

*На правах рукописи*

**Синюкова Вера Александровна**

**ПОИСК ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ АМИЛОИДОВ В ЯИЧНИКАХ *GALLUS GALLUS*  
*DOMESTICUS* И *DROSOPHILA MELANOGASTER***

1.5.7 – генетика

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва – 2022

Работа выполнена в лаборатории генетического моделирования болезней человека Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук

**Научный руководитель:**

**ГАЛКИН Алексей Петрович**, доктор биологических наук, профессор, временно исполняющий обязанности директора, заведующий лабораторией генетического моделирования болезней человека Санкт-Петербургского филиала Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук

**Официальные оппоненты:**

**САРАНЦЕВА Светлана Владимировна**, доктор биологических наук, заместитель директора по научной работе, заведующая лабораторией экспериментальной и прикладной генетики Федерального государственного бюджетного учреждения «Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова Национального исследовательского центра «Курчатовский институт»

**САВВАТЕЕВА-ПОПОВА Елена Владимировна**, доктор биологических наук, заведующая лабораторией нейрогенетики Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологии им. И.П. Павлова Российской академии наук

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова»

Защита состоится « » \_\_\_\_\_ в \_\_\_\_\_ часов на заседании диссертационного совета 24.1.088.01 (Д.002.214.01) в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук по адресу: 119991, Москва, ул. Губкина, 3.

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Института [www.vigg.ru](http://www.vigg.ru), тел. 8-499-135-14-31.

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2022 года.

Ученый секретарь диссертационного совета,

доктор биологических наук

Горячева И.И.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### **Актуальность исследования и разработанность темы исследования:**

Амилоиды представляют собой фибриллярные белковые агрегаты, которые формируются за счет образования упорядоченных межмолекулярных бета-складчатых слоёв. Несмотря на разницу в аминокислотной последовательности амилоидогенных белков, все они формируют фибриллы, сходные по структурным характеристикам. Амилоидные агрегаты не растворяются ионными детергентами (такими как SDS) при комнатной температуре, связываются с амилоид-специфическими красителями: тиофлавином T и S, а также конго красным, при связывании с последним амилоидные фибриллы демонстрируют характерное яблочно-зеленое свечение в поляризованном свете [Divry, 1927; Vuxbaum and Linke, 2012].

Традиционно в литературе особое внимание принято уделять преимущественно патологическим амилоидам, ассоциированным с десятками заболеваний человека, многие из которых являются неизлечимыми. Однако в последнее время все чаще рассматриваются функциональные амилоиды, в норме присутствующие в клетках широкого спектра живых организмов и выполняющие жизненно важные функции, от образования биопленки бактерий [Chapman et al., 2002; Vednarska, 2013] и до участия в синтезе меланина у млекопитающих и человека [Fowler, 2006]. Появляется все больше данных, что в норме в ооцитах у самых различных организмов присутствуют функциональные амилоиды.

Важно подчеркнуть, что несмотря на то, что амилоиды перестают ассоциироваться исключительно с нарушением фолдинга белка и последующим развитием той или иной патологии, открытие большинства амилоидов на данный момент является скорее случайностью. В последние годы в оболочках яиц и ооцитов самых различных организмов, как насекомых [Iconomidou, 2000], так и позвоночных [Egge et al., 2015; Voke et al., 2016], были обнаружены амилоиды и амилоидоподобные белки, но их обнаружение в первую очередь связано с изучением конкретного белка или структуры и не носит системный характер.

До недавнего времени не было методик, позволяющих идентифицировать весь спектр амилоидов в исследуемом образце. В нашей лаборатории был разработан универсальный метод протеомного скрининга амилоидов (PSIA-LC-MALDI), основанный на устойчивости амилоидных фибрилл к ионным детергентам [Ryzhova et al., 2018; Sopova et al., 2019; Sergeeva et al., 2021]. С помощью этого метода в рамках данной работы нами был проведен системный скрининг белков яиц и ооцитов таких классических генетических

модельных объектов, как курица *Gallus gallus domesticus* и плодовая мушка *Drosophila melanogaster*.

#### **Цель и задачи исследования:**

Целью данной работы является поиск функциональных амилоидов в яичниках *Gallus gallus domesticus* и *Drosophila melanogaster*.

В соответствии с этой целью были поставлены следующие задачи:

1. Выявить в яичниках исследуемых объектов структуры, которые связывают амилоидспецифичные красители.
2. Провести протеомный скрининг кандидатов на роль функциональных амилоидов в ооцитах *Drosophila melanogaster* и *Gallus gallus domesticus*.
3. Исследовать амилоидные свойства выявленных в протеомном скрининге белков *in vivo*, и *in vitro*.

#### **Научная новизна работы:**

Проведены протеомные скрининги белков в ооцитах *Gallus gallus domesticus* и *Drosophila melanogaster*, на основании которых составлены списки белков-кандидатов на роль функциональных амилоидов. Охарактеризовано связывание различных белковых структур с амилоидспецифичными красителями в ооцитах домашней курицы и плодовой мушки. Установлено, что в ооцитах домашней курицы краситель тиофлавин S специфически связывается с хромосом-ассоциированными и цитоплазматическими структурами, которые не окрашиваются конго красным и не связывают амилоидспецифичные антитела. Впервые были показаны амилоидные свойства для таких давно известных структур оболочки яиц дрозофилы, как микропиле, дорзальные выросты и пилларс. Идентифицирован белок, формирующий функциональные амилоидные фибриллы в специализированных структурах оболочки ооцитов дрозофилы.

#### **Вклад автора:**

Материалы, вошедшие в данную работу, обсуждались и публиковались совместно с соавторами и научным руководителем. Лично автором выполнены сбор материала для работы, пробоподготовка, протеомные скрининги, окрашивания амилоид-специфичными красителями, антителами, а также последующая микроскопия, наработка и очистка данных белков, а также последующая электронная и поляризационная микроскопия.

### **Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Тиофлавин S способен окрашивать белки, которые не демонстрируют классические свойства амилоидов, а именно окрашивание конго красным и связывание с амилоидспецифичными антителами.
2. Амилоидные фибриллы белка s36 являются конститутивным компонентом специализированных структур в оболочке яиц *Drosophila melanogaster*.
3. Секреция белка s36 из фолликулярных и питающих клеток яйца дрозофилы необходима для амилоидной агрегации этого белка и формирования специализированных структур хориона.

### **Теоретическая значимость:**

Проведенное исследование позволило выявить перечень белков, которые можно рассматривать в качестве кандидатов на роль функциональных амилоидов в яйцах и яичниках таких классических генетических модельных объектов, как курица *Gallus gallus domesticus* и плодовая мушка *Drosophila melanogaster*. Теоретическая значимость полученных результатов определяется несколькими факторами. Показано, что тиофлавин S может связывать белковые структуры, которые не окрашиваются другим амилоидным красителем конго красным, и не распознаются амилоидспецифичными антителами. Таким образом, наши данные показывают, что тиофлавин S следует использовать с осторожностью при выявлении и идентификации амилоидных белков. Основным результатом работы является идентификация белка, формирующего амилоидные фибриллы, которые являются основным компонентом для формирования жизненно-важных структур в оболочке яйца дрозофилы. Сопоставление полученных результатов с данными из литературных источников позволяет сделать заключение о полифилетическом происхождении и функциональной значимости амилоидных структур в оболочках яиц и яйцеклеток различных животных.

### **Апробация работы:**

Основные положения и результаты диссертации были представлены на 5 российских и международных конференциях: 6th International Conference on Brain Disorders and Therapeutics (Copenhagen, Denmark, 2018); 4-й ежегодной конференции Института Трансляционной Биомедицины СПбГУ «Актуальные проблемы трансляционной биомедицины - 2018» (Санкт-Петербург, 2018); Международном Конгрессе «VII Съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров, посвященный 100-летию кафедры генетики СПбГУ, и ассоциированные симпозиумы» (Санкт-Петербург, 2019); Научно-

практической конференции с международным участием «Генетика – фундаментальная основа инноваций в медицине и селекции». Ростов-на-Дону, 2019); XX Зимней молодежной школе ПИЯФ по биофизике и молекулярной биологии (Гатчина, 2019).

#### **Публикации по теме исследования:**

По теме исследования опубликовано 6 статей в журналах, включенных в международные базы данных Scopus и Web of Science, а также 10 тезисов в сборниках российских и международных конференций, входящих в РИНЦ.

#### **Структура и объем диссертационной работы:**

Диссертация включает в себя следующие главы: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты», «Обсуждение результатов», «Выводы» и «Список использованной литературы». Работа изложена на 97 страницах машинописного текста, содержит 17 рисунков и 4 таблицы. Список цитируемой литературы включает 144 наименований (из них 143 – на английском языке).

### **ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ**

Глава «Обзор литературы» диссертационной работы содержит 5 подразделов, посвященных разнообразию патологических и функциональных амилоидов. Рассмотрены биохимические характеристики амилоидов, а также разнообразие функциональных амилоидов у представителей различных организмов, отдельно описаны функциональные амилоиды в оогенезе и представлена информация об оогенезе модельных объектов *Gallus gallus domesticus* и *Drosophila melanogaster*, используемых в данной работе.

### **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

Экспериментальным материалом для исследования служили яичники куриц *Gallus gallus domesticus* породы Русская белая и самок *Drosophila melanogaster* линии Oregon R, а так же линии y[1] cv[1] Cp36[dec2-1] v[1] f[1]/FM0 (BL:4842), приобретенной в Bloomington Drosophila Stock Center (Indiana, USA).

#### **Пробоподготовка:**

Криосрезы яичников *Gallus gallus domesticus* и *Drosophila melanogaster* были получены с использованием криотома CM1850UV (Leica Microsystems, Германия). Хромосомы типа ламповых щёток выделяли микрохирургическим способом из превителлогенных ооцитов половозрелых куриц в соответствии со стандартной методикой [Saifitdinova, et al. 2017].

### **Цитологические, биохимические и протеомные методы:**

Окрашивания амилоид-специфичными красителями, иммунохимический анализ, иммуногистохимический анализ, а также наработку и очистку рекомбинантного белка проводили по стандартному протоколу [Sorova et al., 2019]. В работе использовали первичные антитела, специфичные к белкам s36 и s38 *Drosophila melanogaster* и Vtg2 *Gallus gallus domesticus*. Протеомные скрининги были проведены по стандартной методике, разработанной в нашей лаборатории и успешно апробированной ранее [Ryzhova et al., 2018; Sorova et al., 2019].

### **Биоинформатический анализ:**

Биоинформатический анализ аминокислотных последовательностей проводился с использованием программ ArchCandy [Ahmed et al., 2013] и Waltz [Oliveberg M., 2010].

### **Штаммы микроорганизмов:**

В данной работе использовали штаммы *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (генотип: supE44  $\Delta$ lacU169 ( $\phi$ 80lacZ $\Delta$ M15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1), XL10-Gold (генотип: endA1 glnV44 recA1 thi-1 gyrA96 relA1 lac Hte  $\Delta$ (mcrA)183  $\Delta$ (mcrCB-hsdSMR-mrr)173 tetR F'[proAB lacIqZ $\Delta$ M15 Tn10(TetR Amy CmR)]), Rosetta (генотип: E. coli str. B F- ompT gal dcm lon? hsdSB(rB-mB-)  $\lambda$ (DE3 [lacI lacUV5-T7p07 ind1 sam7 nin5]) [malB+]K-12( $\lambda$ S) pLysSRARE[T7p20 ileX argU thrU tyrU glyT thrT argW metT leuW proL orip15A])(CmR)) и NiCo21(DE3) (генотип: can::CBD fhuA2 [lon] ompT gal ( $\lambda$  DE3) [dcm] arnA::CBD slyD::CBD glmS6A1a  $\Delta$ hsdS  $\lambda$  DE3 =  $\lambda$  sBamHIo  $\Delta$ EcoRI-B int::(lacI::PlacUV5::T7 gene1) i21 $\Delta$ nin5).

### **Стандартные генно-инженерные методы:**

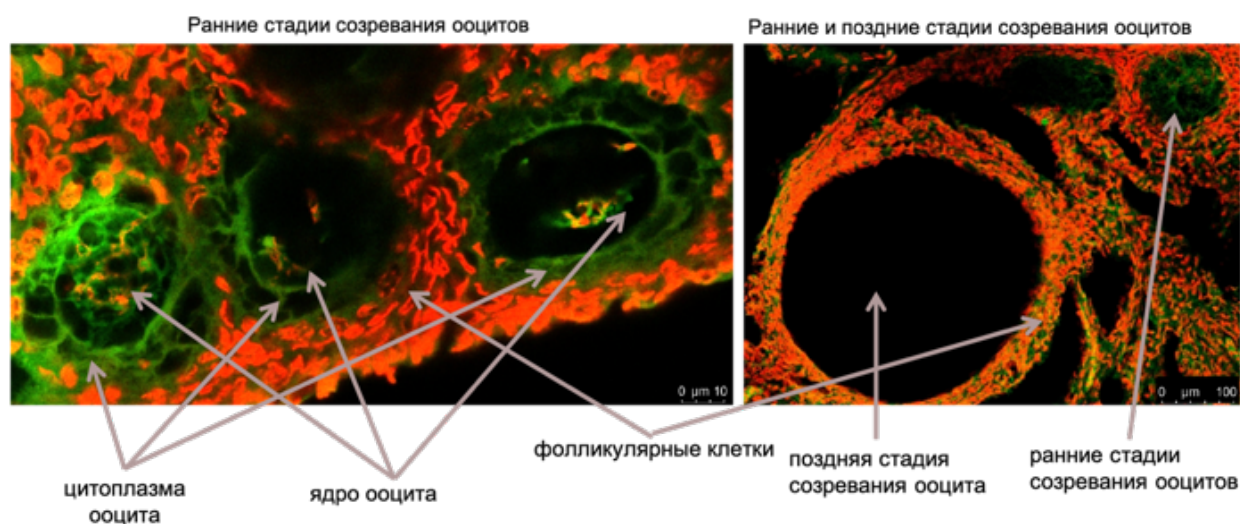
Выделение тотальной РНК из гомогенизированной ткани печени *Gallus gallus domesticus* (белок Vtg2 синтезируется в печени) и яичников *Drosophila melanogaster* проводилось тризольным методом. Синтез кДНК проводился на основе вышеупомянутой тотальной РНК, полученную кДНК использовали для амплификации интересующих фрагментов с помощью ПЦР. Амплификация проводилась в амплификаторе «Терцик» («ДНК-Технология», РФ). Для рестрикции последовательностей были использованы эндонуклеазы рестрикции XhoI, XbaI и BamHI. Лигирование генов в векторы pJET 1.2, pET302 и pET303 осуществляли с использованием T4 ДНК-лигазы («Fermentas», Литва) по сайтам XhoI и BamHI (для Vtg2), и XhoI и XbaI (для ch36). Трансформацию бактерий *E. coli* проводили по стандартной методике [Inoue et al., 1990]. Выделение плазмидной ДНК из *E. coli* осуществляли при помощи метода щелочного лизиса [Sambrook et al., 1989].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### 1. Поиск амилоидных структур в яичниках *Gallus gallus domesticus*

*Цитологическое окрашивание яичников куриц амилоидспецифичными красителями.*

Из фиксированных яичников были подготовлены препараты и изготовлены криосрезы. Данные криосрезы были окрашены амилоид-специфичным красителем тиофлавин S и ДНК-связывающим красителем То-Pro (рис. 1).

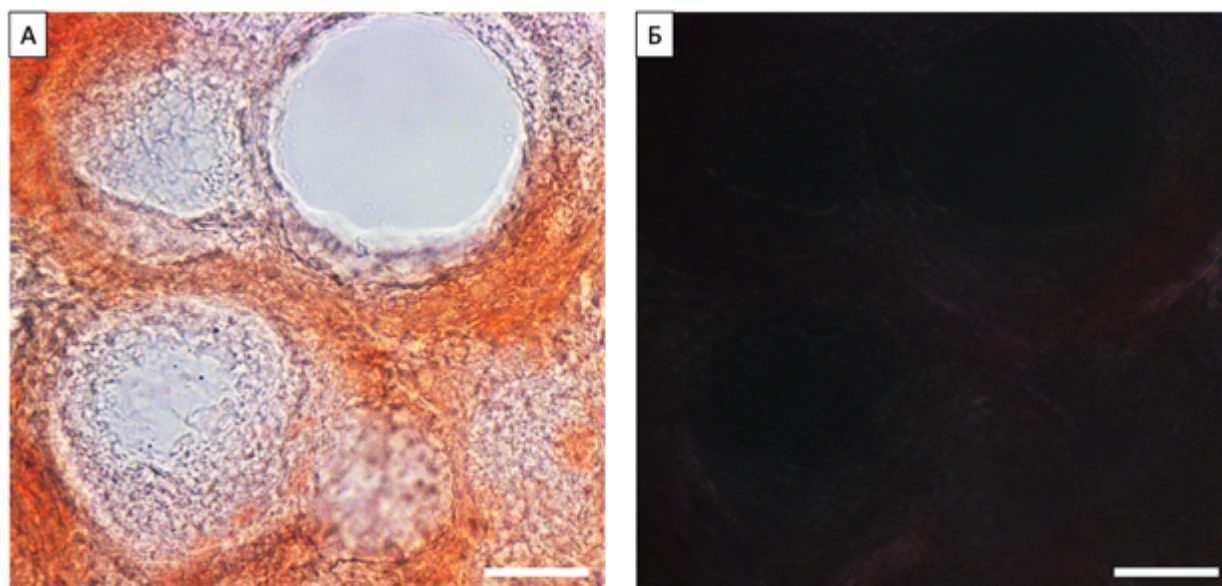


**Рисунок 1.** Криосрезы яичника курицы окрашены красителем То-Pro, связывающим ДНК, и амилоид-специфичным красителем тиофлавин S.

На рисунке видно, что на ранних стадиях созревания ооцита курицы в цитоплазме и ядре ооцитов выявляются структуры, которые окрашиваются амилоид-специфичным красителем тиофлавин S (зелёный цвет). Ядра окружающих клеток и ядра ооцитов окрашены красным красителем То-Pro. На поздних стадиях созревания тиофлавин-позитивные структуры в ооците не выявляются.

Яичники куриц также окрашивали другим амилоидспецифичным красителем – конго красный. Полученные данные представлены на рисунке 2. В отличие от тиофлавина S, в ооцитах на ранних стадиях развития специфического окрашивания конго красным и жёлто-зелёного свечения в поляризованном свете не отмечается (рис. 2). Окрашивание конго красным и двойное лучепреломление (жёлто-зелёное свечение) после такого окрашивания принято считать основным критерием при выявлении амилоидных структур [Howie et al., 2008; Benson et al., 2020]. На основании полученных нами данных можно предположить, что тиофлавин S связывает какие-то белковые, возможно фибриллярные структуры, неамилоидной природы. Отметим, что способность тиофлавина S связывать неамилоидные структуры ранее в литературе не отмечалась.





**Рисунок 2** Окрашивание криосрезов яичников курицы конго красным. А, Б – окрашивание криосрезов ооцитов курицы на ранних стадиях созревания амилоид-специфичным красителем конго красный; А – светлое поле, Б – поляризованный свет.

Помимо цитологических окрашиваний мы провели протеомный скрининг белков, формирующих в яичниках куриц амилоидоподобные SDS-устойчивые агрегаты. Белки яичника куриц, идентифицированные в четырех скринингах, представлены в таблице 1. Следует учитывать, что SDS-устойчивость может быть свойственна не только амилоидным фибриллам, но и некоторым другим белковым агрегатам и комплексам. Таким образом, выявленные в протеомном скрининге белки можно рассматривать лишь в качестве кандидатов на роль функциональных амилоидов.

**Таблица 1.** Белки идентифицированные в яичнике курицы методом протеомного скрининга амилоидов

Белок	Функция	Источник
VTG2	Предшественники запасяющих белков желтка, необходимых на ранних стадиях развития организма.	Amo et al., 2010, J. Agric. Food Chem
PDS5	Регулирует разделение сестринских хроматид в митозе, предположительно стабилизирует взаимодействие когезинового комплекса с хроматином.	Losada et al., 2005, Journal of Cell Science

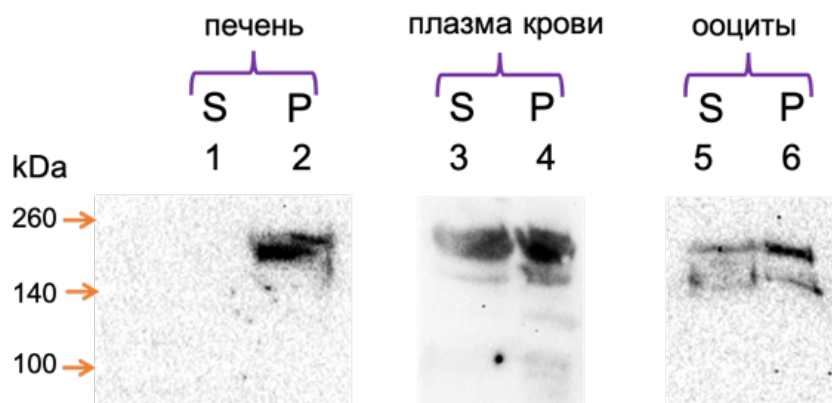
SMC5	Является основным компонентом комплекса SMC5-SMC6, участвующего в репарации двунитевых разрывов в ДНК при гомологичной рекомбинации.	Stephan et al., 2011, Molecular and Cellular Biology
PRPF3	Играет роль в сплайсинге пре-мРНК, являясь компонентом комплекса U4/U6-U5 tri-snRNP, вовлеченного в сборку сплайсосом.	Song et al., 2010, Genes & Development
CHD7	Является регулятором транскрипции. Возможно, вовлечен в продукцию предшественника 45S рРНК.	Aramaki et al., 2007, Birth Defects Research
HS90A	Молекулярный шаперон, участвующий в созревании, поддержании структуры и правильной регуляции специфичных белков, вовлеченных, например, в контроль клеточного цикла и сигнальную трансдукцию.	Zhang et al., 2017, Journal of Veterinary Science
HSP7C	Молекулярный шаперон, вовлеченный в различные клеточные процессы, включая защиту протеома от стресса, фолдинг и транспорт синтезированных полипептидов, активацию протеолиза неправильно свёрнутых белков, а также формирование и диссоциацию белковых комплексов. Играет ключевую роль в системе контроля качества белка.	de la Rosa et al., 1998, Developmental Biology

На рисунке 1 видно, что на ранних стадиях созревания ооцита в фолликулярных клетках, а также в цитоплазме и ядрах ооцитов выявляются структуры, которые окрашиваются амилоид-специфичным красителем тиофлавином S (зелёный цвет). Сигнал локализации тиофлавина S в фолликулярных клетках и в цитоплазме ооцита располагается там же, где согласно литературным данным, локализуется вителлогенин. В ходе развития ооцитов везикулы с VTG2 расщепляются, что также соответствует нашим данным цитологического окрашивания, согласно которым тиофлавин-позитивные структуры выявляются только в ранних ооцитах (рис. 1).

#### *Анализ амилоидоподобных свойств белка Vtg2*

В связи с тем, что белок Vtg2 синтезируется в печени и транспортируется в ооциты с током крови, мы оценили агрегацию этого белка в печени, крови и яйчниках куриц.

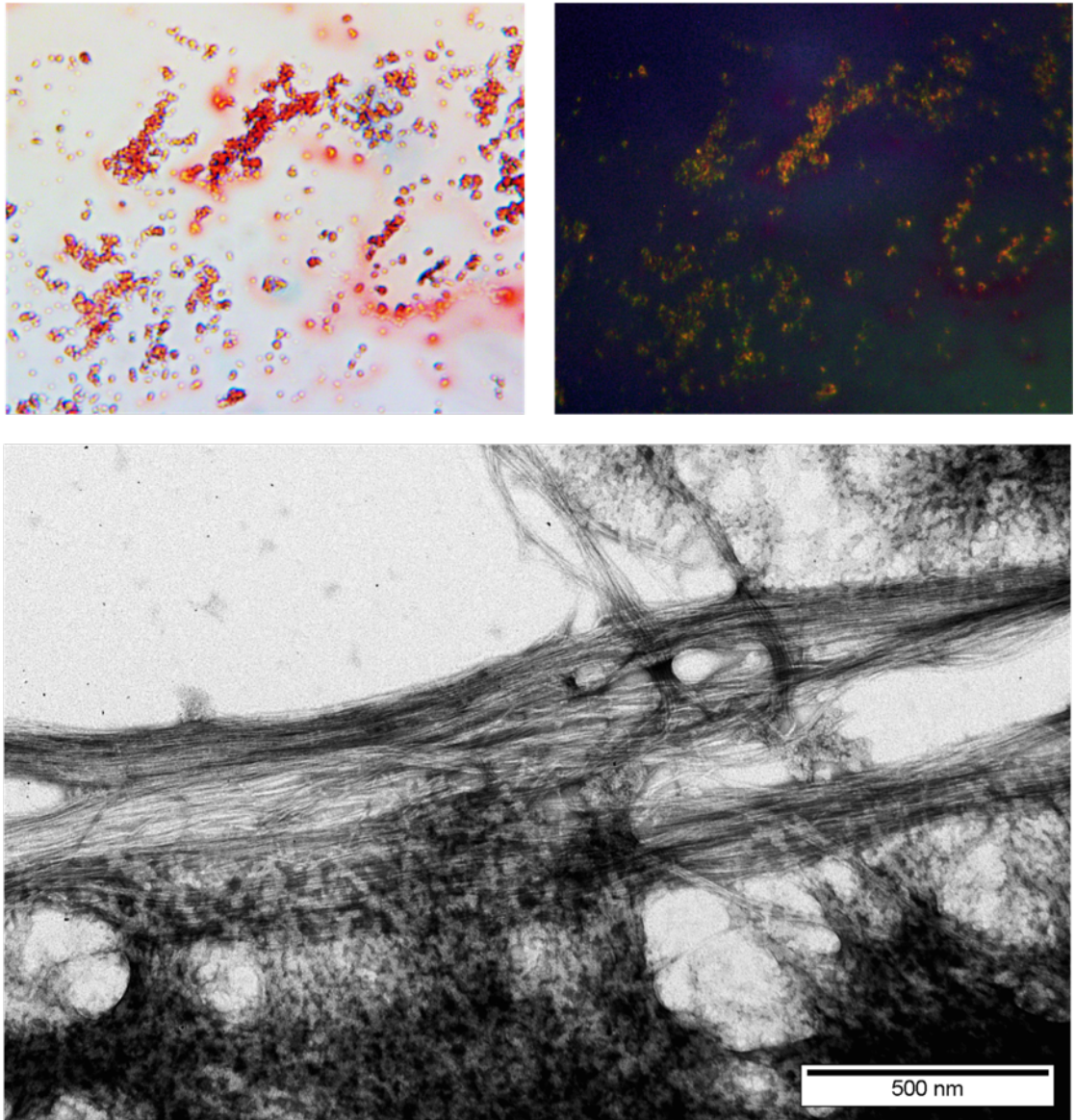
Полученные результаты показывают, что Vtg2 присутствует в плазме крови и ооцитах как в мономерном, так и в агрегированном состоянии, в печени – только в агрегатах (рис. 3).



**Рисунок 3.** Vtg2 присутствует в плазме крови и ооцитах как в мономерном, так и в агрегированном состоянии, в печени – только в агрегатах (S – супернатант, P – осадок).

В результате биоинформатического анализа последовательности вителлогенина с использованием программы ArchCandy [Ahmed et al., 2013] был выявлен ряд потенциально амилоидогенных регионов на всей протяженности аминокислотной последовательности белка. На основе полученных данных был выбран фрагмент белка для наработки *in vitro* и последующего анализа амилоидогенных свойств. Данный фрагмент (696–1019 а.к.) на относительно небольшой протяженности содержит ряд предсказанных потенциально амилоидогенных регионов.

Для анализа амилоидных свойств выбранного фрагмента вителлогенина была сконструирована плазида для продукции в клетках *E. coli* фрагмента Vtg2 (696–1019 а.к.), фланкированного последовательностью 6xHis. При продукции в *E. coli* исследуемый белок выявлялся в тельцах включения. Белок, полученный при разрушении телец-включений, детектируется с помощью электронной микроскопии в виде фибрилл, окрашивается амилоидспецифичным красителем кого красный и демонстрирует жёлто-зелёное свечение в поляризованном свете (рис.4). На основании полученных данных можно сделать заключение, что фрагмент Vtg2 (696–1019 а.к.) формирует амилоидные фибриллы *in vitro*. Вместе с тем данные, полученные *in vitro*, не позволяют сделать вывод, что Vtg2 формирует амилоидные агрегаты *in vivo* в организме курицы.



**Рисунок 4.** Анализ рекомбинантного фрагмента 2 вителлогенина. Очищенные тельца-включения, содержащие целевой белок, при окрашивании конго красным демонстрируют двойное лучепреломление в поляризованном свете (А – светлое поле, Б – поляризованный свет), а также формируют фибриллы (В – электронная микроскопия).

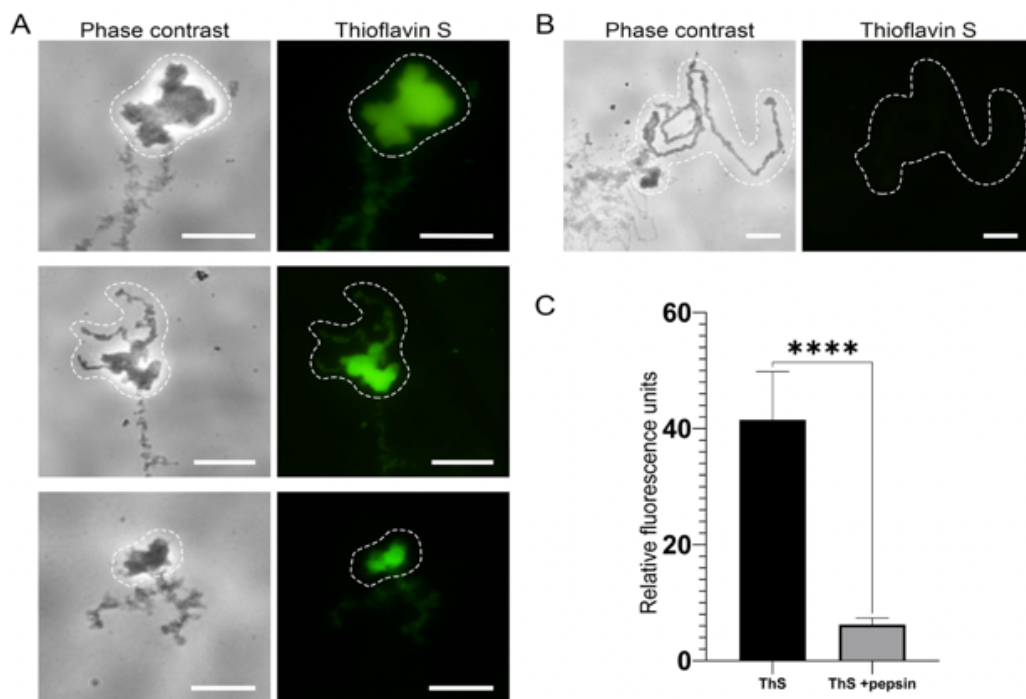
*Анализ окрашивания амилоидспецифичными красителями хромосом типа ламповых щеток*

Так как в протеомных скринингах были выявлены ядерные белки, а при окрашивании тиофлавином S на ранних стадия развития ооцитов детектировались ядерные структуры, нами было принято решение окрасить непосредственно препараты хромосом типа ламповых щеток, формирующихся в ооцитах.

Тиофлавин S ярко окрашивает петли GITERA - giant terminal RNP aggregates, представляющие собой гигантские РНП-агрегаты (рис. 5А) [Kulikova et al., 2015]. Чтобы



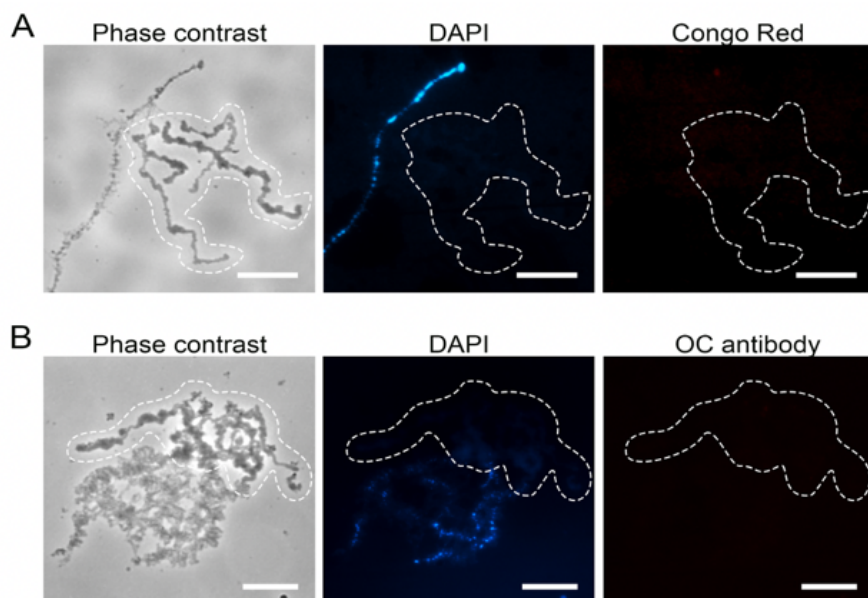
убедиться, что тиофлавин S связывает именно белки, мы обработали препараты хромосом типа ламповых щеток пепсином. Данные, представленные на рисунке 5B,C, показывают, что после обработки пепсином, который расщепляет молекулы белка, тиофлавин S не связывается с хромосомами. Таким образом, можно сделать вывод, что данный краситель окрашивает именно белковые компоненты GITERA.



**Рисунок 5.** Хромосомы типа ламповых щеток, окрашенные амилоид-специфическим красителем тиофлавин S. (A) Тиофлавин S специфически связывает GITERA; (B) GITERA не связывают тиофлавин S после обработки пепсином. Область локализации GITERA обведена пунктирной линией. Масштабные линейки - 10 мкм; (C) Сравнительный анализ окрашивания GITERA тиофлавином S на хромосомах типа ламповых щеток с обработкой пепсином и без нее (серый и черный столбец, соответственно). Относительная интенсивность флуоресценции тиофлавина S представлена как среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка среднего. Относительная количественная оценка была определена с помощью программы ImageJ. Статистический анализ проводился с использованием критерия Манна-Уитни (\*  $p < 0,1$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ) с помощью Prism.

Как уже было упомянуто ранее, на данный момент золотым стандартом для идентификации амилоидов является окрашивание конго красным, поэтому мы провели окрашивание препаратов хромосом типа ламповых щеток данным красителем, а также

антиамилоидными конформационно-зависимыми антителами ОС. Хромосомы дополнительно окрашивали DAPI, который ярко окрашивал ось хромосомы, но его флуоресценция практически не обнаруживалась в областях локализации обогащенных РНК GITERA (рис. 6). Конго красный, а также амилоидспецифичные антитела не окрашивали GITERA (рис. 6). Учитывая тот факт, что конго красный специфически связывает любую кросс-β- структуру, мы можем сделать вывод, что тиофлавин S окрашивает связанные с хромосомами белки, не обладающие амилоидными свойствами.

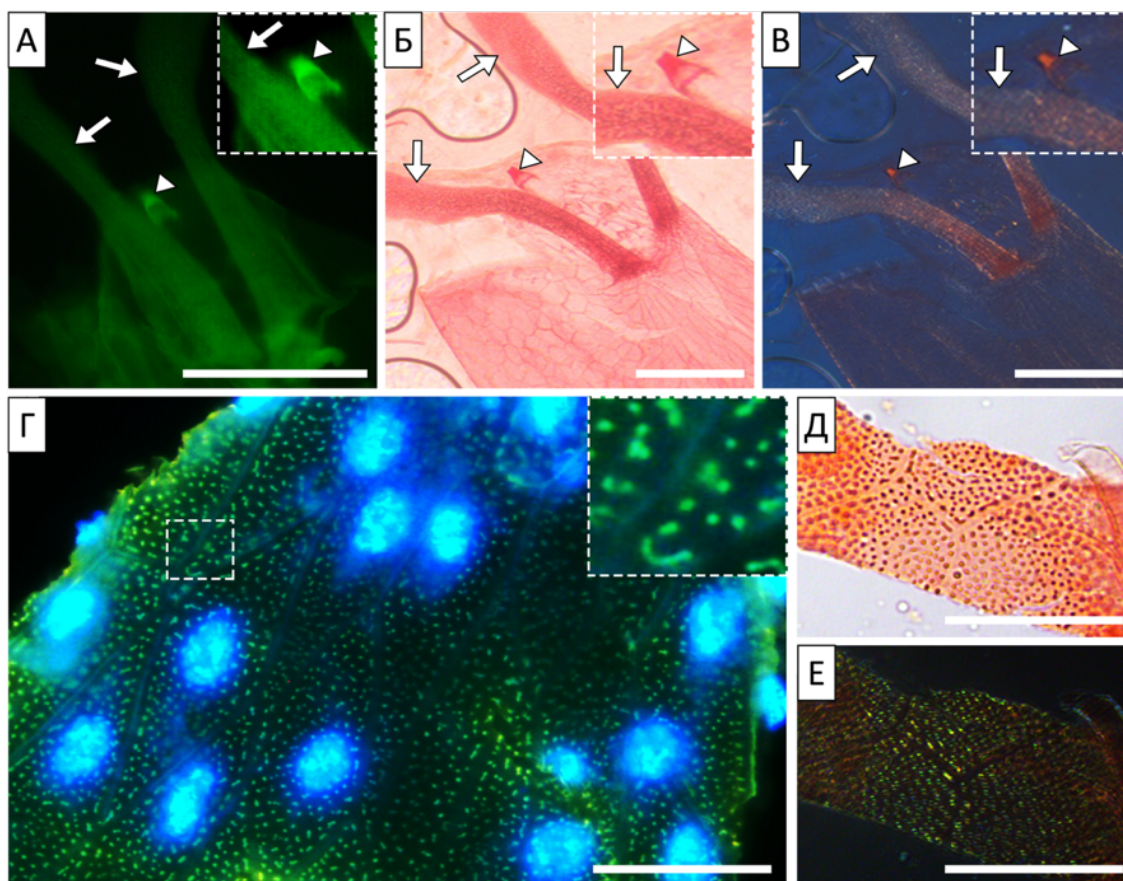


**Рисунок 6.** Хромосомы типа ламповых щеток после окрашивания амилоид-специфическим красителем конго красный (А) и конформационно-зависимыми антителами против амилоидных фибрилл ОС (В). Область локализации GITERA обведена пунктирной линией. Масштабные линейки - 10 мкм.

## 2. Поиск амилоидных структур в яичниках *Drosophila melanogaster*

### Окрашивание яиц *Drosophila melanogaster* амилоидспецифичными красителями

Криосрезы яичников *Drosophila melanogaster* были окрашены амилоид-специфичными красителями тиофлавин S и конго красный (рис. 7). Данные красители интенсивно окрашивают отдельные структуры хориона дрозофилы, а именно микропиле, дорзальные выросты (они же – плавательные усики) (рис. 7А–В) и пилларс – столбики (рис. 7Г–Е). Эти структуры, окрашенные конго красным, также демонстрируют желто-зеленое двойное лучепреломление, что является характерным признаком амилоидов (рис. 7Е). Все эти специализированные структуры хориона играют важную роль в развитии яиц насекомых.



**Рисунок 7.** Окрашивание хориона яиц дрозофилы амилоид-специфичными красителями. Наиболее интенсивно связывают красители дорзальные выросты хориона (стрелки) и микропиле (наконечники стрелок). А, Г – окрашивание яиц дрозофилы амилоид-специфичным красителем тиофлавин S; Г – дополнительное окрашивание ядерным красителем DAPI. Б, В, Д, Е – окрашивание хориона яиц дрозофилы амилоид-специфичным красителем Конго красный; Б, Д – светлое поле, В, Е – поляризованный свет. Масштабные линейки: А–В 50 мкм; Г–Е 20 мкм.

#### *Протеомный скрининг амилоидных белков в яичниках *Drosophila melanogaster**

После того, как стало понятно, что в яичниках *Drosophila melanogaster* есть структуры, связывающие амилоид-специфичные красители, нами было проведено четыре протеомных скрининга яичников для идентификации белков, образующих эти структуры. В результате протеомных скринингов с наибольшим счетом масс-спектрометрии были выявлены мажорные белки хориона. Всего известно шесть мажорных белков [Cavaliere et al., 2008] и все они были выявлены во фракции детергент устойчивых агрегатов (табл. 2). С наибольшим счётом во всех четырёх случаях выявлялся мажорный белок хориона s36.

**Таблица 2.** Белки хориона, выявленные при протеомном скрининге яичников *Drosophila melanogaster*

Белок	Score 1	Score 2	Score 3	Score 4*
Chorion protein s36	1531,6	1802,7	868,8	903,1
Chorion protein s19	1085,8	1015,8	735,4	654,9
Chorion protein s38	836,6	626,5	314,1	103,5
Chorion protein s15	720,1	772,1	467,2	439,5
Chorion protein s18	667,8	492,1	74,7	-
Chorion protein s16	532,1	315,1	195,1	-

Показатель «score» 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.

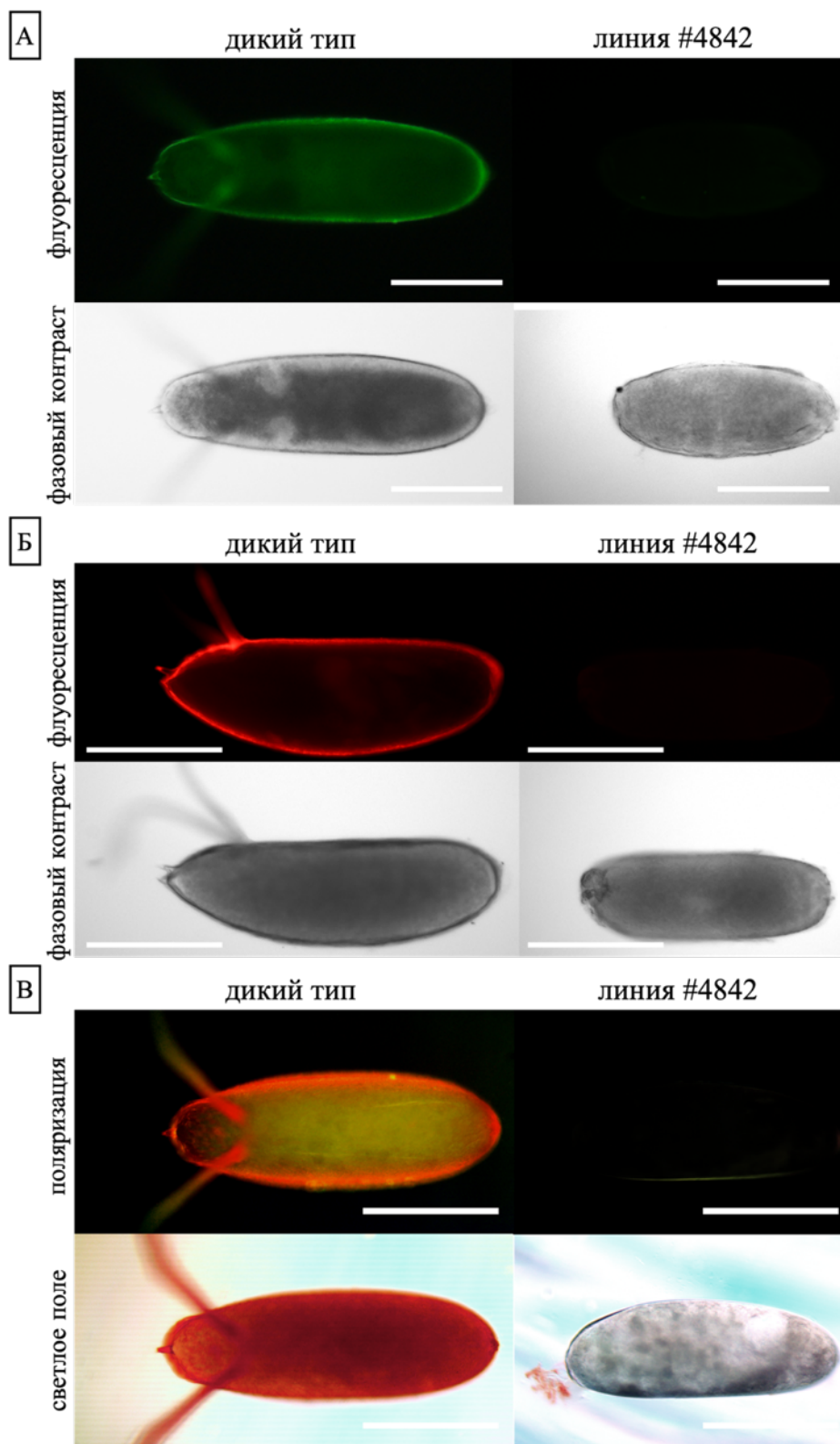
\* скрининг с дополнительной обработкой гомогената яичников хитиназой

*Сравнительный анализ окрашивания амилоидспецифичными красителями яиц дрозофил дикого типа и яиц дрозофил линии #4842, у которых не формируются специализированные структуры хориона.*

Как показали наши исследования, амилоидспецифичные красители окрашивают специализированные структуры хориона (пилларс, микропиле и плавательные усики). На основании анализа литературных данных мы установили, что эти структуры не формируются в яйцах самок линии #4842, гомозиготных по неохарактеризованной хромосомной перестройке в районе 7F X хромосомы [Spradling et al., 1979; Spradling, 1981]. Эта хромосомная перестройка в гомозиготе приводит к стерильности и поддерживается в гетерозиготе с балансёрной хромосомой. Дрозофилы этой линии были заказаны в Bloomington Drosophila Stock Center (USA).

Был проведён сравнительный анализ окрашивания амилоидспецифичными красителями яиц дрозофил линии Oregon R (дикий тип) и линии #4842. Результаты окрашиваний показывают, что оболочка яиц мутантных мух, в отличие от мух дикого типа, не связывает конго красный, а также тиофлавин S (рис 8).



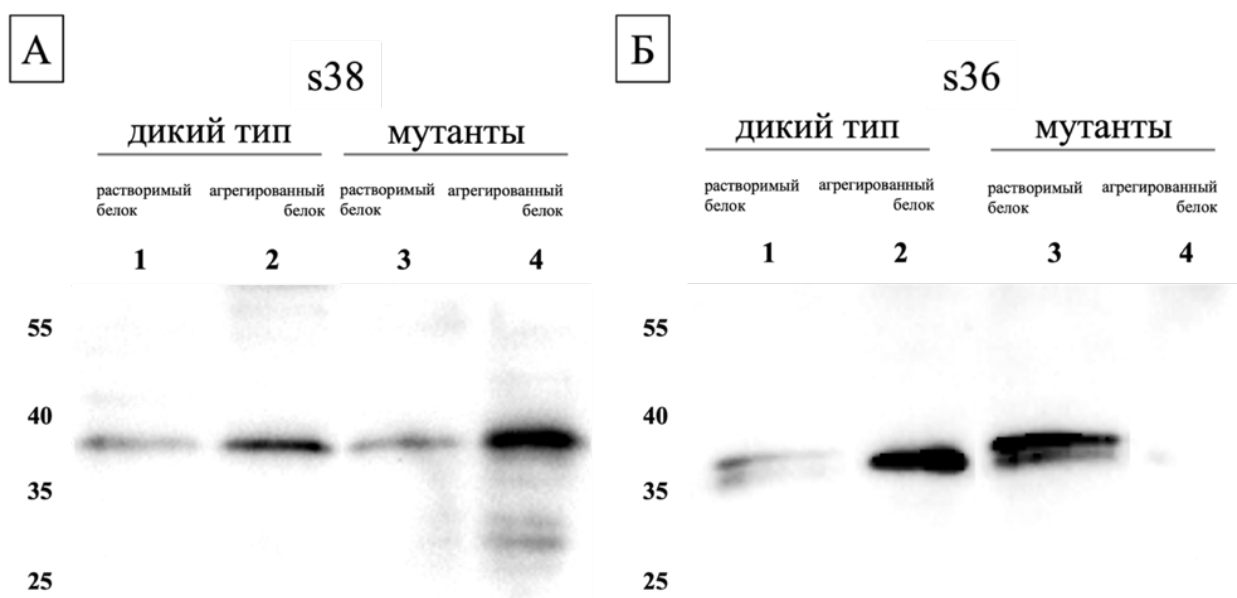


**Рисунок 8.** Окрашивание яиц дрозофил дикого типа и мутантов (линия #4842 BDSC) амилоид-специфичными красителями, хорион мутантных мух не связывает амилоид-специфичные красители. А – окрашивание яиц дрозофилы амилоид-специфичным красителем тиофлавин S. Б, В – окрашивание хориона яиц дрозофилы амилоид-специфичным красителем конго красный. Б – флуоресценция красителя, В – связывание красителя в светлом поле и поляризация.

Таким образом, наиболее вероятным является предположение, что белок, формирующий амилоидные структуры в хорионе яиц дрозофилы, кодируется геном, расположенном в районе 7F X хромосомы. В данном районе охарактеризовано девять рамок считывания и пять из них кодируют белки хориона – Cr7Fa, Cr7Fb, Cr7Fc, s36 и s38. Белки Cr7Fa, Cr7Fb и Cr7Fc являются минорными, и их функциональная роль в формировании хориона не охарактеризована. s36 и s38 являются мажорными белками хориона. Известно, что при нарушении их продукции не формируются специализированные структуры хориона [Velentzas et al, 2016; Velentzas et al, 2018]. Более того, белки s36 и s38 согласно данным протеомного скрининга (таблица 2) формируют детергент-устойчивые агрегаты, что характерно для амилоидов. На основании этих данных можно заключить, что белки s36 и s38 являются наиболее перспективными кандидатами на роль функциональных амилоидов.

*Анализ агрегации белков s36 и s38, а также их колокализации с амилоидспецифичным красителем.*

С помощью вестерн-блоттинга мы провели сравнительный анализ агрегации белков s36 и s38 в яйцах мух дикого типа и у особей из линии #4842, гомозиготных по хромосомной перестройке в районе 7F (рис. 9). Оба белка продуцируются как у мух дикого типа, так и мух с хромосомной перестройкой. Однако, в случае белка s38 и у мух дикого типа, и у мутантов белок в основном находится в агрегированной форме (рис. 9А), тогда как в случае белка s36 видна разница – у мух дикого типа белок s36 присутствует в основном в агрегированном состоянии, тогда как у мутантных мух этот белок находится в растворимой фракции (рис. 9Б). Таким образом, на фоне хромосомной перестройки в районе 7F белок s36 не агрегирует и специализированные структуры хориона, содержащие амилоидные фибриллы, не формируются. Эти данные позволяют обосновано полагать, что именно белок s36 формирует амилоидные агрегаты в хорионе дрозофилы.

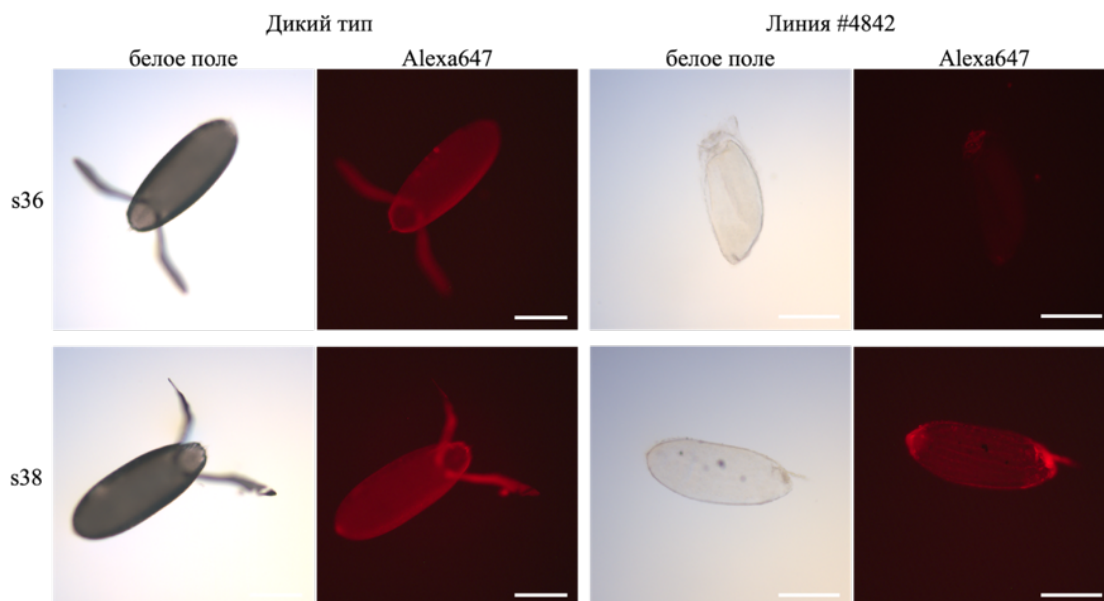


**Рисунок 9.** Анализ распределения белков хориона у мух дикого типа и у мутантов (линия #4842 BDSC). А – белок s38 присутствует и у мух дикого типа, и у мутантных мух преимущественно в агрегированном состоянии; Б - белок s36 присутствует у дикого типа преимущественно в агрегированном состоянии, а у мутантных мух – в растворимом.

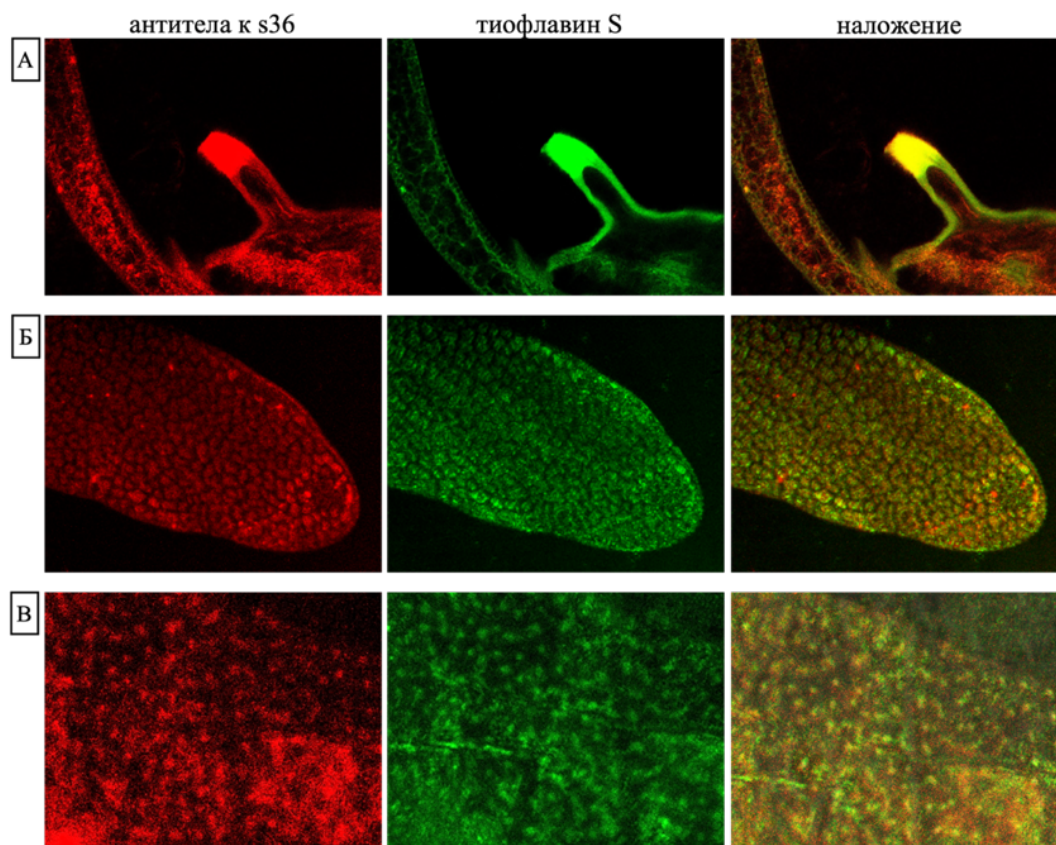
Были проведены иммуноцитологические окрашивания оболочек яиц дрозофил дикого типа и с хромосомной перестройкой в районе 7F антителами к белкам s36 и s38. Полученные результаты (рис. 10) демонстрируют, что белок s38 представлен в хорионе как мух дикого типа, так и мутантов. Антитела к белку s36 связываются с хорионом мух дикого типа, но не связываются с оболочкой яиц мух с хромосомной перестройкой в районе 7F (рис. 10). На основании этих результатов можно заключить, что хромосомная перестройка препятствует секреции s36 из фолликулярных и питающих клеток в хорион. Выявление фактора, препятствующего секреции белка s36 во внешнюю оболочку яйца является предметом дальнейших исследований.

На следующем этапе работы мы оценили возможную колокализацию s36 с тиофлавином S. Проведённый анализ показал, что антитела к белку s36 окрашивают микропиле, пилларс и плавательные усики и колокализуются с амилоидспецифичным красителем тиофлавин S (рис. 11).

На основании на основании данных биохимических и цитологических исследований можно сделать вывод, что именно белок s36 формирует амилоидные фибриллы, которые представляют собой конститутивные компоненты специализированных структур хориона.



**Рисунок 10.** Окрашивание оболочек яиц дрозофил дикого типа и мутантов (линия #4842 BDSC) антителами к белкам s36 и s38, хорион мутантных мух окрашивается антителами к s38, однако не связывает антитела к белку s36.



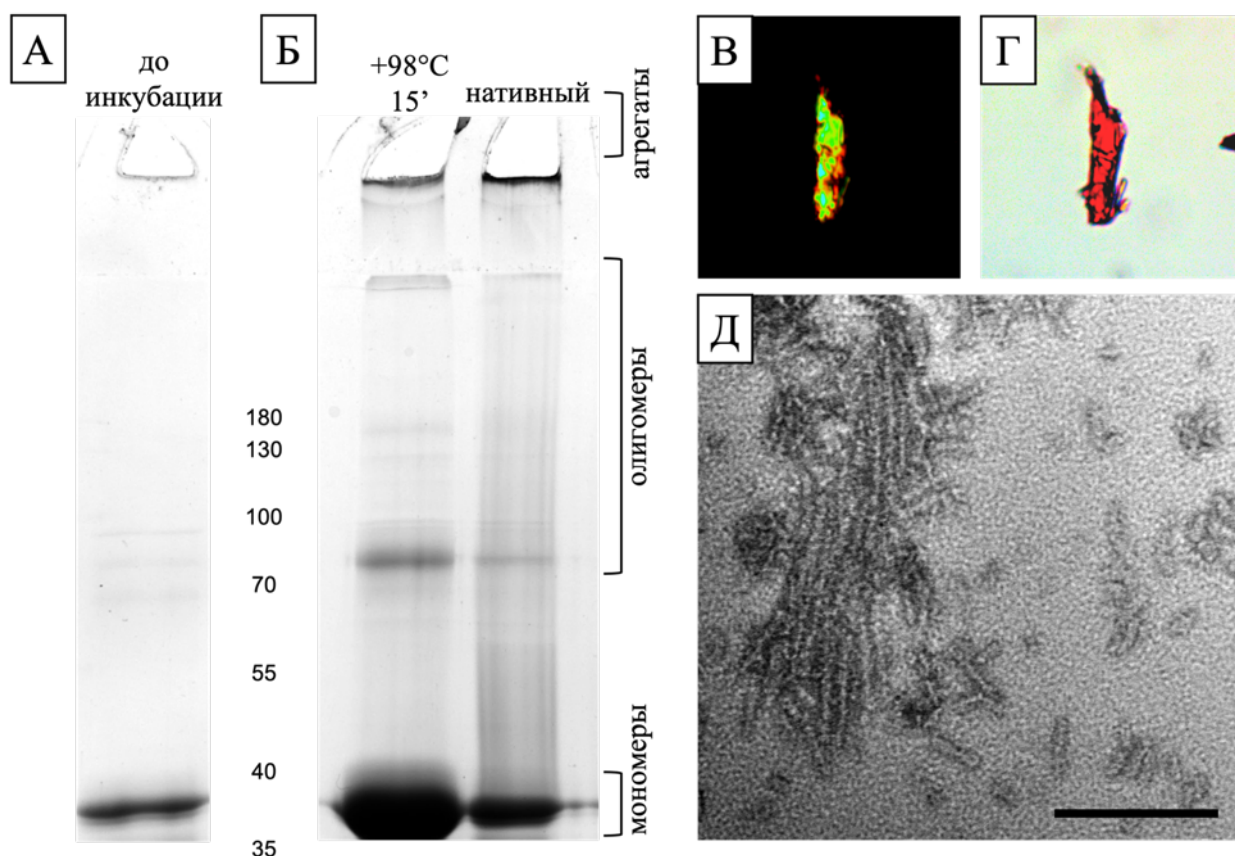
**Рисунок 11.** Антитела к белку s36, конъюгированные со вторичными антителами Alexa Fluor® 647, Goat anti-Rabbit IgG (Thermo Fisher Scientific, США), колоколизуются с амилоид-специфичным красителем тиофлавином S. Антитела и тиофлавин S связывают специализированные структуры оболочки яиц *Drosophila melanogaster*, а именно: А – микропиле, Б – дорзальные выросты, В – пилларс.

### *Анализ амилоидных свойств белка s36 in vitro*

Доказательство амилоидных свойств белка предполагает использование целого комплекса протеомных, биохимических и цитологических методов. Помимо исследований, подтверждающих амилоидные свойства s36 *in vivo*, необходимо проанализировать способность этого белка в экспериментах *in vitro*. В данной работе было показано, что полноразмерный белок s36 (без секреторного пептида) при инкубации в условиях близких к физиологическим формирует фибриллы, которые детектируются при помощи электронной микроскопии и обладают типичными амилоидными характеристиками (связывание конго красного и двойная рефракция в поляризованном свете) (рис. 12).

Все упомянутые структуры (пилларс, микропиле, плавательные усики хориона) играют важную роль в развитии яиц насекомых. Дыхательные дорзальные выросты позволяют яйцам осуществлять газообмен, когда они находятся под водой. Пилларс также предположительно способствуют газообмену [Cavaliere et al., 2008]. Самое интересное, что микропиле, обеспечивающее проникновение сперматозоида в ооцит, включает амилоидный компонент. Амилоидные белки присутствуют в оболочках ооцитов млекопитающих, и есть основания полагать, что эти белки играют роль в регуляции акросомной реакции [Guyonnet et al., 2014]. Таким образом, амилоиды могут участвовать в регуляции процесса оплодотворения у эволюционно далеких организмов. Отдельно стоит отметить, что присутствие амилоидов в специализированных жизненно важных структурах хориона показано впервые. Все эти структуры объединяет одно – они необходимы для формирования пор в полисахаридном остове хориона. Амилоидные фибриллы, устойчивые к самым разным воздействиям, могут являться идеальным биоматериалом для формирования жизненно-важных пор в полисахаридном «панцире».

Ранее в оболочках яиц насекомых амилоидные фибриллы были выявлены лишь у тутового шелкопряда. Стоит отметить, что белок s36 дрозофилы не имеет ортолога у шелкопряда. Предполагается, что в хорионе тутового шелкопряда амилоидную сеть образует ряд белков, имеющих один и тот же пептид, способный формировать амилоидные фибриллы, включающие разные белки [Iconomidou and Namodrakas, 2008; Iconomidou et al., 2011]. Отметим также, что белки ZP [Han et al., 2010], которые формируют сеть амилоидных фибрилл в оболочке ооцитов млекопитающих, также не имеют гомологии с s36 и белками хориона тутового шелкопряда. Таким образом, амилоидные структуры в оболочках яиц и ооцитов в ходе эволюции возникали многократно и независимо.



**Рисунок 12.** Рекombинантный белок s36 с 6xHis-тагом с N-конца. А - рекombинантный белок s36 до инкубации, Б – после инкубации в течение 4х суток. В, Г – окрашивание агрегатов белка s36 амилоид-специфичным красителем конго красный, В – поляризованный свет, Г – светлое поле. Д – фибриллы белка, полученные при помощи электронного микроскопа (масштабная линейка – 200нм).

У ряда насекомых в хорионе, а также в коконах выявляются фибриллярные  $\beta$ -складчатые структуры неамилоидной природы [Mello et al., 2018]. Мономеры, формирующие такие  $\beta$ -слои, располагаются не перпендикулярно (как в случае амилоидов), а параллельно основной оси фибриллы. Эти неамилоидные  $\beta$ -складчатые структуры при поляризации демонстрируют жёлто-зелёное свечение даже без предварительного окрашивания конго красным [Higgins et al., 2006]. Таким образом, многократное и независимое возникновение в оболочках яиц, куколок и ооцитов амилоидных и неамилоидных  $\beta$ -складчатые фибриллярных структур является эволюционной закономерностью. Это один из ярких примеров эволюционного параллелизма при формировании жизненно важных структур.



## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе данной работы был проведен поиск функциональных амилоидов в яичниках *Gallus gallus domesticus* и *Drosophila melanogaster*, позволивший выявить белки-кандидаты на роль функциональных амилоидов.

В яичниках *Gallus gallus domesticus* в цитоплазме и ядрах клеток выявлены структуры, связывающие амилоид-специфичный краситель Тиофлавин S. Однако, специфического окрашивания красителем Конго красный и антиамилоидными антителами отмечено не было. Для фрагмента белка Vtg2 была показана способность формировать амилоидные фибриллы *in vitro*, но, по совокупности всех данных нельзя сделать вывод, что Vtg2 формирует амилоидные агрегаты *in vivo* в организме куриц. Способность тиофлавина S связывать белковые структуры, которые не окрашиваются конго красным отмечена впервые. Эти данные необходимо учитывать в дальнейших работах по поиску и идентификации амилоидных структур.

В оболочке яиц *Drosophila melanogaster* амилоидспецифичными красителями и антиамилоидными антителами окрашиваются специализированные структуры хориона (пилларс, микропиле и плавательные усики). Установлено, что амилоидные фибриллы белка s36 являются конститутивным компонентом этих жизненно-важных структур. Нарушение секреции и агрегации белка s36 препятствует формированию специализированных структур оболочки яиц дрозофилы. Сравнительный анализ наших результатов и литературных данных показывает, что в ходе эволюции амилоидные структуры в оболочках яиц и ооцитов разных животных возникали многократно и независимо друг от друга.

## ВЫВОДЫ

1. Белок Vtg2 *Gallus gallus domesticus* формирует SDS-устойчивые агрегаты *in vivo*, и его фрагмент образует амилоидные фибриллы *in vitro*.
2. Тиофлавин S в ооцитах куриц связывает хромосом-ассоциированные и цитоплазматические структуры, которые не окрашиваются конго красным и амилоидспецифичными антителами. Таким образом, тиофлавин S следует использовать с осторожностью при выявлении и идентификации амилоидных структур.
3. Амилоидные фибриллы являются конститутивным компонентом специализированных структур оболочки яиц *Drosophila melanogaster*.
4. Белок s36 формирует амилоидный каркас специализированных структур оболочки яиц *Drosophila melanogaster*, а именно микропиле, пилларс и плавательных усиков.
5. Нарушение секреции и амилоидной агрегации белка s36 препятствует формированию специализированных структур (микропиле, пилларс и дыхательных усиков) оболочки яиц *Drosophila melanogaster*.



## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### *Статьи в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ*

1. Ryzhova T.A., Sopova J.V., Zadorsky S.P., Siniukova V.A., Sergeeva A.V., Nizhnikov A.A., Shenfeld A.A., Volkov K.V., Galkin A.P. Screening for amyloid proteins in the yeast proteome. // *Curr Genet.* – 2017. – Vol. 64. – №2. – P. 469–478.
2. Sergeeva A.V., Sopova J.V., Belashova T.A., Siniukova V.A., Chirinskaite A.V., Galkin A.P. & Zadorsky S.P. Amyloid properties of the yeast cell wall protein Toh1 and its interaction with prion proteins Rnq1 and Sup35. // *Prion.* – 2019. – Vol. 13. – №1. – P. 21–32.
3. Sopova, J.V., Koshel, E.I., Belashova, T.A., Zadorsky S.P., Sergeeva A.V., Siniukova V.A., Shenfeld A.A., Velizhanina M.E., Volkov K.V., Nizhnikov A.A., Kachkin D.V., Gaginskaya, E.R., Galkin, A.P. RNA-binding protein FXR1 is presented in rat brain in amyloid form. // *Sci Rep.* – 2019. – Vol. 9. – №1:18983.
4. Siniukova V.A., Sopova J.V., Galkina S.A., Galkin A.P. Search for functional amyloid structures in chicken and fruit fly female reproductive cells. // *Prion.* – 2020. – Vol. 14. – №1. – P. 278–282.
5. Chirinskaite A.V., Siniukova V.A., Velizhanina M.E., Sopova, J.V., Belashova, T.A., Zadorsky S.P. STXBP1 forms amyloid-like aggregates in rat brain and demonstrates amyloid properties in bacterial expression system. // *Prion.* – 2021. – Vol. 15. – №1. – P. 29–36.
6. Siniukova V.A., Galkina S.A., Galkin A.P. Thioflavin S binds non-amyloid protein structures in lampbrush chromosomes of *Gallus gallus domesticus*. // *Bio. Comm.* – 2022. – Vol. 67. – №1. – P. 57–62.