

Санкт-Петербургский Государственный университет

Валина Анна Алексеевна

Анализ агрегации фрагментов белка VTG2 *Gallus domesticus* в дрожжевой
модельной системе

Выпускная квалификационная работа

по направлению подготовки «Биология»
основная образовательная программа бакалавриата «Биология»

Работа выполнена на кафедре
генетики и биотехнологии
биологического факультета СПбГУ

Научный руководитель:
проф., д.б.н. Галкин Алексей Петрович

Санкт-Петербург

2021

Оглавление

Список использованных сокращений	4
Введение	5
1. Обзор литературы	7
1.1. Амилоиды.....	7
1.1.1. Структурные особенности амилоидных фибрилл	7
1.1.2. Универсальные физико-химические свойства амилоидных фибрилл	9
1.2. Разнообразие амилоидов	10
1.2.1. Патологические амилоиды	10
1.2.2. Функциональные амилоиды.....	11
1.2.3. Функциональные амилоиды половых клеток.....	13
1.3. Вителлогенез у птиц.....	15
1.3.1. Стадии вителлогенеза	15
1.3.2. Состав яичного желтка птиц	18
1.4. Вителлогенин-2 – главный предшественник запасных белков яичного желтка у птиц	19
2. Материалы и методы	22
2.1. Штаммы микроорганизмов, среды и условия культивирования.	22
2.2. Генетические методы	22
2.3. Получение фрагментов гена <i>VTG2 Gallus domesticus</i>	24
2.4. Конструирование плазмид.....	25
2.5. Выделение белкового лизата из дрожжевых клеток	27
2.6. Фракционирование дрожжевого клеточного лизата	27
2.7. Белковый гель-электрофорез и Вестерн-блоттинг	28
2.8. Флуоресцентная микроскопия.....	28
3. Результаты и обсуждение	30
3.1. Биоинформатический поиск потенциально амилоидогенных последовательностей <i>VTG2</i> и получение плазмид для анализа агрегации фрагментов <i>VTG2</i> в клетках <i>S. cerevisiae</i>	30
3.2. Анализ агрегации фрагментов белка <i>VTG2</i> в клетках <i>S. cerevisiae</i> с помощью флуоресцентной микроскопии	35
3.3. Биохимический анализ агрегации фрагментов белка <i>VTG2</i> в дрожжевых клетках и анализ устойчивости агрегатов к SDS	37
4. Выводы.....	40

Список литературы	41
Благодарности	52

Список использованных сокращений

AM – акросомальная матрица

кДа – килодальтон

ЛПВП – липопротеины высокой плотности

ЛПОНП – липопротеины очень низкой плотности

мкМ – микромоль

ПААГ – полиакриламидный гель

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

Amp^R – ген устойчивости бактерий к ампициллину

GFP – Green Fluorescent Protein (зеленый флуоресцирующий белок)

LB – среда Luria-Bertani для культивирования *E. coli*

MD – дрожжевая минимальная синтетическая среда с глюкозой в качестве источника углерода

MVBs – мультивезикулярные тела

P_{CUP1} – промотор дрожжевого гена *CUP1*, активируемый добавлением ионов меди

SDS – Sodium Dodecyl Sulfate (додецилсульфат натрия)

URA3 – маркерный дрожжевой ген

VTG1 – Vitellogenin-1 (вителлогенин-1)

VTG2 – Vitellogenin-2 (вителлогенин-2)

VTG3 – Vitellogenin-3 (вителлогенин-3)

YFP – Yellow Fluorescent Protein (желтый флуоресцирующий белок)

YPD – дрожжевая питательная среда (0,5% дрожжевой экстракт, 2% бактопептон, 2% глюкоза)

Введение

Амилоиды представляют собой белковые фибриллярные агрегаты, имеющие упорядоченную межмолекулярную кросс-бета структуру. Амилоиды ассоциированы с большим количеством социально значимых амилоидозов и потому являются предметом многих клинических и фундаментальных исследований. К числу амилоидозов принадлежат нейродегенеративные болезни Альцгеймера, Паркинсона, Хангтингтона, латеральный амиотрофический склероз, прионные заболевания. Вместе с тем ежегодно появляются сведения о функциональных амилоидах, выполняющих жизненно важную роль в организме живых существ самых разных таксонов. Так, белок Curli принимает участие в образовании биопленок бактерий; гидрофобины грибов участвуют в адгезии и формировании спор (Bleem & Daggett, 2017); белок Pmel17 необходим для биогенеза и запасания меланина (Fowler et al., 2006). Помимо амилоидов выделяют амилоидоподобные белки, которые способны формировать белковые агрегаты, проявляющие некоторые из физико-химических характеристик амилоидов *in vivo* и *in vitro*.

Поиск публикаций в базе данных Pubmed по термину «amyloid» выдает две статьи за период с 1921 по 1930 гг. и около 25 тыс. за период с 2001 по 2010 гг. (Kisilevsky et al., 2016). В 2020 году число публикаций составило 7 501. Непрерывающийся лавинообразный рост числа работ, посвященных амилоидам, свидетельствует о всё возрастающем интересе к этой области исследований. По всей вероятности, на сегодняшний день охарактеризована лишь небольшая часть паталогических и функциональных амилоидов.

Ранее в нашей лаборатории были получены данные, которые позволяют выдвинуть гипотезу о существовании амилоидов в ооцитах курицы *Gallus domesticus*. Так, было показано, что амилоид-специфичный краситель Тиофлавин S окрашивает ооциты, а также клетки фолликулярного эпителия на ранней стадии развития ооцитов.

Результаты окрашивания криосрезов яичников домашней курицы дали основание для проведения протеомного скрининга амилоидоподобных белков из ооцитов курицы. Этот разработанный в нашей лаборатории метод позволяет выявить во всех тканях любых организмов белки, которые формируют паталогические и функциональные амилоидоподобные агрегаты. Метод основан на таком свойстве амилоидных фибрилл как устойчивость к ионному детергенту додецилсульфату

натрия (SDS) (Ryzhova et al., 2018). В протеомном скрининге белков, формирующих SDS-устойчивые агрегаты в ооцитах курицы, был выявлен белок Vitellogenin-2 (VTG2), выполняющий функцию главного предшественника запасных белков яичного желтка, что послужило предпосылкой для проведения дальнейших исследований.

В данной работе мы сфокусировали внимание на выявлении фрагментов белка VTG2, способных формировать детергент-устойчивые агрегаты. Для этих целей наилучшим образом подходит дрожжевая модельная система, в которой можно анализировать агрегацию гетерологичных белков, слитых с последовательностью флуоресцирующего белка, с помощью как цитологических, так и биохимических методов.

Таким образом, целью работы является анализ агрегации фрагментов белка VTG2 *Gallus domesticus* в дрожжевой модельной системе. Для решения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

1. Сконструировать плазмиды, которые продуцируют в дрожжевых клетках химерные белки, содержащие фрагменты VTG2, слитые с репортерной последовательностью флуоресцирующего белка YFP.

2. С помощью флуоресцентной микроскопии оценить способность исследуемых химерных белков формировать агрегаты в клетках дрожжей *S. cerevisiae*.

3. Провести анализ агрегации химерных белков, содержащих различные фрагменты VTG2, с помощью метода фракционирования дрожжевых клеточных лизатов.

4. Провести анализ устойчивости агрегирующих фрагментов VTG2 к обработке 1% SDS.

1. Обзор литературы

1.1. Амилоиды

1.1.1. Структурные особенности амилоидных фибрилл

Амилоиды представляют собой белковые фибриллярные агрегаты, сформированные упорядоченными межмолекулярными β -складчатыми листами. Такая структура получила название «кросс-бета». Амилоидный олигомер образуется в результате присоединения мономеров белка друг к другу за счет образования водородных связей между карбоксильными и аминогруппами аминокислот. При этом мономеры белка могут быть расположены по отношению друг к другу как в параллельной (Wickner et al., 2010), так и в антипараллельной ориентации (Gu et al., 2014). Растущие олигомеры формируют поперечно исчерченные протофибриллы, которые могут объединяться в фибриллы и формировать более крупные структуры – агрегаты. Поперечная исчерченность определяется перпендикулярным расположением мономеров белка относительно продольной оси фибриллы (Toyama & Weissman, 2011). Упорядоченность амилоидных фибрилл определяется тем, что межмолекулярные водородные связи образуют одни и те же последовательности аминокислот мономеров амилоидогенного белка (Kajava et al., 2010).

Предполагается, что последовательности, формирующие кросс-бета структуры чередуются с аминокислотными остатками, которые обеспечивают изгиб цепи (Kajava et al., 2010). Такая структура получила название β -арки. β -арки укладываются друг над другом вдоль продольной оси протофибриллы, формируя «бета-аркаду». Два β -листа формируются за счет образования водородных связей между β -цепями мономеров белка (Рисунок 1). Высокая стабильность амилоидных фибрилл может быть обусловлена также межмолекулярными ионными связями между противоположно заряженными аминокислотами в пределах β -листа (Kajava et al., 2010).

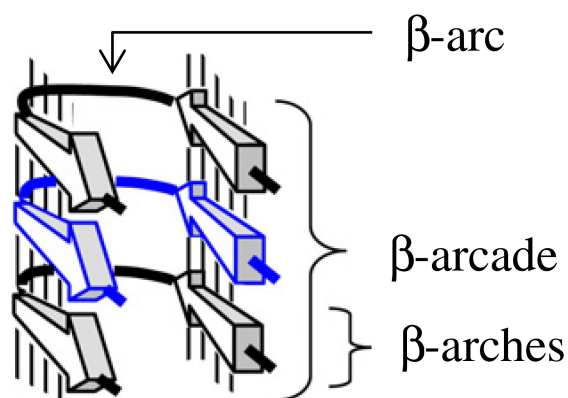


Рисунок 1. Схематичное изображение β -арочной модели укладки протофибриллы. β -цепи (обозначены стрелками) формируют два β -листа за счет межмолекулярных водородных связей (обозначены тонкими линиями) (Ahmed & Kajava, 2013).

Амилоидогенность белка определяется его аминокислотной последовательностью. В отличие от растворимых белков, в которых схожие мотивы аминокислот определяют схожесть трехмерной укладки, белки, формирующие амилоиды, сильно различаются по аминокислотной последовательности, при этом сохраняя общие структурные черты фибриллы. В случае формирования параллельной кросс-бета структуры такие гидрофобные аминокислоты как изолейцин, валин стабилизируют укладку амилоидной фибриллы, а заряженные аминокислоты аспарагин, лизин, напротив, дестабилизируют (Margittai & Langen, 2006). В настоящее время существует множество биоинформатических алгоритмов, позволяющих предсказывать способность полипептида к формированию амилоидных структур на основании анализа аминокислотной последовательности (Ahmed & Kajava, 2013; Ahmed et al., 2015). Однако в основе данных алгоритмов лежит предположение, что короткой последовательности, всего из шести аминокислотных остатков, достаточно для амилоидогенеза исследуемого белка (Ahmed & Kajava, 2013), в то время как все известные на сегодняшний день амилоидогенные белки имеют амилоидогенный регион длиной более 15 аминокислотных остатков (Saveanu et al., 2002). В связи с этим многие из алгоритмов выдают большое число ложноположительных результатов при анализе последовательностей белков длиной более 30-40 аминокислотных остатков (Ahmed & Kajava, 2013). Очевидно, что к результатам биоинформатических предсказаний стоит относиться с большой осторожностью и использовать их только в качестве вспомогательного инструмента при исследовании белка.

1.1.2. Универсальные физико-химические свойства амилоидных фибрилл

Все известные к настоящему моменту амилоиды обладают рядом универсальных физико-химических характеристик (по: Галкин и др., 2018):

1) Связывание фибрилл белка или его фрагментов с амилоид-специфичным красителем Конго красным *in vivo*, вследствие чего наблюдается двойное лучепреломление в поляризованном свете.

2) Связывание фибрилл полноразмерного белка *in vivo* с красителями Тиофлавином S и Тиофлавином T.

3) Устойчивость агрегатов белка к обработке ионными детергентами, например SDS.

4) Поперечная исчерченность фибрилл, наблюдаемая в экспериментах *in vitro*.

5) Способность протофибрилл к автокаталитическому росту за счет присоединения новых мономеров белка.

Стоит отметить, что почти все вышеперечисленные критерии не являются абсолютными для определения амилоидной природы белка *in vivo*. Так, повышенной устойчивостью к ионным детергентам обладают и другие белковые комплексы и агрегаты, не являющиеся амилоидными (Ryzhova et al., 2018; Xia et al., 2016), а красители Тиофлавины T и S не обладают строгой специфичностью к кросс-бета структурам и могут связываться с не амилоидными белками (Wolfe et al., 2010). Однако основным критерием, на который стоит опираться при идентификации амилоидных характеристик исследуемого белка, является связывание с амилоид-специфичным красителем Конго красным и двойное лучепреломление в поляризованном свете при связывании с ним (по: Sergeeva & Galkin, 2020). Остальные характеристики могут рассматриваться скорее как дополнительные свидетельства в пользу амилоидной природы белка.

К настоящему моменту описано большое количество белков, которые формируют амилоидоподобные агрегаты. Под этим термином подразумеваются белковые агрегаты, проявляющие некоторые, но не все из вышеперечисленных характеристик *in vivo* и *in vitro*. Такие белки представляют собой интерес как потенциальные кандидаты на роль функциональных амилоидов.

1.2. Разнообразие амилоидов

1.2.1. Патологические амилоиды

История изучения амилоидов началась с обнаружения гомогенных тканевых отложений, демонстрировавших специфическое окрашивание и связанных с рядом патологических состояний, которые позднее были названы амилоидозами (по: Vuxbaum & Linke, 2012). В зависимости от происхождения патологические амилоидозы можно разделить на три группы: инфекционные, генетически обусловленные и спорадические (Galkin & Sysoev, 2021). Классификацию также можно проводить в зависимости от локализации амилоидных агрегатов в организме: при системных амилоидозах накопление амилоидных фибрилл затрагивает различные органы и ткани, а при локальных – определенный их вид (Benson et al., 2020).

Среди системных амилоидозов наиболее распространен амилоидоз легких цепей иммуноглобулинов: в западных странах частота встречаемости заболевания составляет один случай на 100 тыс. человек в год (Dispenzieri et al., 2012). Неправильная укладка тяжелых, в частности γ - или μ -, цепей иммуноглобулинов также может приводить к амилоидозам (Picken, 2007). Системные амилоидозы могут также вызываться сверхэкспрессией генов $\beta 2$ -микроглобулина, лейкоцитарного хемотаксического фактора-2, аполиipoproteинов А и С (Benson et al., 2008; Bergström et al., 2004; Gejyo et al., 1985; Liapis et al., 2019).

Безусловно, наиболее известным классом локальных амилоидозов являются нейродегенеративные заболевания, такие как болезнь Альцгеймера, связанная с накоплением внеклеточных агрегатов амилоидного пептида β ($A\beta$) и внутриклеточных агрегатов белка tau; болезнь Паркинсона, ассоциированная с образованием в нейронах дофаминовой системы телец Леви – крупных амилоидных агрегатов, основным компонентом которых является α -синуклеин; хорей Хантингтона, спиноцеребральная атаксия, связанные с формированием полиглутаминовых трактов в белках Htt и атаксинах за счет экспансии повторов CAG (Glennner & Wong, 1984; Polymeropoulos et al., 1997; Saunders & Bottomley, 2009).

Всего к настоящему моменту охарактеризовано около 40 амилоидозов, из которых 18 относятся к системным патологиям, а 22 – к локальным (Benson et al., 2020). Важно отметить, что почти все амилоидозы на сегодняшний день неизлечимы, а некоторые из них характеризуются высокой частотой встречаемости. По данным

Brookmeyer с соавторами (2011), распространенность болезни Альцгеймера достигает 37,2% среди людей, достигших 90 лет. В связи с увеличением средней продолжительности жизни повышается частота возникновения нейродегенеративных заболеваний. Очевидно, подобные тенденции порождают острую необходимость в изучении фундаментальных аспектов биологии амилоидов, а также разработке методов диагностики и лечения амилоидозов.

1.2.2. Функциональные амилоиды

Хотя термин «амилоид» изначально ассоциировался исключительно с патологическими накоплениями фибриллярных белков, всё больше появляется данных о функциональных амилоидах – белках, регулирующих физиологически важные процессы в агрегированном амилоидном состоянии. Функциональные амилоиды найдены у организмов, относящихся к большому числу таксономических групп, от бактерий до млекопитающих. Потенциальное эволюционное преимущество белков амилоидной природы может быть обусловлено устойчивостью к протеолизу, способностью к автокаталитическому росту фибрилл и их эластичностью и механической прочностью (Mason & Shimanovich, 2018; Maury, 2009).

Функциональные амилоиды микроорганизмов в основном представляют собой внеклеточные структуры. У прокариот, в частности у кишечных бактерий, были обнаружены функциональные амилоиды курлины (Curli), которые являются частью внеклеточного матрикса, играющего роль в образовании биопленок, регуляции адгезии к клеткам хозяина и инвазии (Barnhart & Chapman, 2006; Cherny et al., 2005). Другим примером функциональных амилоидов бактерий являются секретлируемые белки чаплины (Chaplins). У *Streptomyces coelicolor* чаплины образуют гидрофобную пленку на поверхности воздушного мицелия, необходимого для формирования спор. Амилоидоподобные фибриллы чаплина ChpD-H облегчают преодоление воздушными гифами поверхностного натяжения воды и рост в воздушной среде, а также способствуют адгезии к гидрофобным субстратам (de Jong et al., 2009). Схожей функцией обладают гидрофобины мицелиальных грибов: SC3 у *Schizophillum commune* и EAS у *Neurospora crassa* (Mackay et al., 2001; Wessels, 1997; Wösten, 2001). Амилоиды и амилоидоподобные белки присутствуют также и в клеточной стенке грибов. Так, некоторые амилоидные свойства были показаны экспериментально для целого ряда белков клеточной стенки дрожжей *S. cerevisiae* (Bgl2, Ygp1, Gas1, Flo1, Muc1 и Toh1) (Kalebina et al., 2008; Ramsook et al., 2010;

Ryzhova et al., 2018). Клеточная стенка *S. cerevisiae* связывает Конго красный и другие амилоид-специфичные красители. Кроме того, в клеточных стенках возбудителя оппортунистических инфекций человека *Candida albicans* был обнаружен белок Als5, амилоидоподобные домены которого, по-видимому, запускают адгезию к эпителиальным клеткам хозяина (Otoo et al., 2008). Предполагаемыми причинами столь сильной обогащенности клеточной стенки белками, способными к амилоидогенезу, являются прочность и эластичность амилоидных фибрилл, а также возможность придания клеточной стенке дополнительной лабильности за счет обратимой сборки амилоидных фибрилл в ответ на изменяющиеся условия среды (по: Sergeeva et al., 2019).

У высших эукариот, помимо внеклеточных амилоидных и амилоидоподобных структур, в основном выполняющих защитную функцию, были обнаружены белки, образующие внутриклеточные амилоидные и амилоидоподобные агрегаты. Фрагмент белка Pmel17 образует амилоидные фибриллы, которые необходимы для полимеризации реактивных цитотоксических малых молекул в меланин – пигмент, защищающий клетки от окислительного стресса и УФ излучения (Fowler et al., 2006). Амилоидные свойства также были показаны для белка FXR1, который регулирует стабильность и трансляцию мРНК в нейронах млекопитающих и участвует в формировании долговременной памяти (Sorova et al., 2019). В последнем процессе, а также в поддержании стабильности синаптических связей важную роль играют также олигомеры белка CREB у *Aplysia californica* и его ортологов CREB-3 у мыши и Orb2 у *Drosophila melanogaster*. Олигомеры этих белков, подобно классическим амилоидам, проявляют устойчивость к обработке SDS (Fioriti et al., 2015; Krüttner et al., 2012; Si et al., 2010). Вместе с тем окрашивание Тиофлавином S для олигомеров CREB было показано только *in vitro* и при сверхэкспрессии в нейронах (Si et al., 2010). Четкие доказательства амилоидных свойств *in vivo* получены только для белка Orb2 дрозофилы (Hervas et al., 2020).

Важно отметить, что укладка белка в виде амилоидных фибрилл может быть функциональна и в плане его запасаения. Было показано, что пептидные и белковые гормоны гипофиза (вазопрессин, окситоцин, β -эндорфин и др.) запасаются в секреторных гранулах в форме амилоидных агрегатов, сохраняя при этом способность высвобождать функциональные мономеры (Maji et al., 2009). Амилоидные свойства *in vivo* и *in vitro* были показаны для вицилина, запасного белка семян бобовых, в частности гороха *Pisum sativum L.* Амилоидные агрегаты вицилина

аккумулируются в белковых тельцах во время созревания семян и разбираются по мере их прорастания, поставляя эмбриону питательные вещества. Кроме того, вицилины, принадлежащие к группе лектинов, участвуют в защите семян от патогенов, в первую очередь грибов и насекомых (Antonets et al., 2020).

1.2.3. Функциональные амилоиды половых клеток

Примечательно, что первым описанным функциональным амилоидом был белок оболочки гамет. Было показано, что хорион оболочки яиц тутовых шелкопрядов *Antheraea polyphemus* и *Bombyx mori*, состоящий из белков на 95% от сухого веса, окрашивается Конго красным и при этом демонстрирует двойное лучепреломление (Iconomidou et al., 2000; Iconomidou & Hamodrakas, 2008). В хорионе *Antheraea polyphemus* было обнаружено около 200 белков, на основании структуры подразделяемых на два класса: А и В (Kafatos et al., 1977; Regier & Kafatos, 1985). Для всех белков характерна трехдоменная структура, в которой центральный домен консервативен в пределах класса и демонстрирует амилоидогенные свойства в экспериментах *in vitro* (Hamodrakas et al., 1982; Iconomidou & Hamodrakas, 2008).

Амилоиды обеспечивают защитную функцию оболочек яиц также у позвоночных животных. Амилоидные структуры были обнаружены в составе желточной оболочки яиц костистых рыб *Austrofundulus limnaeus* (Podrabsky et al., 2001). Онтогенез представителей этого вида проходит в условиях периодического иссушения водоемов, при которых выживание эмбрионов обеспечивается предотвращением испарения воды через оболочку. Авторы обнаружили, что гомогенаты оболочки эмбрионов окрашиваются Конго красным и демонстрируют двойное лучепреломление в поляризованном свете после окрашивания. Также фибриллярная структура агрегатов была подтверждена трансмиссионной электронной микроскопией.

Предполагается, что амилоидогенные белки желточной оболочки *A. limnaeus* гомологичны ZP белкам млекопитающих (ZP1, ZP3, ZP4), способным к полимеризации в высоко упорядоченные структуры типа фибрилл за счет наличия ZP домена (Jovine et al., 2005; Litscher & Wassarman, 2018). ZP белки млекопитающих содержатся в гликопротеиновой оболочке яйцеклетки, получившей название zona pellucida или блестящая оболочка. Egge с соавторами (2015) показали, что все три белка ZP у мыши (ZP1, ZP2, ZP3) проявляют амилоидные свойства в экспериментах

in vitro. С помощью биоинформатических алгоритмов было показано наличие множества потенциально амилоидогенных регионов в отвечающем за полимеризацию С-терминальном домене белков ZP. Это может быть необходимо для образования гетеродимерных комплексов ZP1-ZP3 и ZP2-ZP3, формирующих в конечном счете сложный гетерополимерный матрикс ZP. Кроме того, авторы предполагают, что функция некоторых амилоидогенных регионов заключается в перестройке фибрилл после оплодотворения для создания физического барьера, препятствующего полиспермии. Стоит добавить, что некоторые амилоидные свойства были показаны также для белков zona pellucida человеческих ооцитов (Pimentel et al., 2019).

Амилоидоподобные структуры также были обнаружены и в мужских половых клетках. Важным этапом оплодотворения является акросомальная реакция – экзоцитоз гидролитических ферментов акросомального пузырька сперматозоида, в результате чего происходит разрушение желточной оболочки ооцита и проникновение сперматозоида. Помимо растворимой фракции в состав акросомы входит и нерастворимая акросомальная матрица (AM), которая служит каркасом, контролирующим высвобождение AM-ассоциированных белков в ходе акросомальной реакции (Hardy et al., 1991).

К настоящему моменту было показано, что в состав AM входят SDS-устойчивые агрегаты, которые связываются с конформационно-специфичными антителами к амилоидным олигомерам (Guyonnet et al., 2014). В состав AM входит ряд белков, ассоциированных с амилоидозами, и тех, для которых были предсказаны амилоидогенные свойства *in silico* (Guyonnet et al., 2014). Присутствие в этом списке белков, связывающихся с zona pellucida (zonadhesin (ZAN), рецептор ZP (ZP3R)) позволяет выдвинуть гипотезу о существовании амилоид-амилоидных взаимодействий, лежащих в основе взаимодействия сперматозоида и zona pellucida ооцита (Egge et al., 2015; Guyonnet et al., 2014).

Приведенные данные позволяют предположить, что фибриллярные структуры в составе оболочек яйца могут обеспечивать защиту от механического разрушения, действия протеаз и гидролаз при проникновении сперматозоида, видоспецифическое узнавание сперматозоида и служить барьером от полиспермии, микробов, растворов низкомолекулярных веществ и даже воды (Egge et al., 2015; Podrabsky et al., 2001).

Накопленные к настоящему моменту данные открывают новые перспективы для изучения ооцитов и их оболочек у представителей других таксономических

групп с точки зрения присутствия в них функциональных амилоидов или амилоидоподобных белков. Поскольку в данной работе мы сконцентрировали свое внимание на изучении белков ооцитов птиц, в частности на белке домашней курицы Vitellogenin-2, следующие разделы литературного обзора будут посвящены описанию вителлогенеза у птиц и роли вителлогенина в этом процессе.

1.3. Вителлогенез у птиц

1.3.1. Стадии вителлогенеза

Ооциты, богатые желтком, формируются у животных, чей зародыш не способен питаться самостоятельно в течение длительного времени. Вителлогенез или желткообразование является необходимым этапом созревания ооцитов у всех птиц. В ходе вителлогенеза происходит многократное увеличение размеров фолликулов яичника за счет активного поступления в них больших количеств предшественников белков и липидов, служащих энергетическим ресурсом для дальнейшего развития эмбриона. Масса запасаемых триглицеридов составляет около 5 г, а запасаемых белков – около 12 г (Nimpf & Schneider, 1998). Кроме того, желток служит источником витаминов (А, D, Е, В1, В2, В3, В5, В6, В8, В12), минералов (фосфор, кальций, калий) и микроэлементов (медь, цинк и др.) и обеспечивает первичную иммунную защиту за счет материнских иммуноглобулинов класса Y (по: Réhault-Godbert & Guyot, 2018).

Длительный многоэтапный процесс оогенеза у птиц проходит в яичниках и яйцеводах. Схематично процесс формирования яиц у птиц изображен на рисунке 2. В яичниках происходит синтез половых стероидных гормонов, гаметогенез, вителлогенез и образование перивителлиновой мембраны (второго слоя желточной оболочки), в то время как экстравителлиновая мембрана (третий слой желточной оболочки), белок яйца, подскорлуповые оболочки и сама скорлупа образуются в различных отделах яйцевода по мере продвижения по нему зрелого ооцита после овуляции (по: Réhault-Godbert & Guyot, 2018).

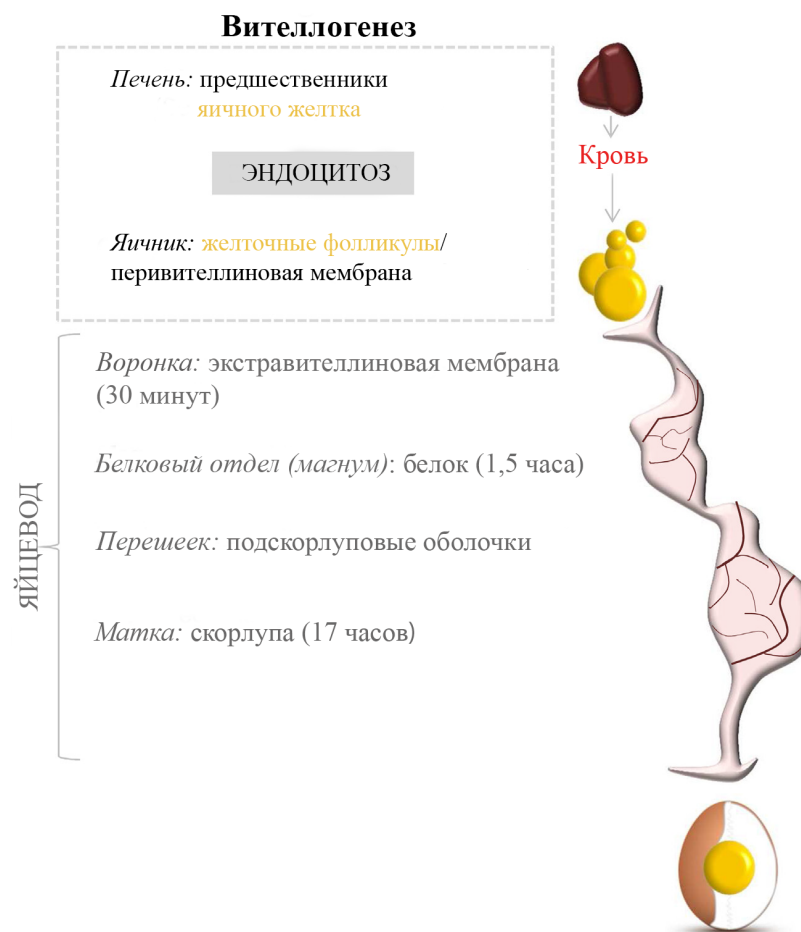


Рисунок 2. Формирование яйца у домашней курицы (Réhault-Godbert & Guyot, 2018).

Рассмотрим подробнее гистологическое строение фолликула яичника птиц (Рисунок 3). Ооцит окружен одиночным слоем фолликулярных клеток гранулёзы. Между ооцитом и клетками гранулёзы расположена пористая неклеточная структура, *zona radiata*, образованная фолликулярными клетками (Perry & Gilbert, 1979). *Zona radiata* пронизана многочисленными тонкими канальцами, через которые отростки протоплазмы фолликулярных клеток идут навстречу микроворсинкам ооцита. Это обеспечивает активный транспорт предшественников желтка в ооцит до овуляции (Wyburn et al., 1965). Толстая базальная мембрана отделяет гранулёзные клетки от поддерживающих тканей внутренней и наружной теки, пронизанных капиллярами (Perry & Gilbert, 1979).

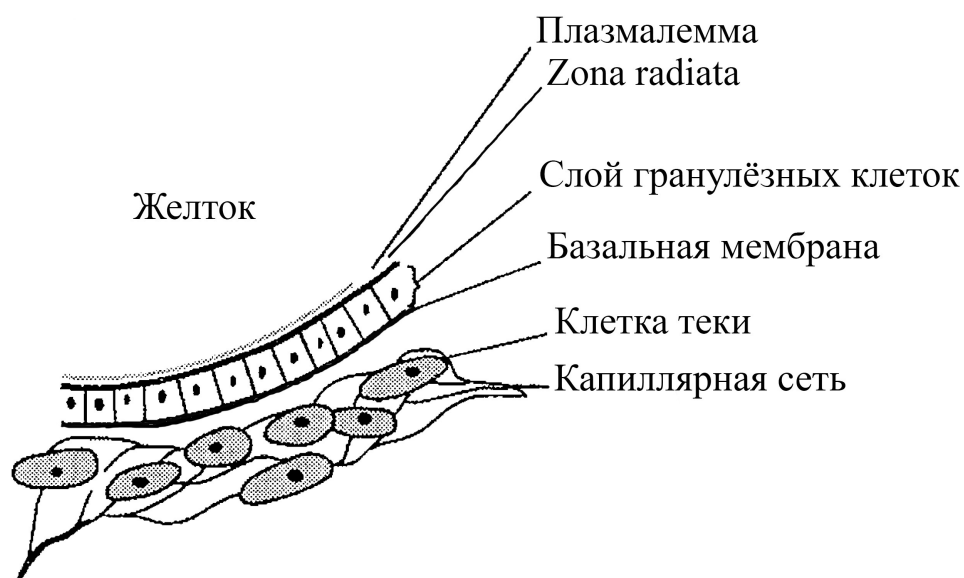


Рисунок 3. Строение фолликула домашней курицы (Wishart & Horrocks, 2000).

Вителлогенез можно подразделить на два этапа, отличающихся количеством и биохимической природой запасаемых веществ. Первый этап происходит в ходе малого роста ооцитов и включает накопление первичного желтка более светлого цвета, из-за чего он получил название «белый» желток. В период большого роста ооцитов в цитоплазме начинает накапливаться вторичный «желтый» желток. «Белый» желток содержит больше белков и меньше липидов, по сравнению с «желтым» желтком, и всего 10-13% нерастворимых веществ (Gilbert, 1979). Желток откладывается либо непосредственно под клетками гранулёзы, либо под zona radiata. Таким образом постепенно формируется желточный мешок, окруженный трехслойной желточной оболочкой и выполняющий функции поглощения, процессинга и транспортировки питательных веществ желтка к эмбриону (по: Yadgary et al., 2014).

У домашней курицы *Gallus domesticus* с наступлением половой зрелости (в возрасте около 16 недель) под действием эстрогена в печени начинается усиленный синтез предшественников белков и липидов яичного желтка, которые затем секретируются в кровь. Липиды транспортируются к яичнику в составе липопротеинов очень низкой плотности (ЛПОНП). Коровая часть ЛПОНП представлена триглицеридами и эфирами холестерина, а поверхность – монослоем фосфолипидов с включениями холестерина и апопротеинов (в основном аполипопротеина В и аповителлина-1 или аполипопротеина VLDL-II). Последний, являясь ингибитором липаз, обеспечивает стабильность ЛПОНП в процессе

транспортировки к фолликулу. Однако не все компоненты будущего желтка синтезируются в печени: иммуноглобулины IgY синтезируются плазматическими клетками иммунной системы (по: Réhault-Godbert & Guyot, 2018).

Предшественники желтка транспортируются по кровотоку к созревающим фолликулам и диффундируют через фенестрированные капилляры к базальной мембране клеток гранулёзы (Gilbert, 1979; Etches, 1996). В ходе малого роста фолликулов предшественники «белого» желтка могут пересекать слой клеток гранулёзы по механизмам трансцитоза и в меньшей степени парацеллюлярного транспорта. Однако при последующих этапах вителлогенеза транспорт белков и липопротеинов «желтого» желтка в ооцит затруднен наличием плотных контактов между клетками гранулёзы. Экспрессия окклюдина, белка, образующего плотные контакты, регулируется фолликул-стимулирующим гормоном и активином (членом надсемейства TGF- β). Уровень окклюдина постепенно снижается в процессе роста фолликулов, тем самым позволяя большим количествам питательных веществ пересечь слой клеток гранулёзы в направлении ооцита. Далее предшественники постепенно проникают в созревающий фолликул путем рецептор-опосредованного эндоцитоза, после чего процессируются в функциональные белки с помощью эндогенных протеаз желтка. После откладки яиц питательные вещества из желточного мешка постепенно ассимилируются эмбрионом (по: Réhault-Godbert & Guyot, 2018).

1.3.2. Состав яичного желтка птиц

Яичный желток птиц представляет собой сложное образование, компоненты которого распределены между фракциями нерастворимых агрегатов неправильной формы (гранулами) и прозрачной желтой жидкости (плазмы) (Burley & Cook, 1961). Гранулы, составляя 19-23% от сухого веса желтка, содержат всего около 7% липидов желтка и в основном белки желтка, в частности липовителлины в составе липопротеинов высокой плотности (ЛПВП) (70%) и фосвитины (16%). В состав плазмы (77-81% от сухого веса) преимущественно (85%) входят липопротеины низкой плотности (аполипопротеин В и аповителлин-1 в качестве мажорных компонентов), а также растворимые белки (15%), такие как иммуноглобулины, сывороточный альбумин и овальбумин (Anton & Gandemer, 1997).

Mann и Mann (2008) провели протеомный анализ гранулярной и растворимой фракций яичного желтка домашней курицы с помощью метода жидкостной

хроматографии с tandemной масс-спектрометрией. Среди наиболее представленных белков были обнаружены сывороточный альбумин, продукты протеолиза вителлогенина, аповителлины, иммуноглобулины IgY, овальбумин и сывороточный белок с перекрестной реактивностью с β 2-микроглобулином. В меньших количествах были идентифицированы протеазы нотепсин и тромбин, антиокислительные ферменты, такие как супероксиддисмутаза и глутатионпероксидаза, биотин- и рибофлавин-связывающие белки, α 2-макроглобулин, С3 компонент каскада комплемента.

1.4. Вителлогенин-2 – главный предшественник запасных белков яичного желтка у птиц

Протеомный анализ яичного желтка *Gallus domesticus* показал, что в составе нерастворимых желточных гранул в большой концентрации содержится белок вителлогенин-2 (VTG2) (Mann & Mann, 2008). Его гомологи, вителлогенин-1 (VTG1) и вителлогенин-3 (VTG3), были найдены в нерастворимой фракции в значительно меньших количествах. При дальнейшем описании молекулярных процессов вителлогенеза подразумевается, что ключевую роль среди всех вителлогенинов играет именно VTG2 как мажорный компонент желтка.

VTG1 и VTG2 являются высокомолекулярными гликопротеинами (Mr ~200 кДа), содержащими четыре домена: липовителлин-1, липовителлин-2, высоко фосфорилированный фосвитин и пептид YGP42 или YGP40 из 42 и 40 аминокислот, соответственно для VTG1 и VTG2. VTG3, напротив, имеет небольшую молекулярную массу (Mr ~38 кДа) и содержит в составе исключительно домен фосвитина.

Активная экспрессия генов вителлогенинов запускается при воздействии эстрогена на гепатоциты печени половозрелой курицы (Williams et al., 1979). При этом уровень экспрессии генов *VTG* увеличивается примерно в 30-40 раз (Bourin et al., 2012).

Данные относительно транспорта VTG по кровотоку разнятся. В ряде работ (Hermsdorf et al., 1979; Wallace, 1985) предполагается, что вителлогенин транспортируется к ооцитам в растворимой форме нековалентно образованного димера в комплексе с кальцием. Другим возможным механизмом доставки VTG к созревающим ооцитам является транспорт в составе частиц ЛПОИП и ЛПВП (Bourin et al., 2012; Mann & Mann, 2008).

На ранних этапах развития фолликула VTG может свободно диффундировать между фолликулярными клетками и поглощаться ооцитом. Позднее активный транспорт ЛПОНП ограничивает этот процесс. Существует гипотеза, что в транспорте VTG участвуют трансомы или тельца обкладки (lining bodies) – электронно-плотные структуры, ассоциированные с частицами, подобными рибосомам, и мембранами. Тельца обкладки способствуют выпячиванию латеральных клеточных мембран фолликулярных клеток, что сужает просвет между ними. Скоординированное перемещение телец обкладки двух соседних клеток по направлению к ооциту как бы выталкивает VTG из интерстициального пространства к перивителлиновому пространству ооцита. (Ito et al., 2003; Zarnescu, 2004). Предполагается, что второстепенным механизмом в транспорте VTG через слой клеток гранулёзы служит рецептор-опосредованный эндоцитоз. Было показано, что длинный сплайс-вариант рецептора LR8 экспрессируется в клетках гранулёзы на стадии большого роста ооцита (Nimpf & Schneider, 1998).

Поглощение VTG ооцитом осуществляется также по механизму рецептор-опосредованного эндоцитоза (Shen et al., 1993). Главную роль в этом процессе играет укороченная форма (без O-связанного сахарного домена) рецептора LR8, активно экспрессирующаяся в ооците. Связывание VTG с рецептором и его интернализация опосредуются липовителлином (продуктом протеолитического процессинга вителлогенина) (Nimpf & Schneider, 1998; Réhault-Godbert & Guyot, 2018). В фолликулах на стадии малого роста LR8 локализуется в цитоплазме ооцита, в то время как вителлогенины находятся в фолликулярных клетках и клетках теки. Затем происходит перемещение рецептора в плазматическую мембрану ооцита, что приводит к быстрому поглощению компонентов желтка (Johnson & Woods, 2007; Peromuceno et al., 2015).

Эндоцитированный VTG диссоциирует от рецепторов благодаря закислению везикулы. В зрелых ооцитах везикулы сливаются с лизосомами, содержащими неактивный катепсин Д – проэнзим эндогенной аспарагиновой протеазы (Burley et al., 1993; Retzek et al., 1992). В результате образуются мультивезикулярные тела (MVBs). Мембранная вакуолярная АТФаза, выполняя роль протонной помпы, закисляет люмен (внутривезикулярное пространство) MVBs до оптимального значения pH 5.2-5.6, тем самым активируя катепсин Д, который разрезает VTG в специфических сайтах узнавания с образованием зрелых продуктов: липовителлина-

1 (Mr ~110 кДа), липовителлина-2 (Mr ~30 кДа), фосвитина (Mr 37-45 кДа) и пептида YGP40 (Elkin et al., 1995; Yamamura et al., 1995).

Липовителлины и фосвитины выступают в качестве основных компонентов гранул желтка. Они образуют сложные комплексы с ионами железа и кальция. Пептид YGP40, напротив, является мажорным компонентом плазмы желтка, высвобождаясь до образования липовителлин-фосвитинового гранулярного комплекса (Yamamura et al., 1995). Высоко фосфорилированные фосвитины секвестрируют и запасают кальций, железо и другие катионы из кровотока, переводя их в желток для дальнейшего снабжения развивающегося эмбриона минералами. Липовителлины – это липид-связывающие белки, чья функция обеспечить зародыш липидами (по: Réhault-Godbert & Guyot, 2018).

К настоящему моменту показано, что клетки гранулёзы и значительная часть цитоплазмы ооцита *Gallus domesticus* на ранних стадиях развития окрашиваются Тиофлавином S, но не Конго Красным (Siniukova et al., 2020). Наиболее перспективным кандидатом на роль амилоидоподобного белка ооцитов курицы является вителлогенин-2, выявленный в протеомном скрининге (Синюкова и др., неопубликованные данные). Рассмотрение VTG2 в качестве амилоидоподобного белка представляет собой особый интерес ввиду того, что продукты его протеолиза, липовителлины и фосвитины, являются мажорными компонентами нерастворимых желточных гранул. Ранее не проводилось исследование устойчивости продуктов протеолиза VTG2 к обработке ионными детергентами. Потому в рамках данной работы были поставлены задачи изучить способность доменов VTG2 к агрегации и их устойчивость к SDS.

2. Материалы и методы

2.1. Штаммы микроорганизмов, среды и условия культивирования

Для клонирования фрагментов *VTG2* и наработки плазмид был использован штамм бактерии *Escherichia coli* DH5 α ($F^-endA1\ glnV44\ thi-1\ recA1relA1\ gyrA96\ deoR\ nupG\ purB20\ \phi80dlacZ\ \Delta M15\ \Delta(lacZYA-argF)U169,$ $hsdR17(r_K^-m_K^+), \lambda^-$) (Hanahan, 1985). Для продукции фрагментов белка *VTG2*, слитых с желтым флуоресцирующим белком (YFP), был использован штамм дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* BY4742 ($MAT\alpha\ his3\Delta1\ leu2\Delta0\ lys2\Delta0\ ura3\Delta0\ [psi^-][PIN^+]$) (Brachmann et al., 1998).

Культивирование бактерий проводили при температуре +37 °C на твердой полной питательной среде Luria-Bertani (LB) (Sambrook et al., 1989). Селекция трансформантов, устойчивых к ампициллину, производилась на среде LB с добавлением ампициллина в концентрации 50 мкг/мл.

Для выращивания дрожжей использовали стандартные культуральные среды: полную среду (YPD), жидкие и твердые минимальные среды с глюкозой в качестве источника углерода (MD) (Kaiser et al., 1994). Селекцию ауксотрофных дрожжей, трансформированных плазмидами, несущими маркерный ген *URA3*, проводили на среде MD с добавлением витаминов, макроэлементов, гистидина, лейцина и лизина в соответствии с генотипом штамма *S. cerevisiae* BY4742. Для экспрессии химерных генов под контролем промотора дрожжевого гена *CUP1*, активируемого добавлением ионов меди (P_{CUP1}), в среду MD добавляли раствор $CuSO_4$ в конечной концентрации 100 мкМ. Культивирование дрожжевых трансформантов проводили при температуре +30 °C.

2.2. Генетические методы

Химическая трансформация бактерий *E. coli* плазмидной ДНК осуществлялась по стандартной методике (Inoue et al., 1990). Обработанные хлоридом кальция компетентные клетки бактерий инкубировали в течение 20 минут на льду с реакционной лигазной смесью или с выделенными ранее готовыми плазмидами для их размножения в клетках *E. coli*. Затем пробирку помещали в водяную баню «WB-4MS» («BioSan», Латвия) с температурой +42 °C на 45 секунд (термошок), что обеспечивало проникновение плазмидной ДНК в клетки. После этого в пробирку

добавляли 300 мкл жидкой среды LB и инкубировали в сухом термостате «ТС-1/80 СПУ» («СКТБ СПУ», Россия) при +37 °С в течение часа для подращивания бактерий. Далее клетки рассеивали на чашки Петри с селективной агаризованной средой LB, содержащей ампициллин.

Для выделения плазмидной ДНК из бактерий *E. coli* применяли метод щелочного лизиса (Birnboim & Doly, 1979). Клетки бактерий выращивали на чашках с агаризованной средой LB с добавлением антибиотика в течение ночи при температуре +37 °С. Трансформированные клетки бактерий ресуспендировали в 100 мкл холодного раствора (50 мМ глюкоза, 10 мМ этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА), 25 мМ Tris-HCl). Далее лизис мембран клеток, щелочная денатурация ДНК и фрагментация хромосомной ДНК осуществлялись в 200 мкл раствора, содержащем 0,2 М NaOH, 1% SDS. Содержимое пробирки перемешивали путем переворачивания 4-6 раз. Затем проводили ренатурацию ДНК с помощью раствора 3 М ацетата натрия, рН 5,0. Творожистый осадок ренатурированной хромосомной ДНК отделялся от плазмидной ДНК центрифугированием при 14 000 об/мин в течение 10 минут на центрифуге «5418» («Eppendorf», Германия). Отобранный раствор плазмидной ДНК очищали от белков путем инкубации с равным объемом 5 М хлорида лития в течение 20 минут на льду с последующим центрифугированием при тех же условиях, что и раньше. Осаждение очищенной плазмидной ДНК проводили с помощью 0,6-1 объема холодного изопропанола. Осадок промывали 200 мкл холодного 70% этилового спирта. Промытый, высушенный на воздухе осадок растворяли в 20-30 мкл дистиллированной воды.

Трансформацию дрожжей *S. cerevisiae* проводили с использованием ацетата лития (Rose et al., 1989). Для трансформации использовалась свежая ночная культура, выращенная при температуре +30 °С в жидкой среде YPD на шейкере-инкубаторе «ES-20/60» («BioSan», Латвия) при 170 об/мин. Клетки дрожжей инкубировали с плазмидной ДНК и ДНК носителя (ДНК спермы лосося) в растворе, содержащем 40% полиэтиленгликоль, буфер Трис-ЭДТА и ацетат лития (10 мМ Tris, рН 8,0, 0,1 мМ ЭДТА, рН 8,0, 100 мМ LiAc) с добавлением диметилсульфоксида до 10% в течение 15 минут при комнатной температуре. После чего проводили термошок: пробирку помещали в водяную баню «WB-4MS» («BioSan», Латвия) с температурой +42 °С на 10 минут. Трансформированные клетки высевали на чашки Петри с твердой селективной средой MD.

2.3. Получение фрагментов гена *VTG2 Gallus domesticus*

Тотальная РНК из печени курицы *Gallus domesticus* была любезно предоставлена Т. А. Белашовой. На матрице выделенной РНК синтезировали кДНК с помощью набора «Superscript III» («Invitrogen», США) с использованием праймера oligo(dT) согласно протоколу фирмы-производителя. Амплификацию фрагментов *VTG2* на матрице полученной кДНК проводили при помощи метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) (Sambrook et al., 1989) в термоциклере «Терцик» («ДНК-Технология», РФ) с использованием термостабильной полимеразы Deep Vent («New England Biolabs», США). При амплификации фрагментов *VTG2-1* (1073 п.н.), *VTG2-2* (968 п.н.), *VTG2-3* (181 п.н.) были использованы пары праймеров For1vtg SfiI и Rev1vtg SfiI, For2vtg SfiI и Rev2vtg SfiI, For3vtg SfiI и Rev3vtg SfiI, соответственно (Таблица 1). Праймеры были синтезированы компанией «Beagle» (РФ). Реакцию амплификации проводили в следующих условиях:

94 °С – 3 мин (1 цикл)

94 °С – 30 сек, 48 °С – 45 сек, 72 °С – 1 мин (5 циклов)

94 °С – 25 сек, 70 °С – 30 сек, 72 °С – 1 мин (25 циклов)

72 °С – 10 мин (1 цикл)

4 °С – ∞

Таблица 1. Список праймеров, использованных при конструировании плазмид

№	Название праймера	Последовательность	Амплифицируемый участок
1	For1vtg SfiI	5'- CGTGGCCATTATGGCCGAGGCTGGAA TTGGAGGT-3'	Участок гена <i>VTG2</i> , кодирующий фрагмент белка с 140-й по 497-ю аминокислоту
2	Rev1vtg SfiI	5'- CATGGCCGAGGCGGCCTGTGGACTGG GATATCAG-3'	
3	For2vtg SfiI	5'- CGTGGCCATTATGGCCAAAGCTCTGCA GGGATGG-3'	Участок гена <i>VTG2</i> , кодирующий фрагмент белка с 696-й по 1019-ю аминокислоту
4	Rev2vtg SfiI	5'- CATGGCCGAGGCGGCCATGAACTGGC ATCAAAAC-3'	

Продолжение таблицы 1.

5	For3vtg SfiI	5'- CGTGGCCATTATGGCCCTGGAGTGGCC CAAGGTT-3'	Участок гена <i>VTG2</i> , кодирующий фрагмент белка с 1456-й по 1517-ю аминокислоту
6	Rev3vtg SfiI	5'- CATGGCCGAGGCGGCCAGGCAGCTTG ACAACAAC-3'	

Для разделения и визуализации амплифицированных фрагментов ДНК использовали электрофоретическое разделение фрагментов ДНК в 0,8% агарозном геле в трис-ацетатном буфере (40 мМ Tris, 20 мМ уксусной кислоты, 1 мМ ЭДТА). Гель-электрофорез проводили в камере для горизонтального гель-электрофореза «Хеликон» (РФ), для визуализации молекул ДНК в гель был добавлен бромистый этидий в конечной концентрации 0,5 мкг/мл. При оценке длин молекул ДНК использовался маркер молекулярного веса «GeneRuler 1 kb DNA Ladder» («Thermo Scientific», США). Выделение фрагментов ДНК из агарозного геля осуществлялось с помощью набора «GeneJET Gel Extraction Kit» («Thermo Scientific», США) по протоколу производителя.

2.4. Конструирование плазмид

Для оценки способности к агрегации белков в клетках *S. cerevisiae* нами были сконструированы плазмиды, обеспечивающие экспрессию исследуемых белков, слитых с последовательностью YFP. Вектор pRS426CUP-YFP-ctd (неопубликованные данные) (Рисунок 4), любезно предоставленный А. А. Зелинским, был гидролизован эндонуклеазой рестрикции *SfiI* («Thermo Scientific», США). Амплифицированные фрагменты *VTG2-1* (1073 п.н.), *VTG2-2* (968 п.н.) и *VTG2-3* (181 п.н.) обрабатывали той же эндонуклеазой. Разделение продуктов рестрикции при помощи горизонтального электрофореза в агарозном геле и выделение фрагментов ДНК из геля осуществляли по вышеописанным методикам. Рестрицированные фрагменты *VTG2* встраивали в гидролизованный вектор, используя ДНК-лигазу T4 производства «Thermo Scientific» (США) согласно рекомендациям фирмы-производителя.

Также в качестве контроля была использована плаزمида P_{CUP1} -GFP(URA3), содержащая ген зеленого флуоресцирующего белка (GFP) медузы *Aequorea victoria* под контролем промотора P_{CUP1} (Рисунок 4).

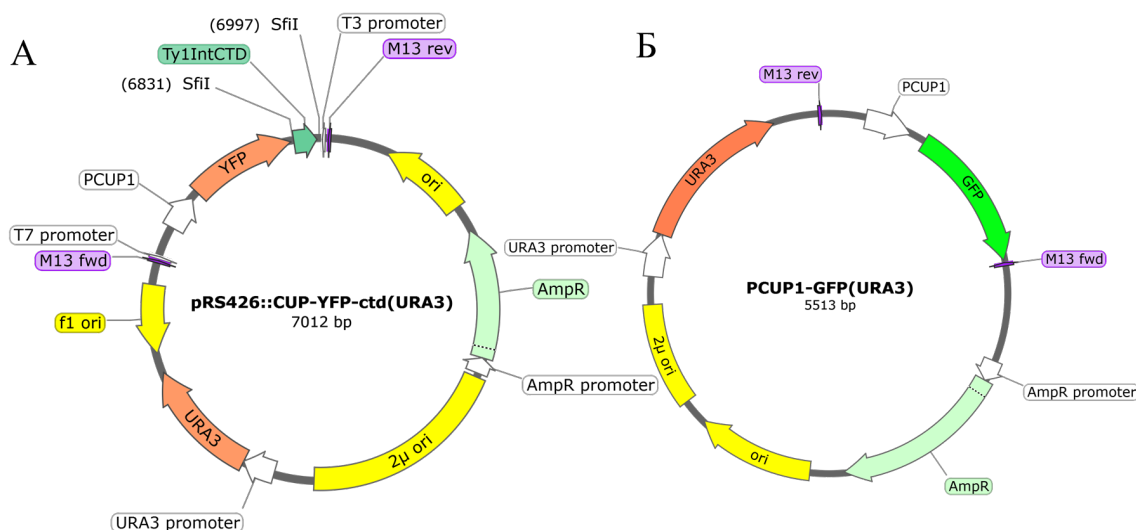


Рисунок 4. Физические карты использованных плазмид. А – pRS426CUP-YFP-ctd; Б – P_{CUP1} -GFP; Amp^R – бактериальный ген устойчивости к ампициллину; P_{CUP1} – последовательность дрожжевого промотора $CUP1$; $URA3$ – маркерный дрожжевой ген; YFP – последовательность, кодирующая желтый флуоресцирующий белок; GFP – последовательность, кодирующая зеленый флуоресцирующий белок; $Ty1IntCTD$ – белок кодирующая последовательность.

Для амплификации плазмид, ими были трансформированы клетки бактерий *E. coli*, которые культивировались на твердой селективной среде LB с добавлением ампициллина при температуре +37 °C в течение ночи, после чего проводилось выделение плазмид. Успешное встраивание фрагментов $VTG2$ в вектор проверяли с помощью рестрикционного анализа по сайтам эндонуклеазы рестрикции *SfiI*, а также с помощью ПЦР со специфических праймеров. Плазмиды, несущие вставки нужного размера, соответствующего длине фрагментов $VTG2$, секвенировали, используя пары праймеров, перечисленные в таблице 1 (Ресурсный центр «Развитие молекулярных и клеточных технологий»). Полученные сиквенсы анализировали в программе «BioEdit». Проверенные таким образом плазмиды использовали для трансформации дрожжей *S. cerevisiae*.

2.5. Выделение белкового лизата из дрожжевых клеток

Выделение общего белка дрожжей проводили с помощью метода разрушения клеток стеклянными шариками. Культивирование дрожжевых трансформантов проводили в течение двух дней в 30 мл жидкой селективной среды MD со всеми необходимыми добавками в соответствии с генотипом без урацила (-URA) с добавлением 100 мкМ CuSO₄. Клетки выращивали при температуре +30 °С на шейкере-инкубаторе «ES-20/60» («BioSan», Латвия) при 170 об/мин. Затем культуру переносили в конические пробирки объемом 50 мл и осаждали дрожжевые клетки центрифугированием при +4 °С, 3 000 об/мин в течение 10 минут («Centifuge 5810 R» («Eppendorf», Германия)). Слив супернатант, осажденную клеточную массу суспендировали на льду в лизирующем буфере (600 мкл натрий-фосфатного буфера, 6 мкл раствора ингибиторов протеаз «Halt Protease Inhibitor Cocktail (100X)» («Thermo Scientific», США)). Затем клетки переносили в микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл, к которым добавляли равный объем стеклянных бус (glass beads) («BioSpec Products», США) и проводили шесть циклов разрушения по 20 сек на гомогенизаторе FastPrep24 («MP Biomedicals», США). В перерывах между циклами разрушения пробы инкубировали в течение пяти минут на льду. Далее грубый клеточный лизат переносили в новые пробирки и центрифугировали при +4 °С, 3 000 об/мин в течение пяти минут в центрифуге «Jouan CR3i» («Thermo Scientific», США). При этом происходило разделение грубого лизата на клеточный дебрис (в осадке) и клеточный лизат (в надосадочной жидкости).

2.6. Фракционирование дрожжевого клеточного лизата

Для определения того, в какой форме (растворимой или в виде агрегатов) находится целевой белок, использовали метод фракционирования дрожжевых клеточных лизатов. Для этого полученные клеточные лизаты центрифугировали при 10 000 об/мин в течение 25 минут при +4 °С на центрифуге «Jouan CR3i» («Thermo Electron», США). Надосадочную фракцию переносили в новую пробирку, а осадок растворяли в лизирующем буфере в объеме, равном объему отобранного супернатанта.

Для проверки устойчивости целевого белка к SDS клеточный лизат обрабатывали 1% SDS в течение 10 минут при комнатной температуре, а затем проводили фракционирование клеточных лизатов как описано выше, но при +20 °С.

Известно, что 1% SDS при таких условиях способствует разборке большинства белковых агрегатов и комплексов, тогда как амилоидные протофибриллы не разбираются (Kushnirov et al., 2006). Все пробы инкубировали в однократном буфере для нанесения (4х-кратный буфер: 100 мМ Tris-HCl, pH 6.8, 20% 2-меркаптоэтанол, 8% SDS, 0,2% бромфеноловый синий, 40% глицерин) при +95 °С в течение 13 минут.

2.7. Белковый гель-электрофорез и Вестерн-блоттинг

Пробы белка из осадочной и надосадочной фракций наносили на 12% полиакриламидный гель (ПААГ) и проводили электрофоретическое разделение белков в денатурирующих условиях (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970). Оценка размера белков проводилась с помощью маркера молекулярного веса «Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder» («Thermo Scientific», США). Электрофорез проводили в камере производства «Mini-PROTEAN Tetra Cell» («Bio-Rad», США) в трис-глициновом буфере (25 мМ Tris, pH 8.3, 200 мМ глицин, 0,1% SDS) в течение 1,5 часов. При вхождении белков в концентрирующий гель использовалось напряжение 100 V, при достижении белковыми пробами границы между концентрирующим и разделяющим гелями напряжение повышали до 200 V. Электроперенос белков с ПААГ на поливинилиден дифтористую мембрану Amersham Hybond P 0.2 PVDF («GE Healthcare», Великобритания) осуществляли в буфере для переноса (25 мМ Tris, pH 8.3, 20% этиловый спирт, 200 мМ глицин) при помощи камеры для переноса «Mini-PROTEAN 3 Cell» («Bio-Rad», США) при напряжении 130 V в течение часа.

«Вестерн-блот» проводили с использованием первичных антител Anti-GFP (ab32146) производства «Abcam» (Великобритания), а затем с использованием вторичных антител, конъюгированных с пероксидазой хрена Goat Anti-Rabbit IgG H&L (HRP) (ab205718) («Abcam», Великобритания). Детекцию комплексов антиген-антитело осуществляли с помощью фирменных наборов «ESL» и «ESL Select» фирмы «Amersham» (Великобритания), согласно рекомендациям производителя, на приборе ChemiDoc™ XRS+ Imaging System («Bio-Rad», США).

2.8. Флуоресцентная микроскопия

Для изучения агрегации фрагментов VTG2, слитых с желтым флуоресцирующим белком YFP, дрожжевых трансформантов выращивали на твердой селективной среде MD с добавлением 100 мкМ CuSO₄ при температуре +30 °С для индукции промотора P_{CUP1}. Изготовление препаратов для микроскопии

осуществлялось следующим образом: клетки дрожжей заключали в 5-7 мкл среды «VECTASHIELD Mounting Media» («Vector Laboratories Inc», США) и равномерно распределяли по поверхности предметного стекла «Menzel-Gläser» («Gerhard Menzel GmbH», Германия), после чего накрывали покровным стеклом. Анализ флуоресцентного свечения исследуемых белков проводили с помощью микроскопа «Leica TCS SP5» («Leica Microsystems GmbH», Германия) с использованием программного обеспечения «LAS AF for Leica TCS SP5» (Центр коллективного пользования СПбГУ «Хромас S»). Оценка доли клеток с агрегатами относительно общего числа клеток, демонстрирующих флуоресценцию на канале желтого флуоресцирующего белка, производилась с использованием программного обеспечения «ImageJ» (Wayne Rasband, National Institute of Health, USA, <http://imagej.nih.gov/ij>).

3. Результаты и обсуждение

3.1. Биоинформатический поиск потенциально амилоидогенных последовательностей VTG2 и получение плазмид для анализа агрегации фрагментов VTG2 в клетках *S. cerevisiae*

Известно, что вителлогенин-2, проникая в созревающие ооциты домашней курицы, разрезается протеазой катепсином Д на домены: липовителлины, фосвитин и пептид YGP40 (Retzek et al., 1992) (Рисунок 5). По данным Mann и Mann (2008), VTG2 и продукты его протеолиза (кроме пептида YGP40) были выявлены в гранулярной фракции желтка куриного яйца. Пептид YGP40, напротив, является мажорным компонентом плазмы желтка (Yamamura et al., 1995).

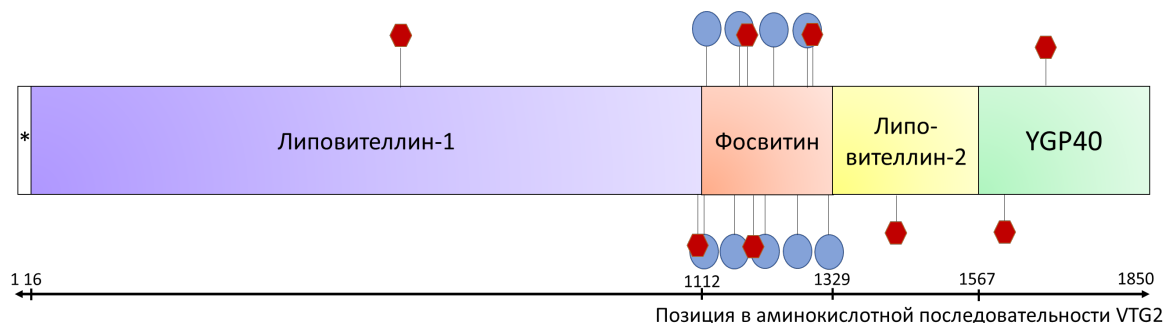


Рисунок. 5. Доменная структура белка VTG2 и сайты посттрансляционных модификаций. * – участок, соответствующий сигнальному пептиду; синими кружками обозначены фосфатные группы; красными шестиугольниками обозначены остатки N-Ацетилглюкозамина.

Как было сказано выше, ранее в нашей лаборатории было показано, что белок VTG2 формирует в ооцитах курицы SDS-устойчивые агрегаты (Синюкова и др., неопубликованные данные). Мы оценили наличие потенциально амилоидогенных последовательностей в этом белке с помощью программы «ArchCandy» (Рисунок 6) (Ahmed et al., 2015). Этот алгоритм позволяет предсказывать потенциально амилоидогенные регионы в аминокислотной последовательности белков на основании их способности к формированию структур типа β -арок (Ahmed et al., 2015). Показатель «Суммарный счет» отражает вероятность формирования определенным участком кросс-бета структур. Приведенные на рисунке 6 данные указывают на то, что согласно алгоритму «ArchCandy» белок VTG2 содержит целый ряд потенциально амилоидогенных последовательностей.

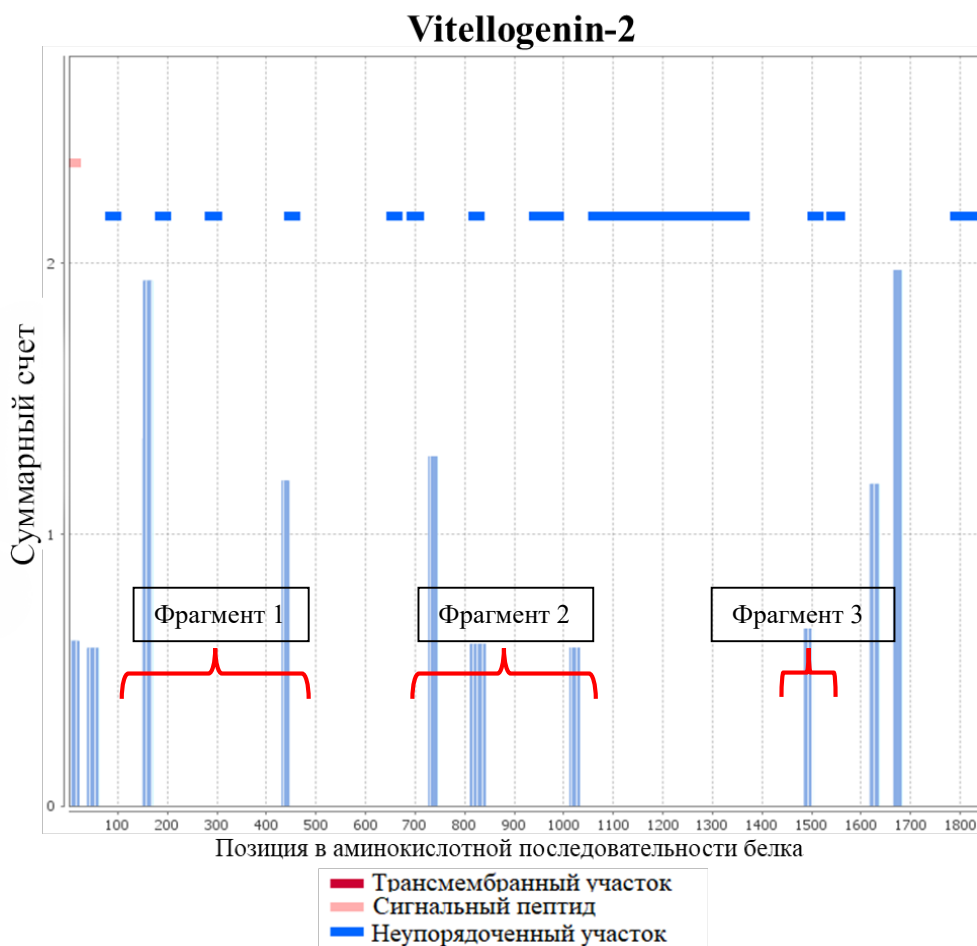


Рисунок 6. Потенциально амилоидогенные регионы белка VTG2, предсказанные с помощью программы «ArchCandy». Красными скобками отмечены три фрагмента VTG2, выбранные для дальнейшего исследования.

На основании результатов предсказания амилоидогенных регионов программой «ArchCandy» последовательность VTG2 была разбита на три фрагмента, соответствующие пикам (Таблица 2). С-концевой участок, который по результатам предсказания «ArchCandy» также обладает высоким потенциалом к формированию кросс-бета структур (Рисунок 6), не был включен в дальнейший анализ, так как он соответствует пептиду YGP40 (1567-1850 aa последовательности VTG2), для которого ранее не было показано способности к агрегации (Yamamura et al., 1995).

Таблица 2. Фрагменты VTG2, содержащие потенциально амилоидогенные участки по предсказаниям алгоритма «ArchCandy»

№ фрагмента VTG2	Участок аминокислотной последовательности VTG2
Фрагмент 1 (VTG2-1)	С 140-й по 497-ю аа
Фрагмент 2 (VTG2-2)	С 696-й по 1019-ю аа
Фрагмент 3 (VTG2-3)	С 1456-й по 1517-ю аа

Фрагменты 1 и 2 входят в последовательность липовителлина-1 (16-1111 аа), а фрагмент 3 – липовителлина-2 (1329-1566 аа). Участок последовательности VTG2, соответствующий фосвитину (1112-1328 аа), нами не исследовался, так как, по данным «ArchCandy», в нем отсутствуют амилоидогенные регионы (Рисунок 6).

Мы решили оценить способность к агрегации фрагментов белка VTG2 с 140-й по 497-ю аминокислоту, с 696-й по 1019-ю аминокислоту и с 1456-й по 1517-ю аминокислоту. С этой целью были сконструированы три плазмиды для продукции в дрожжевых клетках химерных белков, содержащих последовательности фрагментов VTG2, слитые с последовательностью флуоресцирующего белка YFP (см. раздел «Материалы и методы»). Таким образом были получены плазмиды pCUP1-YFP-VTG2-1, pCUP1-YFP-VTG2-2, pCUP1-YFP-VTG2-3 (Рисунок 7), предназначенные для продукции в дрожжевых клетках трех фрагментов белка VTG2: с 140-й по 497-ю аминокислоту, с 696-й по 1019-ю аминокислоту и с 1456-й по 1517-ю аминокислоту, соответственно. Каждая из трех плазмид содержит химерный ген соответствующего фрагмента VTG2, слитого с YFP под контролем индуцибельного промотора *P_{CUP1}*, а также маркерные гены – *Amp^R* и *URA3*, дрожжевой и бактериальный ориджины репликации (Рисунок 7).

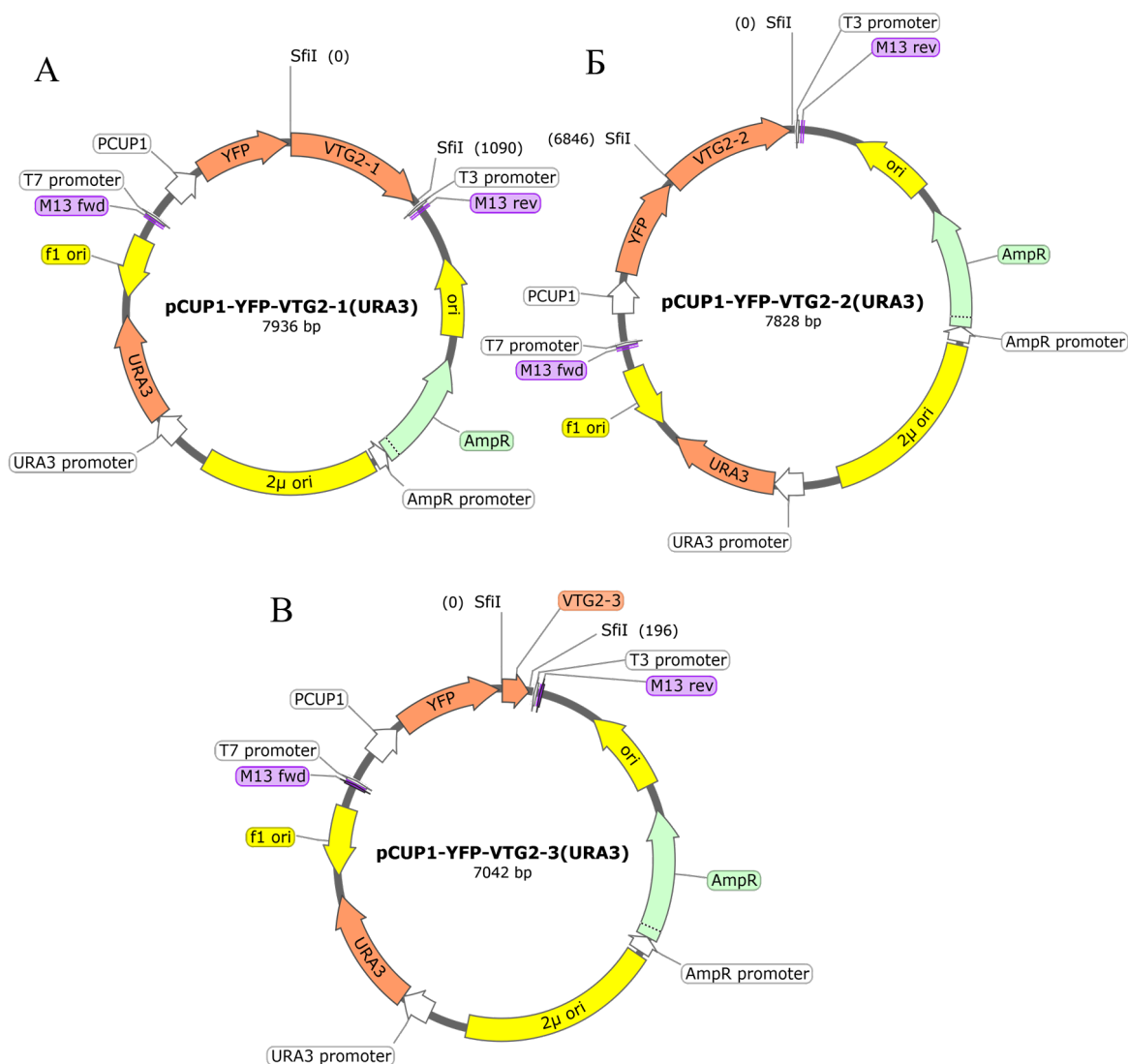


Рисунок 7. Физические карты сконструированных плазмид. А – pRS426CUP-YFP-VTG2-1; Б – pRS426CUP-YFP-VTG2-2; В – pRS426CUP-YFP-VTG2-3; *Amp^R* – бактериальный ген устойчивости к ампициллину; *P_{CUP1}* – последовательность дрожжевого промотора *CUP1*; *URA3* – маркерный дрожжевой ген; *YFP* – последовательность, кодирующая желтый флуоресцирующий белок; *VTG2-1*, *VTG2-2*, *VTG2-3* – белок кодирующие последовательности.

Проведение ПЦР с парами праймеров, специфических для каждого фрагмента *VTG2* (Таблица 1), на матрице сконструированных плазмид pCUP1-YFP-VTG2-1, pCUP1-YFP-VTG2-2, pCUP1-YFP-VTG2-3 подтвердило успешность лигирования фрагментов *VTG2* в вектор (Рисунок 8).

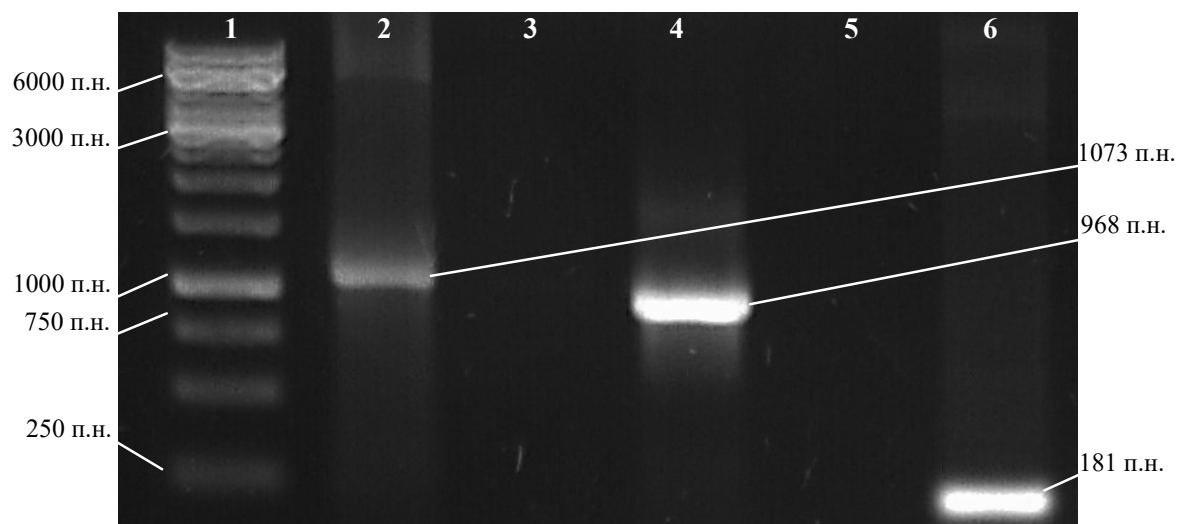


Рисунок 8. ПЦР-анализ сконструированных плазмид. Дорожка 1 – маркер «GeneRuler 1 kb DNA Ladder»; дорожка 2 – фрагмент VTG2-1, амплифицированный с плазмиды pCUP1-YFP-VTG2-1; дорожки 3, 5 – пустые; дорожка 4 – фрагмент VTG2-2, амплифицированный с плазмиды pCUP1-YFP-VTG2-2; дорожка 6 – фрагмент VTG2-3, амплифицированный с плазмиды pCUP1-YFP-VTG2-3.

Размеры полученных ПЦР-продуктов соответствовали теоретически ожидаемым фрагментам *VTG2* длиной в 1073 п.н., 968 п.н. и 181 п.н. для *VTG2-1*, *VTG2-2* и *VTG2-3*, соответственно.

3.2. Анализ агрегации фрагментов белка VTG2 в клетках *S. cerevisiae* с помощью флуоресцентной микроскопии

Прежде всего, представляло интерес выяснить, какой именно из трех фрагментов белка VTG2 способен формировать агрегаты в дрожжевых клетках. Дрожжи *S. cerevisiae* штамма BY4742 были трансформированы плазмидами pCUP1-YFP-VTG2-1, pCUP1-YFP-VTG2-2, pCUP1-YFP-VTG2-3, а также плазмидой pCUP1-GFP(URA3) в качестве контроля. Трансформантов рассеивали на чашки Петри с твердой селективной средой без урацила (-URA) с добавлением 100 мкМ CuSO₄ для индукции транскрипции с промотора pCUP1. Дрожжи культивировали в течение двух суток при температуре +30 °С. Отобранных трансформантов анализировали с помощью флуоресцентной микроскопии (Рисунок 9).

Как видно из рисунка 9, фрагменты 1 и 2, слитые с YFP, образуют точечные и довольно крупные глобулярные структуры, в то время как фрагмент 3 формирует кольцевые структуры и агрегаты неправильной формы. Общее число проанализированных клеток, в которых детектировалась флуоресценция на фильтре YFP, и средняя доля клеток с агрегатами приведены в таблице 3.

Таблица 3. Доля клеток *S. cerevisiae* с агрегатами, проанализированных с помощью флуоресцентной микроскопии

	Фрагмент VTG2-1	Фрагмент VTG2-2	Фрагмент VTG2-3	GFP
Доля клеток с агрегатами	73%±5,5	75%±4,2	83%±4,1	0%
Число проанализированных клеток	153	91	115	83

Исходя из этого, можно заключить, что все три фрагмента белка VTG2, слитые с YFP, способны к формированию агрегатов в клетках дрожжей *S. cerevisiae*. Нельзя исключать, что агрегаты правильной формы входят в состав специализированных не мембранных клеточных структур, аналогичных «тельцам включения» бактерий, в которых компактизируются нефункциональные белки гетерологичной природы (Cousens et al., 1987).

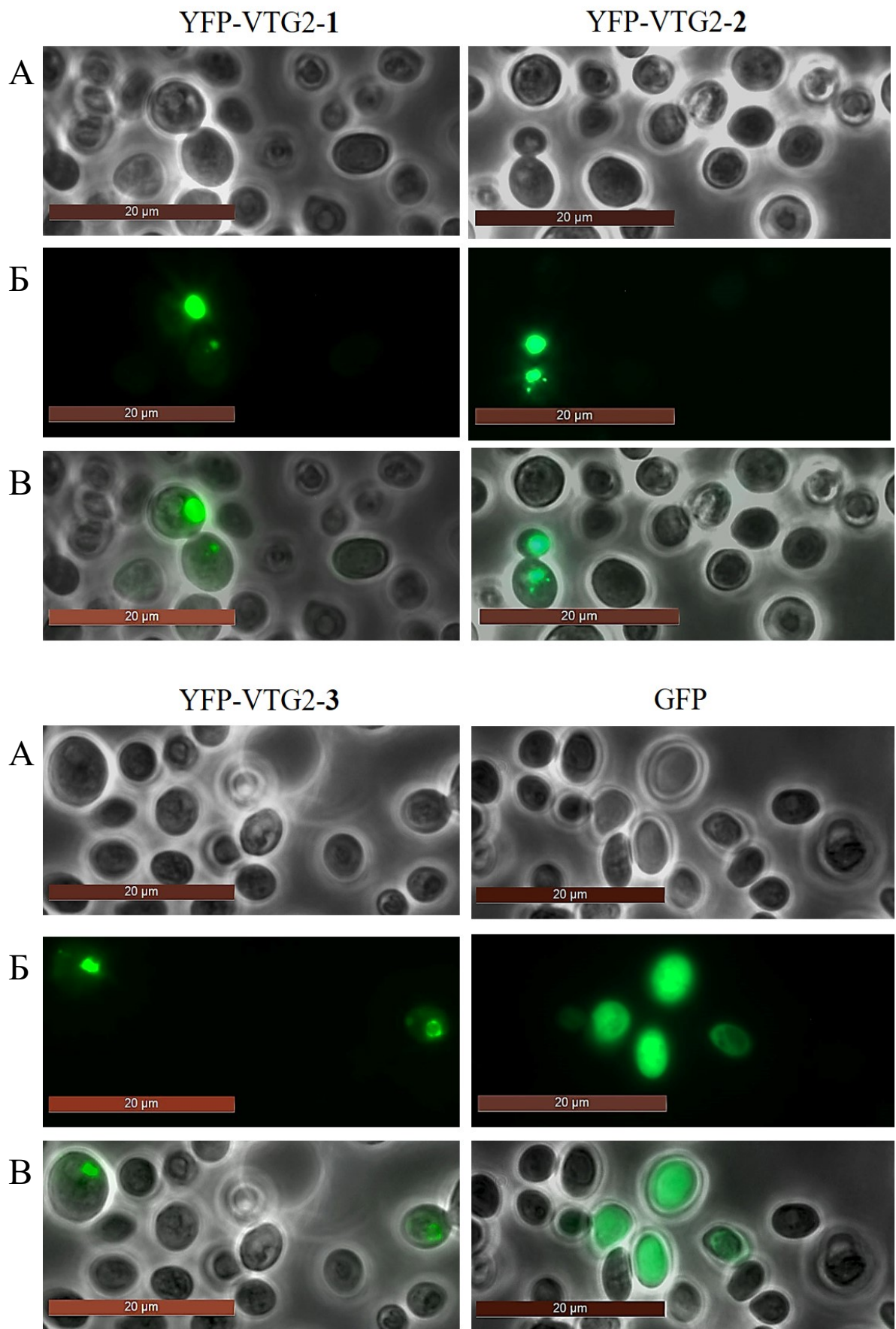


Рисунок 9. Агрегация фрагментов белка VTG2 в клетках *S. cerevisiae* и равномерное распределение белка GFP (контроль). Масштабная линейка – 20 мкм; А – фазовый контраст; Б – канал для детекции свечения YFP; В – совмещение каналов фазового контраста и YFP.

3.3. Биохимический анализ агрегации фрагментов белка VTG2 в дрожжевых клетках и анализ устойчивости агрегатов к SDS

Для оценки агрегации исследуемых белков был использован метод фракционирования дрожжевых клеточных лизатов (см. раздел «Материалы и методы»). Дрожжи культивировали в течение двух суток в жидкой селективной среде без урацила (-URA) с добавлением 100 мкМ CuSO₄ для экспрессии генов с промотора *P_{CUP1}*. При центрифугировании белковых лизатов получали фракцию супернатанта и осадочную фракцию. Вестерн-блоттинг был проведен как описано в разделе «Материалы и методы».

В результате эксперимента мы показали, что все три фрагмента VTG2 находятся в осадке, во фракции агрегатов (Рисунок 10). Молекулярный вес детектированных белков соответствовал теоретически ожидаемому молекулярному весу фрагментов VTG2 (VTG2-1, VTG2-2, VTG2-3), слитых с YFP (64, 61 и 32 кДа, соответственно). GFP в контрольной пробе, как и ожидалось, детектировался в растворимой фракции. Эти результаты были воспроизведены в трех независимых повторностях эксперимента. Таким образом, биохимический анализ белковых лизатов подтверждает агрегацию всех трех фрагментов VTG2, наблюдаемую с помощью флуоресцентной микроскопии.

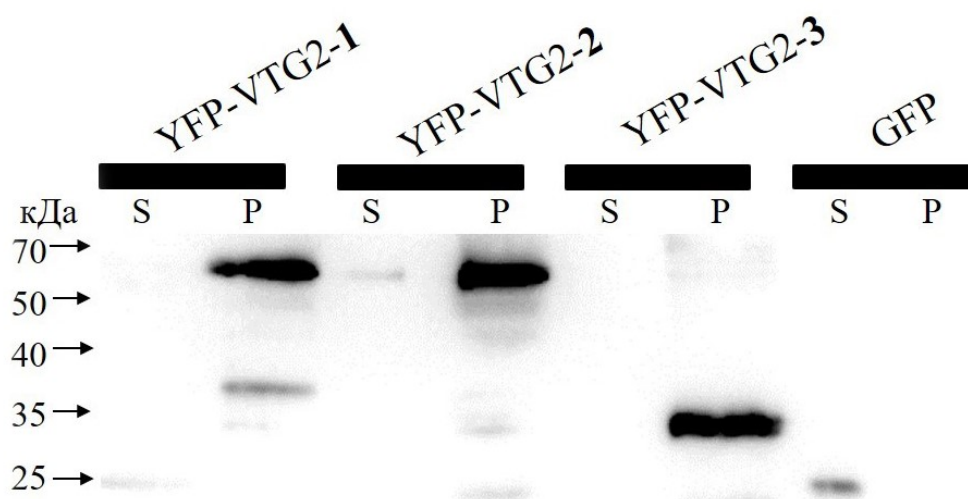


Рисунок 10. Фракционирование дрожжевого клеточного лизата (S – супернатант, P – осадок). Вестерн-блот проводили с использованием первичных антител Anti-GFP (ab32146, “Abcam”) и вторичных антител Goat Anti-Rabbit IgG H&L (HRP) (ab205718, “Abcam”).

Одним из универсальных свойств амилоидных фибрилл является их устойчивость к ионным детергентам. Белок VTG2 был выявлен при проведении протеомного скрининга ооцитов курицы во фракции SDS-устойчивых белковых агрегатов (Синюкова и др., неопубликованные данные). Для того, чтобы определить какой или какие фрагменты VTG2 способны формировать агрегаты, устойчивые к 1% SDS, был использован метод фракционирования дрожжевых клеточных лизатов с предварительной обработкой 1% SDS (см. раздел «Материалы и методы»). Результаты фракционирования представлены на рисунке 11. При разделении клеточных лизатов на фракции с помощью центрифугирования было обнаружено, что фрагмент VTG2-1, слитый с YFP, присутствует как в растворимой, так и в осадочной фракциях. Два других фрагмента VTG2, слитые с YFP, детектировались исключительно в супернатанте. Как предполагалось, в контрольной пробе GFP находился в растворимой фракции.



Рисунок 11. Фракционирование дрожжевого клеточного лизата в присутствии 1% SDS (S – супернатант, P – осадок). Вестерн-блот проводили с использованием первичных антител Anti-GFP (ab32146, “Abcam”) и вторичных антител Goat Anti-Rabbit IgG H&L (HRP) (ab205718, “Abcam”). Стрелками указаны сигналы, масса которых соответствует теоретически ожидаемой молекулярной массе фрагментов VTG2, слитых с YFP (64, 61 и 32 кДа, соответственно).

На основании полученных результатов трудно сделать какое-либо заключение о том, какая последовательность белка VTG2 определяет его способность формировать SDS-устойчивые агрегаты. N-терминальный фрагмент белка формирует агрегаты в клетках дрожжей, которые устойчивы к обработке SDS лишь частично. Для того, чтобы сделать более определенный вывод необходимо несколько воспроизведений данного эксперимента. Кроме того, укладка полноразмерного белка VTG2 при формировании желточных гранул в яйце курицы и укладка химерных белков в клетках дрожжей может существенно различаться. Известно, что VTG2 имеет сайты N-гликозилирования, а продукт его протеолиза, фосвитин, является одним из самых высоко фосфорилированных белков в природе (Рисунок 5). Эти посттрансляционные модификации белков могут влиять на агрегацию вителлогенина в организме домашней курицы. Для клеток дрожжей *S. cerevisiae* характерно гипергликозилирование белков, что может приводить к снижению активности гетерологичных белков (Baghban et al., 2019). В связи с этим, несмотря на преимущества, которые предоставляет модельная система пекарских дрожжей, она имеет также определенные ограничения и недостатки. Вероятно, более корректные результаты по выявлению конкретных последовательностей, ответственных за агрегацию VTG2, могут быть получены при анализе продукции фрагментов этого белка с использованием клеточных линий птиц (Farzaneh et al., 2017) или в клетках делящихся дрожжей *Schizosaccharomyces pombe*, способных осуществлять гликозилирование и фосфорилирование белков схожим с высшими эукариотами образом (Takegawa et al., 2009). Пока мы можем лишь говорить о том, что N-терминальный фрагмент VTG2 формирует в дрожжевых клетках агрегаты, которые демонстрируют относительную устойчивость к SDS.

4. Выводы

1. Белок VTG2 содержит потенциально амилоидогенные последовательности.

2. Фрагменты белка VTG2 с 140-й по 497-ю аминокислоту, с 696-й по 1019-ю аминокислоту и с 1456-й по 1517-ю аминокислоту, слитые с YFP, формируют в клетках дрожжей *S. cerevisiae* агрегаты.

3. Агрегаты, формируемые фрагментом белка VTG2 с 140-й по 497-ю аминокислоту, проявляют частичную устойчивость к 1% SDS.

Список литературы

1. Галкин, А. П., Велижанина, М. Е., Сопова, Ю. В., Шенфельд, А. А., Задорский, С. П. (2018). Прионы и неинфекционные амилоиды млекопитающих – сходства и отличия. *Биохимия*, 83(10), 1476–1489. <https://doi.org/10.1134/s0320972518100044>
2. Ahmed, A. B., & Kajava, A. V. (2013). Breaking the amyloidogenicity code: Methods to predict amyloids from amino acid sequence. *FEBS Letters*, 587(8), 1089–1095. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2012.12.006>
3. Ahmed, A. B., Znassi, N., Château, M. T., & Kajava, A. V. (2015). A structure-based approach to predict predisposition to amyloidosis. *Alzheimer's and Dementia*, 11(6), 681–690. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2014.06.007>
4. Anton, M., & Gandemer, G. (1997). Composition, solubility and emulsifying properties of granules and plasma of egg yolk. *Journal of Food Science*, 62(3), 484–487. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1997.tb04411.x>
5. Antonets, K. S., Belousov, M. V., Sulatskaya, A. I., Belousova, M. E., Kosolapova, A. O., Sulatsky, M. I., ... Nizhnikov, A. A. (2020). Accumulation of storage proteins in plant seeds is mediated by amyloid formation. *PLoS Biology*, 18(7), e3000564. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000564>
6. Baghban, R., Farajnia, S., Rajabibazl, M., Ghasemi, Y., Mafi, A. A., Hoseinpoor, R., ... Aria, M. (2019). Yeast Expression Systems: Overview and Recent Advances. *Molecular Biotechnology*, 61(5), 365–384. <https://doi.org/10.1007/s12033-019-00164-8>
7. Barnhart, M. M., & Chapman, M. R. (2006). Curli biogenesis and function. *Annual Review of Microbiology*, 60, 131–147. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.60.080805.142106>
8. Benson, M. D., Buxbaum, J. N., Eisenberg, D. S., Merlini, G., Saraiva, M. J. M., Sekijima, Y., ... Westermarck, P. (2020). Amyloid nomenclature 2020: update and recommendations by the International Society of Amyloidosis (ISA) nomenclature committee. *Amyloid*, 27(4), 217–222. <https://doi.org/10.1080/13506129.2020.1835263>

9. Benson, M. D., James, S., Scott, K., Liepnieks, J. J., & Kluve-Beckerman, B. (2008). Leukocyte chemotactic factor 2: A novel renal amyloid protein. *Kidney International*, 74(2), 218–222. <https://doi.org/10.1038/ki.2008.152>
10. Bergström, J., Murphy, C. L., Weiss, D. T., Solomon, A., Sletten, K., Hellman, U., & Westermark, P. (2004). Two different types of amyloid deposits - Apolipoprotein A-IV and transthyretin - In a patient with systematic amyloidosis. *Laboratory Investigation*, 84(8), 981–988. <https://doi.org/10.1038/labinvest.3700124>
11. Birnboim, H. C., & Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*, 7(6), 1513–1523. <https://doi.org/10.1093/nar/7.6.1513>
12. Bleem, A., & Daggett, V. (2017). Structural and functional diversity among amyloid proteins: Agents of disease, building blocks of biology, and implications for molecular engineering. *Biotechnology and Bioengineering*, 114(1), 7–20. <https://doi.org/10.1002/bit.26059>
13. Bourin, M., Gautron, J., Berges, M., Hennequet-Antier, C., Cabau, C., Nys, Y., & Réhault-Godbert, S. (2012). Transcriptomic profiling of proteases and antiproteases in the liver of sexually mature hens in relation to vitellogenesis. *BMC Genomics*, 13, 457. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-457>
14. Brachmann, C. B., Davies, A., Cost, G. J., Caputo, E., Li, J., Hieter, P., & Boeke, J. D. (1998). Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: A useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast*, 14(2), 115–132. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0061\(19980130\)14:2<115::AID-YEA204>3.0.CO;2-2](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(19980130)14:2<115::AID-YEA204>3.0.CO;2-2)
15. Brookmeyer, R., Evans, D. A., Hebert, L., Langa, K. M., Heeringa, S. G., Plassman, B. L., & Kukull, W. A. (2011). National estimates of the prevalence of Alzheimer's disease in the United States. *Alzheimer's & dementia: the journal of the Alzheimer's Association*, 7(1), 61–73. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2010.11.007>
16. Burley, R. W., & Cook, W. H. (1961). Isolation and composition of avian egg yolk granules and their constituent alpha- and beta-lipovitellins. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 39, 1295–1307. <https://doi.org/10.1139/o61-136>

17. Burley, R. W., Evans, A. J., & Pearson, J. A. (1993). Molecular aspects of the synthesis and deposition of hens' egg yolk with special reference to low density lipoprotein. *Poultry Science*, 72(5), 850–855. <https://doi.org/10.3382/ps.0720850>
18. Buxbaum, J. N., & Linke, R. P. (2012). A molecular history of the amyloidoses. *Journal of Molecular Biology*, 421(2-3), 142-59. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2012.01.024>
19. Cherny, I., Rockah, L., Levy-Nissenbaum, O., Gophna, U., Ron, E. Z., & Gazit, E. (2005). The formation of Escherichia coli curli amyloid fibrils is mediated by prion-like peptide repeats. *Journal of Molecular Biology*, 352(2), 245–252. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.07.028>
20. Cousens, L. S., Shuster, J. R., Gallegos, C., Ku, L., Stempien, M. M., Urdea, M. S., ... Tekamp-Olson, P. (1987). High level expression of proinsulin in the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, 61(3), 265–275. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(87\)90190-9](https://doi.org/10.1016/0378-1119(87)90190-9)
21. de Jong, W., Wösten, H. A. B., Dijkhuizen, L., & Claessen, D. (2009). Attachment of *Streptomyces coelicolor* is mediated by amyloida fimbriae that are anchored to the cell surface via cellulose. *Molecular Microbiology*, 73(6), 1128–1140. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06838.x>
22. Dispenzieri, A., Gertz, M. A., & Buadi, F. (2012). What do I need to know about immunoglobulin light chain (AL) amyloidosis? *Blood Reviews*, 26(4), 137–154. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2012.03.001>
23. Egge, N., Muthusubramanian, A., & Cornwall, G. A. (2015). Amyloid properties of the mouse egg zona pellucida. *PLoS ONE*, 10(6), e0129907. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129907>
24. Elkin, R. G., Freed, M. B., Danetz, S. A. H., & Bidwell, C. A. (1995). Proteolysis of Japanese quail and chicken plasma apolipoprotein B and vitellogenin by cathepsin D: Similarity of the resulting protein fragments with egg yolk polypeptides. *Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology*, 112(2), 191–196. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(95\)00062-3](https://doi.org/10.1016/0305-0491(95)00062-3)
25. Etches, R. J. (1996). *Reproduction in Poultry*. CAB International, Wallingford, United Kingdom.

26. Farzaneh, M., Hassani, S. N., Mozdziak, P., & Baharvand, H. (2017). Avian embryos and related cell lines: A convenient platform for recombinant proteins and vaccine production. *Biotechnology Journal*, 12(5), 1600598. <https://doi.org/10.1002/biot.201600598>
27. Fioriti, L., Myers, C., Huang, Y. Y., Li, X., Stephan, J. S., Trifilieff, P., ... Kandel, E. R. (2015). The Persistence of Hippocampal-Based Memory Requires Protein Synthesis Mediated by the Prion-like Protein CPEB3. *Neuron*, 86(6), 1433–1448. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.05.021>
28. Fowler, D. M., Koulov, A. V., Alory-Jost, C., Marks, M. S., Balch, W. E., & Kelly, J. W. (2006). Functional amyloid formation within mammalian tissue. *PLoS Biology*, 4(1), e6. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040006>
29. Galkin, A. P., & Sysoev, E. I. (2021). Stress Response Is the Main Trigger of Sporadic Amyloidoses. *International journal of molecular sciences*, 22(8), 4092. <https://doi.org/10.3390/ijms22084092>
30. Gejyo, F., Yamada, T., Odani, S., Nakagawa, Y., Arakawa, M., Kunitomo, T., ... Schmid, K. (1985). A new form of amyloid protein associated with chronic hemodialysis was identified as β 2-microglobulin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 129(3), 701–706. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(85\)91948-5](https://doi.org/10.1016/0006-291X(85)91948-5)
31. Gilbert, A. B. (1979). Female genital tract. In King, A. S., & McLelland J. (Eds.), *Form and Function in Birds*. Academic Press, London, United Kingdom, 237–360.
32. Glenner, G. G., & Wong, C. W. (1984). Alzheimer's disease: Initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 120(3), 885–890. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(84\)80190-4](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(84)80190-4)
33. Gu, L., Liu, C., Stroud, J. C., Ngo, S., Jiang, L., & Guo, Z. (2014). Antiparallel triple-strand architecture for prefibrillar A β 42 oligomers. *Journal of Biological Chemistry*, 289(39), 27300–27313. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.569004>
34. Guyonnet, B., Egge, N., & Cornwall, G. A. (2014). Functional Amyloids in the Mouse Sperm Acrosome. *Molecular and Cellular Biology*, 34(14), 2624–2634. <https://doi.org/10.1128/mcb.00073-14>

35. Hamodrakas, S. J., Jones, C. W., & Kafatos, F. C. (1982). Secondary structure predictions for silkmoth chorion proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Protein Structure and Molecular*, 700(1), 42–51. [https://doi.org/10.1016/0167-4838\(82\)90289-8](https://doi.org/10.1016/0167-4838(82)90289-8)
36. Hanahan, D. (1985). Techniques for transformation of *E. coli*. In Glover, D. M. (Ed.), *DNA cloning: a practical approach*. IRL Press, Oxford, United Kingdom 1, 109–135.
37. Hardy, D. M., Oda, M. N., Friend, D. S., & Huang, T. T. F. (1991). A mechanism for differential release of acrosomal enzymes during the acrosome reaction. *Biochemical Journal*, 275(Pt-3), 759–766. <https://doi.org/10.1042/bj2750759>
38. Hermsdorf, C. L., Schraer, R., & Taylor, W. D. (1979). Effect of Calcium on the Monomer-Dimer Association of Calcium-Binding Protein in the Serum of Laying Hens. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 162(3), 383–388. <https://doi.org/10.3181/00379727-162-40687>
39. Hervas, R., Rau, M. J., Park, Y., Zhang, W., Murzin, A. G., Fitzpatrick, J. A. J., ... Si, K. (2020). Cryo-EM structure of a neuronal functional amyloid implicated in memory persistence in *Drosophila*. *Science*, 367(6483), 1230–1234. <https://doi.org/10.1126/science.aaw1114>
40. Iconomidou, V. A., Vriend, G., & Hamodrakas, S. J. (2000). Amyloids protect the silkmoth oocyte and embryo. *FEBS Letters*, 479(3), 141–145. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(00\)01888-3](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)01888-3)
41. Iconomidou, V., & Hamodrakas, S. (2008). Natural Protective Amyloids. *Current Protein & Peptide Science*, 9(3), 291–309. <https://doi.org/10.2174/138920308784534041>
42. Inoue, H., Nojima, H., & Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*, 96(1), 23–28. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(90\)90336-P](https://doi.org/10.1016/0378-1119(90)90336-P)
43. Ito, Y., Kihara, M., Nakamura, E., Yonezawa, S., & Yoshizaki, N. (2003). Vitellogenin transport and yolk formation in the quail ovary. *Zoological Science*, 20(6), 717–726. <https://doi.org/10.2108/zsj.20.717>
44. Johnson, A. L., & Woods, D. C. (2007). Ovarian dynamics and follicle development. In Jamieson, B. G. M. (Ed.), *Reproductive Biology and Phylogeny of Birds*. Science Publishers, Enfield, NH, United States, 6A, 243–277.

45. Jovine, L., Darie, C. C., Litscher, E. S., & Wassarman, P. M. (2005). Zona pellucida domain proteins. *Annual Review of Biochemistry*, 74, 83–114. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.74.082803.133039>
46. Kafatos, F. C., Regier, J. C., Mazur, G. D., Nadel, M. R., Blau, H. M., Petri, W. H., ... Koehler, M. (1977). The eggshell of insects: differentiation-specific proteins and the control of their synthesis and accumulation during development. *Results and problems in cell differentiation*, 8, 45–145. https://doi.org/10.1007/978-3-540-37332-2_2
47. Kaiser C., Michaelis S., & Mitchell A. (1994). *Methods in yeast genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
48. Kajava, A. V., Baxa, U., & Steven, A. C. (2010). β arcades: recurring motifs in naturally occurring and disease-related amyloid fibrils. *The FASEB Journal*, 24(5), 1311-1319. <https://doi.org/10.1096/fj.09-145979>
49. Kalebina, T. S., Plotnikova, T. A., Gorkovskii, A. A., Selyakh, I. O., Galzitskaya, O. V., Bezsonov, E. E., ... Kulaev, I. S. (2008). Amyloid-like properties of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall glucantransferase Bgl2p: prediction and experimental evidences. *Prion*, 2(2), 91–96. <https://doi.org/10.4161/pri.2.2.6645>
50. Kisilevsky, R., Raimondi, S., & Bellotti, V. (2016). Historical and current concepts of Fibrillogenesis and In vivo Amyloidogenesis: Implications of amyloid tissue targeting. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 3, 17. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2016.00017>
51. Krüttner, S., Stepien, B., Noordermeer, J. N., Mommaas, M. A., Mechtler, K., Dickson, B. J., & Keleman, K. (2012). *Drosophila* CPEB Orb2A Mediates Memory Independent of Its RNA-Binding Domain. *Neuron*, 76(2), 383–395. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.08.028>
52. Kushnirov, V. V., Alexandrov, I. M., Mitkevich, O. V., Shkundina, I. S., & Ter-Avanesyan, M. D. (2006). Purification and analysis of prion and amyloid aggregates. *Methods*, 39(1), 50–55. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2006.04.007>
53. Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
54. Liapis, K., Panagopoulou, P., Charitaki, E., Rowczenio, D., Gilbertson, J., Papatoma, A., ... Kastritis, E. (2019). Hereditary systemic amyloidosis caused by K19T

apolipoprotein C-II variant. *Amyloid*, 26(1), 52–53.
<https://doi.org/10.1080/13506129.2018.1562442>

55. Litscher, E. S., & Wassarman, P. M. (2018). The Fish Egg's Zona Pellucida. *Current Topics in Developmental Biology*, 130, 275–305.
<https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2018.01.002>

56. Mackay, J. P., Matthews, J. M., Winefield, R. D., Mackay, L. G., Haverkamp, R. G., & Templeton, M. D. (2001). The hydrophobin EAS is largely unstructured in solution and functions by forming amyloid-like structures. *Structure*, 9(2), 83–91.
[https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(00\)00559-1](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(00)00559-1)

57. Maji, S. K., Perrin, M. H., Sawaya, M. R., Jessberger, S., Vadodaria, K., Rissman, R. A., ... Riek, R. (2009). Functional amyloids as natural storage of peptide hormones in pituitary secretory granules. *Science*, 325(5938), 328–332.
<https://doi.org/10.1126/science.1173155>

58. Mann, K., & Mann, M. (2008). The chicken egg yolk plasma and granule proteomes. *Proteomics*, 8(1), 178–191. <https://doi.org/10.1002/pmic.200700790>

59. Margittai, M., & Langen, R. (2006). Side chain-dependent stacking modulates tau filament structure. *Journal of Biological Chemistry*, 281(49), 37820–37827.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M605336200>

60. Mason, T. O., & Shimanovich, U. (2018). Fibrous Protein Self-Assembly in Biomimetic Materials. *Advanced Materials*, 30(41), e1706462.
<https://doi.org/10.1002/adma.201706462>

61. Maury, C. P. J. (2009). The emerging concept of functional amyloid. *Journal of Internal Medicine*, 265(3), 329–334. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2008.02068.x>

62. Nepomuceno, A. I., Muddiman, D. C., & Petite, J. N. (2015). Global proteomic analysis of functional compartments in immature avian follicles using laser microdissection coupled to LC-MS/MS. *Journal of Proteome Research*, 14(9), 3912–3923.
<https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.5b00346>

63. Nimpf, J., & Schneider, W. J. (1998). The VLDL receptor: An LDL receptor relative with eight ligand binding repeats, LR8. *Atherosclerosis*, 141(2), 191–202.
[https://doi.org/10.1016/S0021-9150\(98\)00172-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9150(98)00172-5)

64. Otoo, H. N., Kyeng, G. L., Qiu, W., & Lipke, P. N. (2008). *Candida albicans* Als adhesins have conserved amyloid-forming sequences. *Eukaryotic Cell*, 7(5), 776–782. <https://doi.org/10.1128/EC.00309-07>
65. Perry, M. M., & Gilbert, A. B. (1979). Yolk transport in the ovarian follicle of the hen (*Gallus domesticus*): Lipoprotein-like particles at the periphery of the oocyte in the rapid growth phase. *Journal of Cell Science*, 39, 257–272.
66. Picken, M. M. (2007). Immunoglobulin light and heavy chain amyloidosis AL/AH: Renal pathology and differential diagnosis. *Contributions to Nephrology*, 153, 135–155. <https://doi.org/10.1159/000096765>
67. Pimentel, R. N., Navarro, P. A., Wang, F., Robinson, L. R. G., Cammer, M., Liang, F., ... Keefe, D. L. (2019). Amyloid-like substance in mice and human oocytes and embryos. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 36(9), 1877–1890. <https://doi.org/10.1007/s10815-019-01530-w>
68. Podrabsky, J. E., Carpenter, J. F., & Hand, S. C. (2001). Survival of water stress in annual fish embryos: Dehydration avoidance and egg envelope amyloid fibers. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 280(1), R123- R131. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.2001.280.1.r123>
69. Polymeropoulos, M. H., Lavedan, C., Leroy, E., Ide, S. E., Dehejia, A., Dutra, A., Pike, B., ... Stenroos, E. S. (1997). Mutation in the alpha-synuclein Gene Identified in Families with Parkinson's Disease. *Science*, 276(5321), 2045–2047.
70. Ramsook, C. B., Tan, C., Garcia, M. C., Fung, R., Soybelman, G., Henry, R., ... Lipke, P. N. (2010). Yeast cell adhesion molecules have functional amyloid-forming sequences. *Eukaryotic Cell*, 9(3), 393–404. <https://doi.org/10.1128/EC.00068-09>
71. Regier, J. C., & Kafatos, F. C. (1985). Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology. In Kerkut, G. A., & Gilbert, L. I. (Eds.), *Insect Science and Its Application*. Pergamon Press, Oxford, New York, 1, 113–151. <https://doi.org/10.1017/s1742758400006792>
72. Réhault-Godbert, S., & Guyot, N. (2018). Vitellogenesis and yolk proteins, birds. In *Encyclopedia of Reproduction*. Academic Press, London, United Kingdom, 6, 278–284. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.20568-2>

73. Retzek, H., Steyrer, E., Sanders, E. J., Nimpf, J., & Schneider, W. J. (1992). Molecular Cloning and Functional Characterization of Chicken Cathepsin D, a Key Enzyme for Yolk Formation. *DNA and Cell Biology*, 11(9), 661–672. <https://doi.org/10.1089/dna.1992.11.661>
74. Rose, M., Winston, F., & Hieter, P. (1989). *Methods in Yeast Genetics – A Laboratory Course Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
75. Ryzhova, T. A., Sopova, J. V., Zadorsky, S. P., Siniukova, V. A., Sergeeva, A. V., Galkina, S. A., ... Galkin, A. P. (2018). Screening for amyloid proteins in the yeast proteome. *Current Genetics*, 64(2), 469–478. <https://doi.org/10.1007/s00294-017-0759-7>
76. Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
77. Saunders, H. M., & Bottomley, S. P. (2009). Multi-domain misfolding: Understanding the aggregation pathway of polyglutamine proteins. *Protein Engineering, Design and Selection*, 22(8), 447–451. <https://doi.org/10.1093/protein/gzp033>
78. Saveanu, L., Fruci, D., & Van Endert, P. M. (2002). Beyond the proteasome: Trimming, degradation and generation of MHC class I ligands by auxiliary proteases. *Molecular Immunology*, 39(3–4), 203–215. [https://doi.org/10.1016/S0161-5890\(02\)00102-5](https://doi.org/10.1016/S0161-5890(02)00102-5)
79. Sergeeva, A. V., Sopova, J. V., Belashova, T. A., Siniukova, V. A., Chirinskaite, A. V., Galkin, A. P., & Zadorsky, S. P. (2019). Amyloid properties of the yeast cell wall protein Toh1 and its interaction with prion proteins Rnq1 and Sup35. *Prion*, 13(1), 21–32. <https://doi.org/10.1080/19336896.2018.1558763>
80. Sergeeva, A. V., & Galkin, A. P. (2020). Functional amyloids of eukaryotes: criteria, classification, and biological significance. *Current Genetics*, 66(5), 849–866. <https://doi.org/10.1007/s00294-020-01079-7>
81. Shen, X., Steyrer, E., Retzek, H., Sanders, E. J., & Schneider, W. J. (1993). Chicken oocyte growth: receptor-mediated yolk deposition. *Cell & Tissue Research*, 272(3), 459–471. <https://doi.org/10.1007/BF00318552>

82. Si, K., Choi, Y. B., White-Grindley, E., Majumdar, A., & Kandel, E. R. (2010). Aplysia CPEB Can Form Prion-like Multimers in Sensory Neurons that Contribute to Long-Term Facilitation. *Cell*, 140(3), 421–435. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.008>
83. Siniukova, V. A., Sopova, J. V., Galkina, S. A., & Galkin, A. P. (2020). Search for functional amyloid structures in chicken and fruit fly female reproductive cells. *Prion*, 14(1), 278–282. <https://doi.org/10.1080/19336896.2020.1859439>
84. Sopova, J. V., Koshel, E. I., Belashova, T. A., Zadorsky, S. P., Sergeeva, A. V., Siniukova, V. A., ... Galkin, A. P. (2019). RNA-binding protein FXR1 is presented in rat brain in amyloid form. *Scientific Reports*, 9(1), 18983. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55528-6>
85. Takegawa, K., Tohda, H., Sasaki, M., Idiris, A., Ohashi, T., Mukaiyama, H., ... Kumagai, H. (2009). Production of heterologous proteins using the fission-yeast (*Schizosaccharomyces pombe*) expression system. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 53(Pt 4), 227–235. <https://doi.org/10.1042/ba20090048>
86. Toyama, B. H., & Weissman, J. S. (2011). Amyloid structure: Conformational diversity and consequences. *Annual Review of Biochemistry*, 80, 557–585. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-090908-120656>
87. Wallace, R. A. (1985). Vitellogenesis and oocyte growth in nonmammalian vertebrates. *Developmental Biology*, 1, 127–177. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-6814-8_3
88. Wessels, J. G. H. (1997). Hydrophobins: Proteins that change the nature of the fungal surface. *Advances in Microbial Physiology*, 38, 1–45. [https://doi.org/10.1016/s0065-2911\(08\)60154-x](https://doi.org/10.1016/s0065-2911(08)60154-x)
89. Wickner, R. B., Shewmaker, F., Edskes, H., Kryndushkin, D., Nemecek, J., McGlinchey, R., ... Winchester, C. L. (2010). Prion amyloid structure explains templating: How proteins can be genes. *FEMS Yeast Research*, 10(8), 980–991. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2010.00666.x>
90. Williams, D. L., Sho-Ya, W., & Capony, F. (1979). Multiple response patterns to oestrogenic stimulation in the avian liver. *Journal of Steroid Biochemistry*, 11(1A), 231–236. [https://doi.org/10.1016/0022-4731\(79\)90302-9](https://doi.org/10.1016/0022-4731(79)90302-9)

91. Wishart, G. J., & Horrocks, A. J. (2000). Fertilization in birds. In J. J. Tarin, & A. Cano (Eds.), *Fertilization in protozoa and metazoan animals: cellular and molecular aspects*. Springer-Verlag, Berlin, Germany, 193–222. https://doi.org/10.1007/978-3-642-58301-8_5
92. Wolfe, L. S., Calabrese, M. F., Nath, A., Blaho, D. V., Miranker, A. D., & Xiong, Y. (2010). Protein-induced photophysical changes to the amyloid indicator dye thioflavin T. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(39), 16863–16868. <https://doi.org/10.1073/pnas.1002867107>
93. Wösten, H. A. B. (2001). Hydrophobins: Multipurpose proteins. *Annual Review of Microbiology*, 55, 625–646. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.55.1.625>
94. Wyburn, G. M., Aitken, R. N., & Johnston, H. S. (1965). The ultrastructure of the zona radiata of the ovarian follicle of the domestic fowl. *Journal of Anatomy*, 99(Pt 3), 469–484.
95. Xia, K., Trasatti, H., Wymer, J. P., & Colón, W. (2016). Increased levels of hyperstable protein aggregates in plasma of older adults. *Age*, 38(3), 56. <https://doi.org/10.1007/s11357-016-9919-9>
96. Yadgary, L., Wong, E. A., & Uni, Z. (2014). Temporal transcriptome analysis of the chicken embryo yolk sac. *BMC Genomics*, 15(1), 690. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-690>
97. Yamamura, J., Adachi, T., Aoki, N., Nakajima, H., Nakamura, R., & Matsuda, T. (1995). Precursor-product relationship between chicken vitellogenin and the yolk proteins: the 40 kDa yolk plasma glycoprotein is derived from the C-terminal cysteine-rich domain of vitellogenin II. *Biochimica et biophysica acta*, 1244(2–3), 384–394. [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(95\)00033-8](https://doi.org/10.1016/0304-4165(95)00033-8)
98. Zarnescu, O. (2004). Ultrastructural observations of previtellogenic ovarian follicles of dove. *Zygote*, 12(4), 285–292. <https://doi.org/10.1017/S0967199404002837>

Благодарности

В заключение хочется искренне поблагодарить моего научного руководителя Алексея Петровича Галкина за чуткое руководство, значимые замечания и помощь в преодолении возникающих трудностей. Отдельную благодарность приношу Татьяне Алексеевне Рыжовой и Сергею Павловичу Задорскому за помощь в освоении методик и ценные практические советы, позволившие выполнить данную научную работу. Благодарю сотрудников ресурсного центра «Развитие молекулярных и клеточных технологий» СПбГУ, центра коллективного пользования СПбГУ «Хромас», а также всех сотрудников лаборатории моделирования болезней человека СПбФ ИОГен РАН.