из шести мажорных белков хориона в протеомном скрининге с использованием хитиназы осталось четыре (белки s18, s16 выявлены не были), у s38 значительно уменьшился показатель счета масс-спектрометрии.

Таблица 2. Результаты протеомного скрининга *Drosophila melanogaster*

Белки	Повторность 1 Счёт масс- спектрометрии	Повторность 2 Счёт масс- спектрометрии	Протеомный скрининг после обработки хитиназой
s36	1531,6	1802,7	903,1
s19	1085,8	1015,8	654,9
s38	836,6	626,5	103,5
s15	720,1	772,1	439,5
s18	667,8	492,1	-
s16	532,1	315,1	-

Показатель «счет масс-спектрометрии» отражает степень достоверности идентификации белка и определяется масс-спектрометром автоматически по встроенному алгоритму. Этот показатель учитывает количество пептидов в последовательности идентифицированного белка, масса которых совпадает с массой пептидов, выявленных в анализе, и точность совпадения массы выявленных пептидов с теоретически ожидаемым показателем.

Таким образом, при проведении обработки хитиназой список белков-кандидатов удалось сократить до четырех белков (s38, s36, s19 и s15), формирующих устойчивые к обработке ионным детергентом агрегаты.

3.3. Биоинформатический анализ амилоидных свойств белка s36

Для дальнейшего сужения списка белков-кандидатов был применен биоинформатический анализ с использованием программы ArchCandy [Ahmed et al., 2013]. Проведенный анализ аминокислотных последовательностей четырех оставшихся после обработки хитиназой белков хориона выявил наличие потенциально амилоидогенных регионов в белках s36, s19 (рис.7).

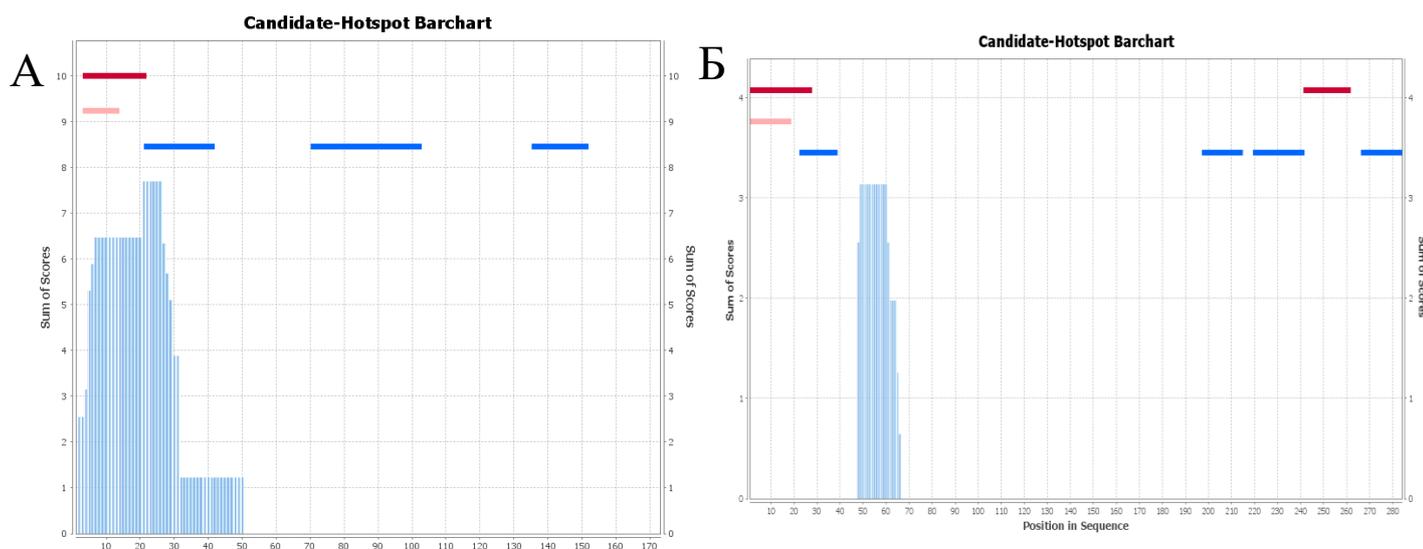


Рисунок 7. Биоинформатический анализ аминокислотной последовательности белков s19 (А) и s36 (Б) программой ArchCandy. По горизонтали – позиции в аминокислотной последовательности. По вертикали – суммарный счет для всех β -арок, предсказанных для данной точки в последовательности. Красные полосы – трансмембранные домены, предсказанные программой, синие полосы – неструктурированные регионы, предсказанные программой, розовые полосы – регион сигнального пептида, предсказанного программой.

Другой биоинформатический алгоритм Waltz [Oliveberg, 2010] также выявил в обоих белках наличие потенциально амилоидогенных регионов: 7-24 и 121-129 аминокислоты для белка s19, 8-13 и 194-199 аминокислоты для белка s36.

Результаты этого анализа Waltz отличаются от полученных ранее с помощью программы ArchCandy. Это может быть связано с тем, что биоинформатические программы основаны на разных данных об уже известных амилоидных белках и носят лишь предсказательный характер. Основываясь только на биоинформатических данных, нельзя сделать вывод об амилоидной природе белка. Однако, использование

биоинформатических алгоритмов позволило нам сузить список белков-кандидатов для дальнейшего исследования до двух наиболее перспективных: s19 и s36.

Из литературных данных известно, что в случае подавления экспрессии гена *Cr36*, кодирующего белок s36, путем РНК интерференции, нарушается структура хориона [Velentzas et al., 2017]. Кроме того, на фоне этого не формируется микропиле, что препятствует оплодотворению и в последствии приводит к стерильности мух с данной мутацией.

Так как имеются данные о функциональной значимости белка s36, именно он был выбран в первую очередь для дальнейшего анализа. Однако, белок s19 также является кандидатом, но проверка его амилоидных свойств в рамках данной работы не осуществлялась.

3.4. Анализ агрегации химерного белка CP36-YFP

Для анализа агрегации химерного белка CP36-YFP *in vivo* была сконструирована плазида pCup-CP36-YFP, обеспечивающая экспрессию гена CP36-YFP под контролем индуцибельного промотора *pCUP1*. Конструирование плазмиды pCup-CP36-YFP проводилось в несколько этапов.

Нами была получена тотальная РНК из гомогенизированной ткани яичников *Drosophila melanogaster*. На ее основе была синтезирована кДНК с использованием Taq-полимеразы и oligo (dT) в качестве затравки. Полученную кДНК использовали в качестве матрицы для амплификации интересующих фрагментов с помощью ПЦР.

Амплификацию фрагмента для встраивания в плазмиду проводили с использованием праймеров, приведенных в таблице 1 («Материалы и методы», пункт 2.6.3). Праймеры для амплификации фрагмента *Cr36* содержали рестрикционные сайты рестрикции *HindIII* и *BamHI*. После амплификации продукт ПЦР анализировали при помощи электрофореза в агарозном геле, длина амплификата соответствовала теоретически ожидаемой (*Cr36* – 810 п.н.) (рис. 8). Затем проводили выделение фрагментов из агарозного геля.

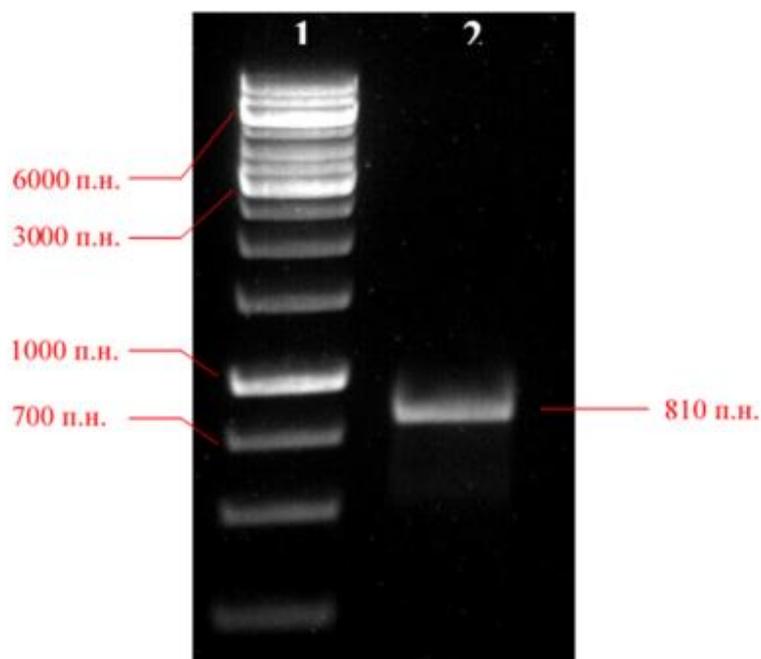


Рисунок 8. Анализ полученного фрагмента ДНК методом горизонтального гелевого электрофореза. 1 – маркер Gene Ruler 1Kb DNA Ladder, 2 – полученный фрагмент гена *Cr36*.

Выделенный из геля фрагмент и вектор *pRS316Cup-SIS-YFP* гидролизовали эндонуклеазами рестрикции *HindIII* и *BamHI*, после гидролиза выделяли из агарозного геля фрагменты *Cr36* и вектор *pRS316Cup-SIS-YFP* с делецией гена *SIS1*. Затем проводили лигирование фрагмента гена *Cr36* в плазмиду *pRS316Cup-SIS-YFP*. Наличие необходимой вставки в полученной конструкции проверяли рестрикционным анализом (рис. 9).

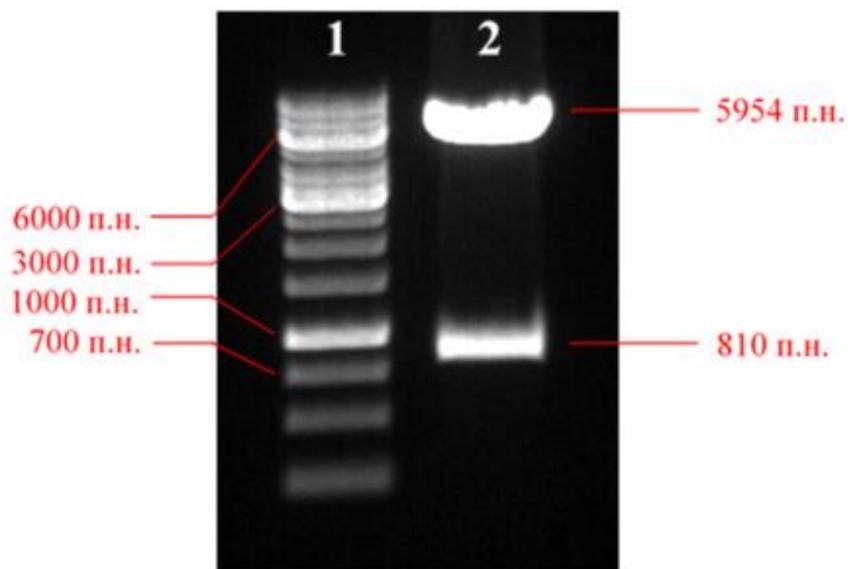


Рисунок 9. Рестрикционный анализ сконструированной плазмиды pRS316Cup-SIS-YFP. 1 – маркер Gene Ruler 1Kb DNA Ladder, 2 – плазида pCup-CP36-YFP, гидролизованная эндонуклеазами рестрикции BamHI и HindIII.

При обработке плазмиды pCup-CP36-YFP эндонуклеазами рестрикции BamHI и HindIII вырезался 1 фрагмент, по длине соответствующий теоретически ожидаемому фрагменту длиной 810 п.н.

В дальнейшем дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* штамма BY4742 были трансформированы полученной плазмидой и выращивались на твердой селективной среде с добавлением CuSO₄ в концентрации 100 мкМ при +30° С.

Анализ агрегации химерных белков у трансформантов был проведен с помощью флуоресцентной микроскопии (рис.10).

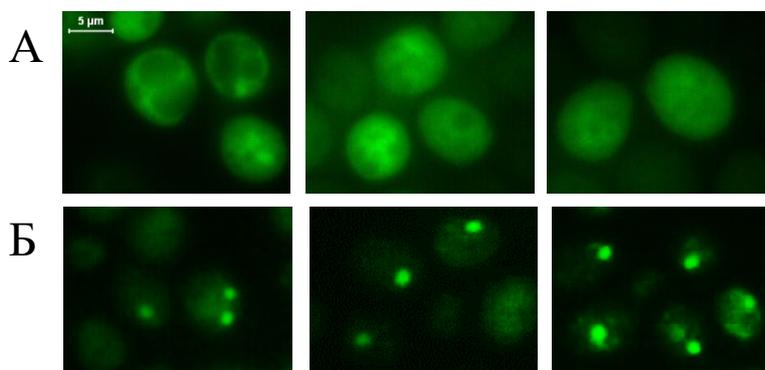


Рисунок 10. Флуоресцентная микроскопия клеток трансформантов штамма BY4742 плазмидами pCUP1-GFP и pCup-CP36-YFP при выращивании культуры клеток в течение 48 часов. А – клетки, продуцирующие флуоресцентный белок GFP (негативный контроль агрегации), Б – агрегация химерного белка CP36-YFP.

Через двое суток роста трансформантов на селективной среде мы наблюдали образование точечных агрегатов в большинстве клеток.

Таким образом, можно заключить, что гибридный белок CP36-YFP образует в клетках *Saccharomyces cerevisiae* агрегаты, детектируемые при помощи флуоресцентной микроскопии.

4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Мы показали, что белок хориона ооцитов дрозофилы s36 связывает амилоид-специфичные красители Тиофлавин S и Конго красный, формирует SDS-устойчивые агрегаты в яичниках дрозофилы, содержит амилоидогенные последовательности, предсказанные биоинформатическими алгоритмами и химерный белок CP36-YFP при сверхпродукции формирует агрегаты в клетках дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Полученные результаты демонстрируют, что исследуемый белок обладает свойствами, характерными для амилоидов. Учитывая это, а также литературные данные о роли белка s36 в формировании хориона, в том числе микропиле, мы можем рассматривать этот белок в качестве кандидата на роль функционального амилоида в ооцитах *Drosophila melanogaster*.

5. ВЫВОДЫ

1. Связывание красителей Тиофлавина S и Конго красного с хорионом яйца *Drosophila melanogaster* свидетельствует о наличии амилоидных белков в этой структуре.
2. В результате протеомного скрининга яичников *Drosophila melanogaster* во фракции белков, формирующих детергент-устойчивые амилоидоподобные агрегаты, выявлены мажорные белки хориона.
3. Белки хориона яичников дрозофилы s36 и s19, идентифицированные в ходе протеомного скрининга, содержат потенциально амилоидогенные последовательности.
4. Гибридный белок CP36-YFP образует в клетках дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* агрегаты.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Aagaard J.E., Yi X., MacCoss M.J., Swanson W.J. Rapidly evolving zona pellucida domain proteins are a major component of the vitelline envelope of abalone eggs. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2006. – Vol. 103, №46. – P. 17302–17307.
2. Ahmed A.B., Kajava A.V. Breaking the amyloidogenicity code: methods to predict amyloids from amino acid sequence. // FEBS Lett. – 2013. – Vol. 587. – №8. – P. 1089–1095.
3. Andersson M., Johansson J., Rising A. Silk spinning in silkworms and spiders. // International Journal of Molecular Sciences. – 2016. – Vol. 17 – P. 1290
4. Bastock R., Johnston D.St. *Drosophila* oogenesis. // Curr Biol. – 2008. – Vol. 18, №23. – R1082–R1087.
5. Berchowitz L.E., Kabachinski G., Walker M.R., Carlile T.M., Gilbert W.V., Schwartz T.U., Amon A. Regulated formation of an amyloid-like translational repressor governs gametogenesis. // Cell. – 2015. – Vol. 163, №2. – P. 406–418.
6. Berg C.A. Tube formation in *Drosophila* egg chambers. // Tissue Eng.: Part A. – 2008. – Vol. 14, №9. – P. 1479–88.
7. Berruti G. and Paiardi C. Acrosome biogenesis: Revisiting old questions to yield new insights. // Spermatogenesis. – 2011. – Vol. 1, №2. – P. 95–98.
8. Bleem A. and Daggett V. Structural and functional diversity among amyloid proteins: agents of disease, building blocks of biology, and implications for molecular engineering. // Biotechnol. Bioeng. – 2017. – Vol. 114, №1 – P. 7–20.
9. Boke E., Ruer M., Wühr M., Coughlin M., Lemaitre R., Gygi S.P., Alberti S., Drechsel D., Hyman A.A. and Mitchison T.J. Amyloid-like Self-assembly of a Cellular Compartment. // Cell. – 2016. – Vol. 166, №3. – P. 637–650.
10. Bontems F., Stein A., Marlow F., Lyautey J., Gupta T., Mullins M.C. and Dosch R. Bucky Ball Organizes Germ Plasm Assembly in Zebrafish. // Current Biology. – 2009. - Current Biology. – Vol. 19, №5. – P. 414–22.
11. Carneiro K.M.M., Zhai H., Zhu L., Horst J.A., Sitlin M., Nguyen M., Wagner M., Simpliciano C., Milder M., Chen C.-L., Ashby P., Bonde J., Li W., Habelitz S. Amyloid-like ribbons of amelogenins in enamel mineralization. // Sci. Rep. – 2016. – Vol. 6. – P. 23105.
12. Coustou V., Deleu C., Saupe S., Begueret J. The protein product of the het– heterokaryon incompatibility gene of the fungus *Podospira anserina* behaves as a

- prion analog. // Proc Natl Acad Sci U S A. – 1997. – Vol. 94, № 18. – P. 9773 – 9778.
13. Egge N., Muthusubramanian A., Cornwall G.A. Amyloid Properties of the Mouse Egg Zona Pellucida. // PLOS ONE. – 2015. – Vol.10, №6. – e0129907.
 14. Ephrussi A., Dickinson L.K., Lehmann R. Oskar organizes the germ plasm and directs localization of the posterior determinant nanos. // Cell. – 1991. – Vol. 66, №1. – P. 37–50.
 15. Fakhouri M., Elalayli M., Sherling D., Hall J.D., Miller E., Sun X., Wells L., LeMosy E.K.. Minor proteins and enzymes of the *Drosophila* eggshell matrix. // Dev Biol. – 2006. – Vol. 293, №1. – P. 127-41.
 16. Fowler D.M., Koulov A.V., Alory–Jost C., Marks M.S., Balch W.E., Kelly J.W. Functional amyloid formation within mammalian tissue. // PLoS Biol. – 2006. – Vol. 4, № 1. – e6.
 17. Gorkovskii A.A., Bezsonov E.E., Plotnikova T.A., Kalebina T.S., Kulaev I.S. Revealing of *Saccharomyces cerevisiae* yeast cell wall proteins capable of binding thioflavin T, a fluorescent dye specifically interacting with amyloid fibrils. // Biochemistry (Mosc). – 2009. – Vol. 74, №11. – P. 1219–1224.
 18. Guyonnet B., Egge N., Cornwall G.A. Functional amyloids in the mouse sperm acrosome. // Mol. Cell. Biol. – 2014. – Vol. 34, №14. – P. 2624–34.
 19. Haag E.S. Rolling back to BOULE. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2001. – Vol. 98, №13. – P. 6983–6985.
 20. Hamodrakas S.J., Batrinou A., Christophoratos T. Structural and functional features of *Drosophila* chorion proteins s36 and s38 from analysis of primary structure and infrared spectroscopy. // Int J Biol Macromol. – 1989. – Vol. 11, №5. – P. 307-13.
 21. Humenik M., Smith A.M., Arndt S., Scheibel T. Ion and seed dependent fibril assembly of a spidroin core domain. // J Struct Biol. – 2015. – Vol. 191, №2. – P. 130–138.
 22. Iconomidou V.A., Vriend G., Hamodrakas S.J. Amyloids protect the silkworm oocyte and embryo. // FEBS Lett. – 2000. – Vol. 479, №3. – P. 141–145.
 23. Inoue H., Nojima H., Okayama H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids // Gene. – 1990. – Vol. 96, №1. – P. 23–28.
 24. Kajava, A.V., Baxa, U., and Steven, A.C. Beta arcades: recurring motifs in naturally occurring and disease-related amyloid fibrils. // FASEB J. – 2010. – Vol. 24, №5. – P. 1311–1319.

25. Kalebina T.S., Plotnikova T.A., Gorkovskii A.A., Selyakh I.O., Galzitskaya O.V. et al, Amyloid-like properties of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall glucantransferase Bgl2p: prediction and experimental evidences. // Prion. – 2008. – Vol. 2, № 2. – P. 91-96.
26. Kim K.-S. and Gerton G.L. Differential release of soluble and matrix components: Evidence for intermediate states of secretion during spontaneous acrosomal exocytosis in mouse sperm. // Dev. Biol. – 2003. – Vol. 264, №1. – P. 141–152.
27. King O.D., Gitler A.D., Shorter J. The tip of the iceberg: RNA binding proteins with prion-like domains in neurodegenerative disease. // Brain Res. – 2012. – Vol. 1462. – P. 61–80.
28. Lee C.Y., Cantle J.P., Yang X.W. Genetic manipulations of mutant huntingtin in mice: new insights into Huntington's disease pathogenesis. // FEBS J. – 2013. – Vol. 280, № 18. – P. 4382 – 4394.
29. Li J., McQuade T., Siemer A.B., Napetschnig J., Moriwaki K., Hsiao Y.-S., Damko E., Moquin D., Walz T., McDermott A., Chan F.K.-M., Wu H. The RIP1/RIP3 Necrosome Forms a Functional Amyloid Signaling Complex Required for Programmed Necrosis // Cell. – 2012. – Vol. 150, №2. – P. 339–350.
30. Litscher E.S., Janssen W.G., Darie C.C., Wassarman P.M. Purified mouse egg zona pellucida glycoproteins polymerize into homomeric fibrils under non-denaturing conditions. // J. Cell. Physiol. – 2008. – Vol. 214, №1. – P. 153–157.
31. Louros N.N., Evangelia D.C., Baltatzis G.E., Patsouris E.S., Hamodrakas S.J., Iconomidou V.A. A common “aggregation-prone” interface possibly participates in the self-assembly of human zona pellucida proteins. // FEBS Lett. – 2016. – Vol. 590, №5. – P. 619–630.
32. Louros N.N., Iconomidou V.A., Giannelou P., Hamodrakas S.J. Structural analysis of peptide-analogues of human Zona Pellucida ZP1 protein with amyloidogenic properties: Insights into mammalian Zona Pellucida formation. // PLoS ONE. – 2013. – Vol. 8, №9. – e73258.
33. Maji S.K., Perrin M.H., Sawaya M.R., Jessberger S., Vadodaria K. et al. Functional amyloids as natural storage of peptide hormones in pituitary secretory granules. // Science. – 2009. – Vol. 325, №5938. – P. 328–332.
34. Makin S. Pathology: The prion principle. // Nature. – 2016. – Vol. 538, №7626. – P. S13–S16.
35. Margaritis L., Kafatos F., Petrij W. The eggshell of *Drosophila melanogaster*. // J. Cell Sci. – 1980. – Vol. 42 - P. 43 – 59.

36. Moreno M.J., Romero J. Sporadic Creutzfeldt–Jakob disease: phenotypic variability. // *Neurologia*. – 2002. – Vol. 17, №7. – P. 366–377.
37. Nizhnikov A. A., Antonets K.S., Inge–Vechtomov S.G. Amyloids: from pathogenesis to function. // *Biochem*. – 2015. – Vol. 80, №9. – P. 1127–1144.
38. Nizhnikov A.A., Alexandrov A.I., Ryzhova T.A., Mitkevich O.V., Dergalev A.A., Ter–Avanesyan M.D., Galkin A.P. Proteomic Screening for Amyloid Proteins. // *PLoS One*. – 2014. – Vol. 9, № 12. – e116003.
39. Oliveberg M. Waltz, an exciting new move in amyloid prediction. // *Nat Methods*. – 2010. – Vol. 7, №3. – P. 187–8.
40. Otoo H.N., Lee K.G., Qiu W., Lipke P.N. *Candida albicans* Als adhesins have conserved amyloid–forming sequences. // *Eukaryot Cell*. – 2008. – Vol.7, №5. – P. 776–782.
41. Podrabsky J.E., Carpenter J.F., Hand S.C. Survival of water stress in annual fish embryos: Dehydration avoidance and egg envelope amyloid fibers. // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol*. – 2001. – Vol. 280, №1. – R123–R131.
42. Prusiner S.B., Scott M.R. Genetics of prions // *Annu Rev Genet*. – 1997. – Vol. 31. – P. 139–175.
43. Reijo R., Lee T.Y., Salo P., Alagappan R., Brown L.G., Rosenberg M., Rozen S., Jaffe T., Straus D., Hovatta O. et al. Diverse spermatogenic defects in humans caused by Y chromosome deletions encompassing a novel RNA-binding protein gene. // *Nat Genet*. – 1995. – Vol. 10, №4. – P. 383–93.
44. Reitz C., Brayne C., Mayeux R. Epidemiology of Alzheimer disease // *Nat. Rev. Neurol*. – 2011. – Vol. 7, №3. – P. 137–152.
45. Romero D., Aguilar C., Losick R. and Kolter R. Amyloid fibers provide structural integrity to *Bacillus subtilis* biofilms. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 2010. – Vol. 107, №5. – P. 2230–2234.
46. Rose M.D., Winstone F., Hieter P. *Methods in yeast genetics* // CSHL Press. – 1990. – 198 p.
47. Ruan Q.X., Zhou P., Hu B.W., Ji D. An investigation into the effect of potassium ions on the folding of silk fibroin studied by generalized two-dimensional NMR–NMR correlation and Raman spectroscopy. // *FEBS J*. – 2008. – Vol. 275, №2. – P. 219–232.
48. 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. – Vol. 64, №2. – P. 469-478.
49. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. *Molecular cloning. A laboratory manual* // New York: Cold Spring Harbor Lab. Press. – 1989. – 1626 p.
50. Selkoe D.J. Alzheimer's disease. // *Cold Spring Harb Perspect Biol.* – 2011. - Vol. 3, № 7. –a004457.
51. Sipe J.D., Benson M.D., Buxbaum J.N., Ikeda S., Merlini G., Saraiva M.J.M., Westermark P. Nomenclature 2014: Amyloid fibril proteins and clinical classification of the amyloidosis // *Amyloid.* – 2014. – Vol. 21, №4. – P. 221–224.
52. Swevers L., Raikhel A.S., Sappington T.W., Shirk P., Latrou K. Vitellogenesis and Post-Vitellogenic Maturation of the Insect Ovarian Follicle. // *Comprehensive Molecular Insect Science.* – 2005. – Vol. 1 – P. 87-155.
53. Syed A.K. and Boles B.R. Fold modulating function: bacterial toxins to functional amyloids. // *Front Microbiol.* – 2014. – Vol. 5, №401.
54. Tardif S., Wilson M.D., Wagner R., Hunt P., Gertsenstein M., Nagy A., Lobe C., Koop B.F., Hardy D.M. Zonadhesin is essential for species specificity of sperm adhesion to the egg zona pellucida. // *J. Biol. Chem.* – 2010. – Vol. 285, №32. – P. 24863–24870.
55. Teng P.K., Eisenberg D. Short protein segments can drive a non-fibrillizing protein into the amyloid state. // *Protein Eng Des Sel.* – 2009. – Vol. 22, №8. – P. 531–536.
56. Velentzas A.D., Velentzas P.D., Katarachia S., Mpakou V.E., Papassideri I.S., Stravopodis D.J. Data of sperm-entry inability in *Drosophila melanogaster* ovarian follicles that are depleted of s36 chorionic protein. // *Data in Brief.* – 2017. – Vol. 12. – P. 180-183.
57. Vonsattel J.P. and DiFiglia M. Huntington disease. // *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* – 1998. – Vol. 57, №5. – P. 369–384.
58. Westermark G.T., Westermark P. Serum amyloid A and protein AA: molecular mechanisms of a transmissible amyloidosis. // *FEBS Lett.* – 2009. – Vol. 583, № 16. – P. 2685–2690.
59. Wu X., Tanwar P.S., Raftery L.A. *Drosophila* follicle cells: morphogenesis in an eggshell. // *Semin Cell Dev Biol.* – 2008. – Vol. 19, №3. – P. 271-82.

60. Галкин А.П., Велижанина М.Е., Сопова Ю.В., Шенфельд А.А., Задорский С.П. Прионы и неинфекционные амилоиды млекопитающих. // Биохимия. – 2018. – Том 83, №10. – с. 1476–1489.
61. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. // М.: Мир, 1984. – 480 с.

БЛАГОДАРНОСТИ

В заключение я хочу поблагодарить моего научного руководителя Алексея Петровича Галкина за руководство моей работой и возможность ее написания.

Особую благодарность выражаю Вере Александровне Синюковой за чуткое кураторство и значительный вклад в освоении мною методов, необходимых для выполнения данной научной работы.

Также благодарю весь коллектив сотрудников лаборатории физиологической генетики, особенно Татьяну Алексеевну Белашову и Юлию Викторовну Сопову, за ценные советы и помощь в постановке экспериментов.

Благодарю весь научный коллектив кафедры генетики и биотехнологии за внимание и создание творческой рабочей атмосферы.