

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
«ИНСТИТУТ ОБЩЕЙ ГЕНЕТИКИ им. Н.И. ВАВИЛОВА»
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи

Синюкова Вера Александровна

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

1.5.7 – генетика

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
д.б.н., проф. А.П. Галкин

Москва – 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	4
ВВЕДЕНИЕ.....	5
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	10
1.1. Патологические амилоиды.....	11
1.2. Прионы.....	13
1.3. Функциональные амилоиды.....	17
1.3.1. Функциональные амилоиды прокариот.....	18
1.3.2. Функциональные амилоиды животных и растений.....	21
1.4. Функциональные амилоиды в размножении.....	22
1.4.1. Функциональные амилоиды в сперматогенезе млекопитающих.....	22
1.4.2. Функциональные амилоиды в оогенезе.....	24
1.4.3. Белки-кандидаты на роль функциональных амилоидов в оогенезе.....	27
1.5. Заключение.....	28
1.5.1. Развитие яиц курицы <i>Gallus gallus domesticus</i>	28
1.5.2. Оогенез <i>Drosophila melanogaster</i>	30
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	34
2.1. Изготовление и подготовка криосрезов.....	34
2.2. Подготовка и окрашивание препаратов хромосом «ламповых щеток».....	35
2.3. Окрашивание криосрезов тиофлавином S.....	36
2.4. Окрашивание криосрезов конго красным.....	36
2.5. Иммуногистохимический анализ.....	36
2.6. Микроскопия.....	37
2.7. Протеомный скрининг.....	37
2.8. Биоинформатический анализ.....	39
2.9. Штаммы микроорганизмов, среды и условия культивирования.....	39
2.10. Выделение тотальной РНК из гомогенизированной ткани печени <i>Gallus gallus domesticus</i> и яичников <i>Drosophila melanogaster</i>	40
2.11. Стандартные генно-инженерные методы.....	41
2.12. Иммунохимический анализ.....	43
2.12.1. Выделение белка.....	43
2.12.2. Белковый электрофорез и «Вестерн-блот».....	44
2.12.3. Нарботка и очистка рекомбинантного белка.....	44
3. РЕЗУЛЬТАТЫ.....	46

3.1.	Поиск амилоидных структур в яичниках <i>Gallus gallus domesticus</i>	46
3.1.1.	Цитологическое окрашивание яичников куриц амилоидспецифичными красителями.	46
3.1.2.	Протеомный скрининг белков, формирующих SDS-устойчивые амилоидоподобные агрегаты в яичниках куриц.	47
3.1.3.	Анализ амилоидоподобных свойств белка Vtg2	50
3.1.4.	Анализ окрашивания амилоидспецифичными красителями хромосом типа ламповых щеток	54
3.2.	Поиск амилоидных структур в яичниках <i>Drosophila melanogaster</i>	58
3.2.1.	Окрашивание яиц <i>Drosophila melanogaster</i> амилоидспецифичными красителями	58
3.2.2.	Протеомный скрининг амилоидных белков в яичниках <i>Drosophila melanogaster</i>	59
3.2.3.	Сравнительный анализ окрашивания амилоидспецифичными красителями яиц дрозофил дикого типа и яиц дрозофил линии #4842, у которых не формируются специализированные структуры хориона.	61
3.2.4.	Анализ агрегации белков s36 и s38, а также их колокализации с амилоидспецифичным красителем.	63
3.2.5.	Анализ амилоидных свойств белка s36 <i>in vitro</i>	69
4.	ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ	71
4.1.	Методология системного поиска и идентификации функциональных амилоидов	71
4.2.	Поиск амилоидных структур в ооцитах домашних куриц.....	72
4.3.	Поиск амилоидных структур в яйцах плодовой мушки.....	75
4.4.	Заключение	79
	ВЫВОДЫ	80
	СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	81
	ПРИЛОЖЕНИЯ	97

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ВИЧ – вирус иммунодефицита человека

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

кДНК – комплементарная ДНК

мРНК – матричная РНК

НДЗ – нейродегенеративные заболевания

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РНК – рибонуклеиновая кислота

РНП – рибонуклеопротеид

ТГЭ – трансмиссивные губчатые энцефалопатии

AM – acrosomal matrix, матрикс акросомы

BSA – bovine serum albumin, бычий сывороточный альбумин

DABCO – 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane, триэтилендиамин

DAPI – 4',6-diamidino-2-phenylindole, 4',6-диамидино-2-фенилиндол

DTT – dithiothreitol, дитиотреитол

EDTA – ethylenediaminetetraacetic acid, этилендиаминтетрауксусная кислота

GITERA – giant terminal RNP aggregates, гигантские концевые РНП-агрегаты

IPTG – isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside, изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид

PBS – phosphate buffered saline, натрий-фосфатный буфер

PMSF – phenylmethane sulfonyl fluoride, фенилметилсульфонил фторид

PVDF – polyvinylidene difluoride, поливинилиденфторид

rpm – revolutions per minute, обороты в минуту

SDS – sodium dodecyl sulfate, лаурилсульфат натрия

ТАЕ – tris-acetate-EDTA, трис-ацетатный буфер

TBS – tris-buffered saline, трис-буфер солевой

ZP – zona pellucida, блестящая оболочка

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность 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 [Charman et al., 2002; Bednarska, 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 [Isonomidou, 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 в яичниках 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 яиц 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.

Статьи:

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.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Патологические и функциональные амилоиды

Амилоиды представляют собой фибриллярные белковые агрегаты, которые формируются за счет образования упорядоченных межмолекулярных β -складчатых листов. Несмотря на различия в аминокислотной последовательности амилоидогенных белков, все они формируют фибриллы, сходные по структурным характеристикам, представляя собой уложенные в стопку параллельные или антипараллельные β -структуры. Поперечное расположение мономеров белка относительно оси протофибриллы определяет ее поперечную исчерченность.

Анализ амилоидных фибрилл, образуемых различными белками, демонстрирует их структурную разнородность. Например, для амилоидного пептида бета человека характерно образование фибрилл с различной ориентацией бета-слоев [Brown, 2005; Wickner, 2005], а фибриллы, образуемые прионом НЕТ-*s* *Podospora anserina* формируют бета-спирали [Fitzpatrick et al., 2013]. Универсальным свойством амилоидов является образование межмолекулярных кросс- β структур.

Сборка амилоидных фибрилл из пептидов и белков является процессом, зависимым от нуклеации. Существует начальная лаг-фаза, которая заканчивается формированием ядра фибриллы. Это инициирует экспоненциальную фазу, в которой собираются фибриллы, затем следует рост фибрилл и выход на плато в равновесной фазе. Образовавшиеся амилоидные фибриллы представляют собой неразветвленные волокна шириной 5–15 нм, состоящие из двух и более протофиламентов, которые могут иметь длину в несколько микрон [Knowles et al., 2014; Chiti et al., 2017]. Внутри протофиламентов отдельные субъединицы образуют кросс- β структуру, соответствующую лентообразным массивам β -слоев, которые выровнены перпендикулярно длинной оси фибриллы [Tysko and Wickner, 2013; Knowles et al., 2014; Chiti et al., 2017]. Кросс- β -структура амилоидных фибрилл дает

отчетливую картину дифракции рентгеновских волокон с отражениями при 4,7 и $\sim 10\text{\AA}$, что соответствует расстояниям водородных связей между β -тяжами и упаковке боковых цепей между слоями соответственно [Vuxbaum and Linke, 2012]. Фибриллы объединяются друг с другом и формируют крупные агрегаты. 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. Связывание амилоида с конго красным вызывает двойную рефракцию в поляризованном свете [Divry, 1927; Vuxbaum and Linke, 2012]. Кроме того, были созданы антитела, которые узнают конформационные эпитопы в амилоидных фибриллах и их интермедиатах [O’Nuallain and Wetzel, 2002; Kaye et al., 2007].

Важно подчеркнуть, что хотя термин «амилоид» широко используется в научной литературе, до сих пор нет однозначного понимания этого термина. С биохимической точки зрения, амилоиды представляют собой белковые фибриллы, образующие кросс- β -структуру. Однако в медицине под определением «амилоид» зачастую понимаются нерастворимые белковые агрегаты, расположенные исключительно во внеклеточном пространстве, которые окрашиваются амилоид-специфичными красителями [Sipe et al., 2014]. В данной работе мы будем придерживаться биохимического определения термина «амилоид», так как оно отталкивается от молекулярной природы исследуемых фибрилл безотносительно к их локализации.

1.1. Патологические амилоиды

Патологические амилоиды принято делить на внеклеточные (такие амилоидные фибриллы скапливаются в межклеточном пространстве) и внутриклеточные, накапливающиеся в цитоплазме. Накопление внеклеточных амилоидов может приводить к двум типам заболеваний: системным, когда амилоидные фибриллы поражают различные органы и ткани, и локальным, связанным с образованием амилоидных бляшек в определённом органе или

группе клеток [Sipe et al., 2014]. Образование внутриклеточных патологических амилоидов преимущественно приводит к развитию локальных амилоидозов.

Наиболее широко обсуждаемой, изученной и социально значимой группой амилоидозов являются локальные амилоидозы, приводящие к нейродегенерации. В качестве самых ярких примеров можно привести болезнь Альцгеймера (ассоциированную с накоплением олигомеров и агрегатов амилоидного пептида β) [Reitz et al., 2011], болезнь Паркинсона (ассоциированную с накоплением α -синуклеина) [Olanow and McNaught, 2011], латеральный амиотрофический склероз (связанный с цитотоксическим эффектом фибрилл белка супероксиддисмутазы (SOD1) [Elam et al., 2003], болезнь Хангтингтона (наследственное нейродегенеративное заболевание, вызываемое экспансией тринуклеотидных повторов ЦАГ, в гене хангтингтин (*HTT*) [Lee et al., 2013]. Амилоидные фибриллы могут формировать внеклеточные бляшки, как это наблюдается при болезни Альцгеймера, тогда как при болезни Паркинсона и Хангтингтона амилоиды присутствуют во внутриклеточных включениях [Sipe et al., 2016].

В последние десятилетия данным патологиям уделяется очень много внимания из-за роста числа нейродегенеративных заболеваний (НДЗ), что, в свою очередь, связано с ростом продолжительности жизни в развитых странах. В возрастной группе 55–75 лет частота встречаемости НДЗ удваивается через каждые 5 лет. В большинстве случаев (90–95%) НДЗ возникают как спорадические заболевания, и лишь в 5–7% болезни обусловлены мутациями [Moreno, 2002].

Амилоидоз не всегда является причиной заболевания, зачастую это лишь этап какого-то патологического каскада. Таким примером может служить диабет второго типа, при котором наблюдается агрегация пептида IAPP в поджелудочной железе. Данным заболеванием страдают до 400 миллионов человек [Meeto, 2007]. Также к заболеваниям, при которых наблюдается амилоидная агрегация белков, относится амилоидоз аорты, часто

встречающийся после 50 лет. Он связан с отщеплением от белка лактадгерина пептида медиана и его агрегацией в артериях [Westermarck and Westermarck, 2009].

В качестве примера системного амилоидоза можно привести амилоидоз легких цепей иммуноглобулинов, вызванный появлением в плазме крови и отложением в самых разных тканях организма амилоидных агрегатов лёгких цепей иммуноглобулинов. Данный тип амилоидоза приводит к нарушению работы сердца, почек, кожи, печени и периферических нервов [Dispenzieri et al., 2012].

Множество экспериментальных исследований показали, что префибриллярные олигомеры, образующиеся в лаг-фазе при сборке амилоидов, токсичны как *in vitro*, так и *in vivo* [Stefani, 2010; Sengupta et al., 2016]. Более того, олигомеры могут проявлять очень разные биологические свойства, при этом один и тот же пептид или белок может продуцировать как токсичные, так и нетоксичные олигомеры [Ladiwala et al., 2010; Campioni et al., 2010].

Стоит отметить, что интерес к изучению амилоидов в последние десятилетия неразрывно связан с поиском методов лечения вышеупомянутых заболеваний, особенно в контексте повышения продолжительности жизни.

1.2. Прионы

Среди всех известных на данный момент амилоидов выделяется отдельная группа инфекционных амилоидов, или прионов. Под инфекционностью подразумевается способность аномальной формы белка к передаче от одного организма другому.

Термин «прион» («prion» - «proteinaceous infectious particle» – инфекционные белковые частицы) был предложен Стенли Прусинером в 1982 году [Prusiner and Scott, 1997]. Первым открытым прионом стал белок PrP (от Prion Protein) млекопитающих. Это мембранный белок в норме присутствует в клетках в изоформе, получившей название PrP^C (от Cellular). Его прионная

форма, PrP^{Sc} (от названия прионной болезни овец «Scrapie»), вызывает инфекционную нейродегенерацию у животных и человека [Prusiner, 1982; Prusiner et al., 1984]. В ходе заболевания в центральной нервной системе образуются внеклеточные агрегаты белка, обладающие цитотоксической активностью. Это приводит к образованию большого количества каверн в коре больших полушарий, из-за чего головной мозг приобретает губчатую структуру. Болезнь нарушает нормальное функционирование головного мозга, клинические симптомы включают поведенческие изменения, слепоту, атаксию, нарушение координации, гипервозбудимость и тремор [Imran, 2011]. К группе заболеваний с подобными симптомами под общим названием «трансмиссивные губчатые энцефалопатии» (ТГЭ) относят такие болезни, как куру, болезнь Крейтцфельда-Якоба, скрэпи овец и коз, губчатую энцефалопатию коров и другие [Gibbs et al., 1968].

Прионные заболевания известны достаточно давно, так, например, первые достоверные упоминания о скрэпи датируются XVIII веком, хотя возможно она была известна еще в Древнем Китае [Wickner, 2005]. Инфекционная природа данных заболеваний была показана только в середине XX века американским ученым и врачом Даниелом Карлтоном Гайдусеком на примере заболевания куру, связанного с ритуальным каннибализмом у аборигенов племени Форе в Папуа-Новой Гвинее [Gajdusek and Zigas, 1957], за что в 1976 году он был удостоен Нобелевской премии по физиологии и медицине.

Согласно первому и наиболее общему определению, предложенному Стенли Прусинером, прион – это инфекционная белковая частица. Основываясь на экспериментальных данных по PrP, Прусинер предложил прионную концепцию со следующими основными положениями:

1. PrP^{Sc} и PrP^C являются конформационными изоформами.
2. Инфекционный агент представляет собой белок PrP в конформации PrP^{Sc}.

3. Конформация PrP^{Sc} способна к автокаталитическому «самовоспроизведению».

4. Прионные болезни могут развиваться спонтанно в результате изменения конформации белка PrP (при спорадических заболеваниях), в результате попадания в организм из внешней среды (при инфекционных заболеваниях) или вследствие мутаций в гене *Prnp* (структурный ген PrP), способствующих образованию PrP^{Sc} (при наследственных заболеваниях) [Prusiner, 1982].

Данная гипотеза окончательно подтвердилась лишь относительно недавно, когда полученными *in vitro* прионными фибриллами белка PrP удалось заразить здоровых мышей [Makarava et al., 2010]. Фибриллы белка PrP чрезвычайно устойчивы, в том числе к протеазам, в результате чего они не разрушаются в желудочно-кишечном тракте и заболевание может передаваться через пищу, как внутри вида, так и между различными видами.

Прионные фибриллы расщепляются на олигомеры, которые вновь присоединяют мономеры амилоидогенного белка. Именно эта особенность определяет их «размножение» и инфекционность. Неинфекционные амилоидные фибриллы способны только к увеличению своего размера за счет присоединения новых мономеров, однако каждая амилоидная фибрилла образуется независимо от предсуществующей.

Кроме белка PrP известны другие белки млекопитающих, обладающие инфекционными свойствами. Одним из них является альфа-синуклеин (α -Syn), относящийся к семейству синуклеинов и вовлеченный в синаптический везикулярный транспорт. Формирование агрегатов данного белка ассоциировано с болезнью Паркинсона. Олигомеры α -Syn способны передаваться из клетки в клетку [Emanuele and Chierigatti, 2015], а также есть данные о том, что инъекции амилоидных фибрилл α -Syn в мозг мышей приводит к развитию нейродегенерации [Luk et al., 2012; Masuda-Suzukake et al., 2013]. Вместе с тем, данных о естественной передаче болезни Паркинсона нет.

Кандидатом на роль приона млекопитающих можно считать патологические агрегаты белка tau. Этот белок, ассоциирован с микротрубочками и необходим для их стабилизации в нейронах. Агрегаты белка tau являются маркерами многих нейродегенеративных заболеваний [Iqbal et al., 2009], а также имеются данные об их передаче из клетки в клетку [Medina and Avila, 2014]. Однако еще остаются вопросы относительно как прионных, так и амилоидных характеристик данного белка, так как инфекционность была показана для гомогената мозга, содержащего агрегаты белка tau [Lasagna-Reeves et al., 2012], а также на клеточных линиях [Kfoury et al., 2012], тогда как инфекционность очищенных фибрилл до сих пор не показана, также как и не показана амилоидная природа агрегатов белка *in vivo*.

Порядка десяти белков, способных формировать инфекционные амилоидные частицы (прионы) охарактеризовано у дрожжей сахаромецетов. Некоторые дрожжевые белки, такие как Sup35, Ure2 и Rnq1 спонтанно, или в результате стрессовых воздействий, способны формировать амилоидные агрегаты, которые фрагментируются на олигомеры и передаются из клетки в клетку при клеточных делениях [Wickner and Kelly, 2016]. Изменение конформации этих белков приводит к их дисфункции или приобретению новой функции. Расщепление прионных агрегатов в клетках дрожжей обеспечивает комплекс шаперонов, агрегаты расщепляются на олигомеры, стабильно передаются в ряду клеточных поколений и вновь присоединяют новые мономеры белка. Открытие цитоплазматических наследственных факторов у дрожжей *S. cerevisiae* (дрожжевых прионов) стало основой для появления концепции белковой наследственности. Впервые она была сформулирована Ридом Викнером и заключается в том, что изменение признака, происходящее в результате прионной инактивации белка, может наследоваться у одноклеточных организмов без каких-либо изменений генетического материала [Wickner, 1994; Wickner et al., 1999]. В случае высших эукариот речь о передаче потомкам не идет, однако прион стабильно поддерживается и распространяется в организме. В рамках концепции

белковой наследственности также были получены данные о «полиприонном наследовании», при котором взаимодействие прионов приводит к возникновению нового наследуемого фенотипа дрожжей *S.cerevisiae* [Nizhnikov et al., 2016].

Отдельно необходимо выделить прионный белок [HET-s] мицелиального гриба *Podospora anserina*. Гифы данного гриба от двух разных мицелиев могут сливаться, образуя гетерокарион, однако в ряде случаев это может привести к гибели гиф. Это регулируется генами вегетативной несовместимости *het*: один из них, *het-s*, может быть представлен двумя аллелями: *het-s* и *het-S*. Только продукт аллеля *het-s* способен к прионизации, его прионная форма обозначается, как [HET-s], а нативная – [HET-s*]. Продукт гена *het-S* к прионизации не способен. В случае слияния гиф [HET-s] и [HET-s*], весь белок переходит в прионную форму. Однако при слиянии гиф, в одной из которых находится прионная форма [HET-s], а в другой – [HET-S], при прионизации [HET-S] образуется токсичный продукт и происходит гибель гетерокариона [Coustou et al., 1997]. Таким образом, можно заключить, что именно прионное состояние белка в данном случае определяет вегетативную несовместимость, и можно сказать, что данный белок является ярким примером функционального амилоида.

1.3. Функциональные амилоиды

До конца XX века амилоиды ассоциировались исключительно с теми или иными патологиями. Однако накопление данных и появление новых методов исследований существенно поколебало эти представления. На границе XX и XXI века было показано, что некоторые белки представлены в амилоидной конформации в норме, при этом фибриллы выполняют физиологические функции. Волокнистая структура амилоидных фибрилл делает возможным их использование в качестве каркаса для биохимических процессов, тогда как их компактная структура идеальна для выполнения запасающих, защитных и других функций.

Одной из самых первых работ по выявлению функциональных амилоидов стала демонстрация амилоидных свойств защитных белков хориона яиц тутового шелкопряда *Bombyx mori* [Iconomidou, 2000]. Практически в то же самое время были открыты белки curli у *Escherichia coli*, чаплины у *Streptomyces coelicolor*, а вскоре еще некоторые функциональные амилоиды у разнообразных живых организмов, от бактерий и до человека. Однако стоит заметить, что обнаружение амилоидов до недавнего времени носило случайный характер из-за отсутствия методик, позволяющих осуществлять их системный скрининг.

Функциональные амилоиды, встречаясь у самых разнообразных организмов, выполняют свои строго определенные функции. К ним относятся, например: а) структурная (образование биопленки у бактерий (curli), содействие образованию воздушных гиф у стрептомицетов (чаплины) или формирование монослоя на поверхности (гидрофобины), б) резервная (хранение пептидных гормонов в секреторных гранулах млекопитающих), в) информационная функция (долговременная память (цитоплазматический белок Orb2 у *Drosophila melanogaster*), г) защитная (вегетативная несовместимость у *Podospora anserina*, белок NET-s).

1.3.1. Функциональные амилоиды прокариот

Бактерии оказались очень удобным объектом для выявления амилоидных белков. Подход, основанный на комбинировании конформационно-специфических антител и амилоид-связывающего красителя тиофлавина Т и показал, что 10–50% видов бактерий, взятых из различных мест обитания (включая пресноводные озера, питьевые водоемы и очистные сооружения), продуцируют внеклеточные амилоиды или амилоидоподобные структуры [Larsen et al., 2007]. Уже на этом этапе было очевидно, что эти белки играют важную роль в формировании внеклеточного матрикса. Однако дальнейший детальный анализ был (и остается) затруднен из-за крайней нерастворимости бактериальных амилоидов, которые бывают устойчивы даже

к кипячению в растворе SDS, что очень затрудняет их идентификацию, например, с помощью SDS-PAGE и масс-спектрометрии.

Одним их первых обнаруженных бактериальных амилоидов стал белок CsgA из семейства *curli Escherichia coli* [Chapman et al., 2002]. Существует целая система, обеспечивающая экскрецию этого белка и инициирующая сборку фибрилл [Gerven Van et al., 2015].

Для биогенеза фибрилл CsgA требуется специальный белковый комплекс, кодируемый двумя оперонами: *csgDEFG* и *csgBAC*. Белок CsgD является регулятором всей системы и необходим для транскрипции *csgBAC*. CsgA – непосредственно амилоидогенный белок, агрегация которого инициируется белком CsgB. CsgG – белок, образующий поровый комплекс в наружной мембране, CsgE и CsgF – факторы, необходимые для сборки и стабилизации амилоидных фибрилл, а также транспорта CsgA и CsgB к поверхности клетки. Основным белком, обеспечивающим формирование амилоидных фибрилл, является CsgA. Этот белок на N-конце содержит сигнальную последовательность, состоящую из двух частей: 20 аминокислот, направляющих белок через внутреннюю мембрану и 22 аминокислоты, обеспечивающие транспорт белка через специфичный поровый комплекс в мембране, образованный белком CsgG, в межклеточное пространство, где и происходит образование фибрилл [Luz, 2012; Sivanathan, 2013].

Белки семейства *curli* экскретируются для формирования биопленки, то есть для закрепления бактериальных клеток на внеклеточном матриксе. Такой способ существования бактериальных колоний является распространенной адаптацией к определенным условиям внешней среды. Неудивительно, что и у других видов бактерий ряд амилоидных белков также участвует в образовании биопленок [Dueholm et al., 2012]. Также подобный механизм был обнаружен и у архей [Chimileski et al., 2014]. Другой механизм адаптации к условиям внешней среды представлен у бактерии *Streptomyces coelicolor* – белки чаплины обеспечивают формирование воздушных гиф [Claessen et al., 2003]. Ряд других бактериальных экстраклеточных белков, формирует

цитотоксичные амилоидные олигомеры. Интересным примером является микроцин E492: его олигомеры токсичны для клеток организма-хозяина, однако при изменении внешних условий они формируют нетоксичные высокомолекулярные амилоидные фибриллы, необходимые для образования биопленки [Arranz et al., 2012; Marcoleta et al., 2013]. Другие примеры бактериальных функциональных амилоидов приведены в Таблице 1.

Таблица 1. Функциональные амилоиды бактерий [по: Nizhnikov et al., 2015]

Амилоидный белок	Вид	Функция амилоида	Ссылка
CsgA	<i>Escherichia coli</i> и др.	Образование биопленок, прикрепление к поверхности	[Chapman et al., 2002]
ChpC, ChpE и др.	<i>Streptomyces coelicolor</i>	Преодоление воздушными гифами поверхностного натяжения воды	[Claessen et al., 2003]
Mcc	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Запасание токсина	[Biéler, 2005]
HpaG	<i>Xanthomonas axonopodis</i>	Реакция сверхчувствительности у растений	[Oh, 2007]
MTP	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Образование биопленок, связывание белков человека	[Alteri, 2007]
Фенол-растворимые модулины	<i>Staphylococcus aureus</i>	Образование биопленок	[Wang et al., 2007]
FapC	<i>Pseudomonas sp.</i>	Образование биопленок	[Dueholm et al., 2010]
TasA	<i>Bacillus subtilis</i>	Образование биопленок	[Romero, 2010]
Листеролизин	<i>Listeria monocytogenes</i>	Инактивация листеролизина после выхода бактерии в цитозоль хозяина	[Bavdek et al., 2012]

1.3.2. Функциональные амилоиды животных и растений

Белки, обладающие некоторыми амилоидными свойствами, участвуют в контроле долговременной памяти, что было показано на примере плодовой мушки *Drosophila melanogaster* (белок Orb2) [Majumdar et al., 2012]. Белок Orb2 регулирует полиаденилирование и транспорт мРНК в цитоплазме нейронов. В результате прохождения нервного импульса в синапсах повышается уровень продукции этого белка, происходит его олигомеризация и SDS-устойчивые олигомеры, накапливаясь в синапсах, стабилизируют их структуру [Majumdar et al., 2012], обеспечивая долговременную память. Мутации, снижающие способность белка Orb2 к олигомеризации, блокируют формирование долговременной памяти [Majumdar et al., 2012]. Амилоидные свойства Orb2 были подтверждены совсем недавно с помощью криоэлектронной микроскопии [Hervas et al., 2020]. Обнаружение амилоидов у самых различных живых организмов позволяет предполагать, что в ряде случаев амилоидогенез можно рассматривать в качестве функционально важного процесса.

Следует упомянуть основные примеры функциональных амилоидов человека и млекопитающих. Pmel17 – белок, вовлеченный в процесс полимеризации меланина. Амилоидные фибриллы фрагмента белка Pmel17 в меланосомах необходимы для полимеризации молекул меланина, что способствует защите клеток от целого ряда цитотоксических воздействий, включая ультрафиолет и оксидативный стресс. Фибриллы фрагмента белка Pmel17 также образуют каркас, необходимый для запасания меланина в меланосомах [Fowler, 2006; Louros, 2016]. Есть данные о том, что пептидные гормоны секреторных гранул млекопитающих запасаются в виде амилоидных агрегатов. Для исследования было выбрано 42 гомональных пептида из различных тканей и органов, из которых 10 самопроизвольно образовывали агрегаты *in vitro*, тогда как при инкубации с низкомолекулярным гепарином практически все протестированные пептиды образовывали амилоидные

фибриллы. Также для самих секреторных гранул было показано связывание с амилоид-специфичным красителем [Maji et al., 2009].

Недавно в нашей лаборатории было также показано, что белок FXR1 колокализуется с амилоид-специфическими красителями конго красным, тиофлавином S и T в корковых нейронах головного мозга крысы. FXR1, выделенный из мозга с помощью иммунопреципитации, показывает желто-зеленое двойное лучепреломление после окрашивания конго красным. Более того, в мозге крысы FXR1 представлен только в виде устойчивых к детергентам амилоидных олигомеров и нерастворимых агрегатов. Молекулы РНК, которые колокализованы с амилоидными агрегатами FXR1 в корковых нейронах, нечувствительны к обработке РНКазой А [Sorova et al., 2019]. Интересно, что изменения уровня экспрессии этого белка в коре головного мозга влияют на долговременную память и эмоциональное состояние [Cook et al., 2014; Del'Guidice et al., 2015]. N-концевой амилоидообразующий участок FXR1 является высококонсервативным у млекопитающих и содержит идентично расположенные амилоидогенные последовательности у позвоночных [Velizhanina and Galkin, 2022].

Функциональные амилоиды растений сейчас являются практически не исследованной территорией. Первые работы по данной теме начали появляться меньше 10 лет назад [Chakrabortee, et al., 2016]. Сейчас имеются данные, что в семенах гороха *Pisum sativum* L. белок вицилин запасается в виде амилоидных агрегатов [Antonets et. al, 2020]. Пока что данный белок можно назвать единственным примером функциональных амилоидов растений.

1.4. Функциональные амилоиды в размножении

1.4.1. Функциональные амилоиды в сперматогенезе млекопитающих

После мейоза и образования гаплоидных зародышевых клеток, мужские зародышевые клетки претерпевают метаморфоз, называемый сперматогенезом. Во время этого процесса на поверхности головки спермия образуется меланосомоподобная экзоцитотическая везикула, известная как

акросома [Berruti and Paiardi, 2011]. При оплодотворении высвобождение и/или обнажение содержимого акросомы позволяет сперматозоиду проникнуть через оболочки, окружающие ооцит. Акросома содержит как растворимую фракцию, так и нерастворимый акросомальный матрикс (AM). Считается, что AM функционирует как каркас, который опосредует высвобождение AM-ассоциированных белков, необходимых для оплодотворения, и взаимодействует с zona pellucida (ZP), окружающей ооцит [Hardy et al., 1991; Kim and Gerton, 2003]. Имеются данные, что белки AM мыши устойчивы к SDS, что является одной из характеристик амилоидных белков. Биоинформатический анализ показал наличие амилоидогенных последовательностей почти во всех белках AM мышей, а также акросомальный матрикс связывает амилоид-специфичные антитела ОС и A11 [Guyonnet et al., 2014]. Предполагается, что амилоидогенные домены могут быть участками, обеспечивающими связывание белков AM, в то время как другие домены поддерживаются в растворимом, мономерном состоянии. Также возможно, что амилоидоподобные белки AM функционируют как определенная трехмерная структура, которая взаимодействует с ZP во время распознавания гамет. [Guyonnet et al., 2014].

Во время эякуляции сперматозоиды выделяются в семенную жидкость, представляющую собой комбинацию жидкостей, происходящих из придатка яичка, предстательной железы и семенных пузырьков. Исследования показали, что человеческая сперма содержит амилоидоподобные белки, способные усиливать инфицирование вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ) [Münch et al., 2007]. Естественно, нельзя говорить, что в этом заключается функциональная роль этих белков. Амилоидные фибриллы *in vitro* образуются из пептидов простатической кислой фосфатазы (SEV1) и семеногелина (SEM) [Münch et al., 2007; Roan et al., 2011]. Эти фибриллы спермы захватывают частицы ВИЧ и способствуют прикреплению и слиянию вирионов с клетками *in vitro* [Münch et al., 2007; Roan et al., 2011]. Исследователи показали, что другие амилоидогенные пептиды также

усиливают инфекцию ВИЧ, хотя и с меньшей эффективностью, чем амилоиды спермы. Это позволяет предполагать, что для связывания вируса важна амилоидная структура, а не аминокислотная последовательность сама по себе [Roan et al., 2011]. Другие исследователи показали, что SEV1 могут связывать бактерии и способствовать их фагоцитозу макрофагами [Easterhoff et al., 2013]. Хотя пептиды SEV1 не проявляют непосредственно антимикробной активности, они могут участвовать в иммунной защите [Hewetson et al., 2017].

1.4.2. Функциональные амилоиды в оогенезе

Первой работой, в которой упоминаются функциональные амилоиды в оогенезе, можно считать статью 2000 года об амилоидных свойствах белков хориона яиц тутового шелкопряда *Bombyx mori* [Iconomidou, 2000]. Оболочка яиц тутового шелкопряда специфически окрашивается конго красным [Iconomidou, 2000]. Авторы статьи синтезировали высококонсервативный пептид, представленный примерно в 30% защитных белков хориона. Способность этого пептида формировать амилоидные фибриллы была подтверждена различными способами: было показано связывание фибрилл этого пептида с амилоид-специфичными красителями (конго красным и тиофлавином-Т); данные рентгеноструктурного анализа и трансмиссионной электронной микроскопии показали, что данный пептид формирует неветвящиеся фибриллы, содержащие β -слои. Было высказано предположение, что в данном случае амилоидная структура носит исключительно функциональный характер: чрезвычайно устойчивая структура амилоидных фибрилл помогает защищать ооцит и развивающийся эмбрион от разного рода опасностей окружающей среды.

На данный момент в ооцитах некоторых видов позвоночных также обнаружены функциональные амилоиды. Это белок Xvelo (*Xenopus*) [Voke et al., 2016] и группа белков ZP (*Mus musculus*) [Egge et al., 2015].

Белок Xvelo - РНК-связывающий белок. Он представлен в тельцах Бальбиани – это немембранные структуры, которые включают скопления РНК, митохондрий и белков около ядра. Данная структура встречается в ооцитах на ранних стадиях развития и на сегодняшний день была обнаружена у самых различных организмов, начиная с некоторых видов насекомых, и заканчивая млекопитающими, включая человека. Известно, что компоненты телец Бальбиани играют роль в регуляции полярности ооцита и, впоследствии, эмбриона, а также могут быть важны для оплодотворения. Высокое содержание белка Xvelo в тельцах Бальбиани было продемонстрировано при помощи окрашивания ооцитов ксенопуса специфичными антителами к данному белку. Окрашивание амилоид-специфичным красителем тиофлавин-Т, а также антиамилоидными конформационными антителами свидетельствуют в пользу гипотезы об амилоидной природе агрегатов Xvelo. Также установлено, что рекомбинантный белок формирует детергент-устойчивые агрегаты. Данный белок образует матрикс, т. е. сеть, связывающий все компоненты телец Бальбиани воедино. В амилоидной форме белок присутствует только на ранних стадиях развития ооцитов, на поздних стадиях его можно найти лишь в мономерной форме; авторы предполагают, что по мере созревания ооцитов происходит разборка амилоидных конформеров. Кроме того, авторы продемонстрировали способность Xvelo к связыванию РНК и образованию амилоидных фибрилл *in vitro* [Voke et al., 2016].

Следующими идентифицированными функциональными амилоидами, вовлеченными в оогенез, является группа белков ZP у мыши *Mus musculus*. ZP – аббревиатура от zona pellucida (блестящая оболочка) – это прозрачная эластичная гликопротеиновая оболочка, окружающая яйцеклетку млекопитающих. Она также встречается у других позвоночных. Её толщина в ооцитах человека составляет 5–10 мкм. Через неё свободно проникает вода и растворенные в ней вещества. В индивидуальном развитии яйцеклетки zona pellucida образуется на стадии роста, когда она развивается в составе первичного фолликула. Белки zona pellucida у мышей синтезирует растущий

ооцит [Epifano et al., 1995]. Вопреки мнению, распространенному в середине 20-го века, фолликулярные клетки в образовании zona pellucida не участвуют. Белки ZP – ее основной компонент.

Всего существует 4 белка ZP (ZP 1, 2, 3, 4); и уже довольно давно было известно, что эти белки способны образовывать полимерные структуры [Jovine et al. 2005]. Интересным является факт, что в образовании фибриллярных структур может быть вовлечен не один из белков ZP, а сразу несколько. Два гликопротеина (ZP2 и ZP3), связываясь попеременно, образуют нити, которые соединены друг с другом «перемычками» из ZP1 и ZP4. Сахаридные части гликопротеинов ZP2 и ZP3 являются лигандами для связывания сперматозоидами, сахаридные части гликопротеинов видоспецифичны. Часто в литературе указывают, что в строении zona pellucida участвуют только три белка ZP1, ZP2, ZP3. Это связано с тем, что изначально строение zona pellucida было изучено на лабораторной мыши, у которой ген ZP4 мутантен и белок ZP4 не продуцируется; у прочих млекопитающих, включая человека, в строении zona pellucida участвуют четыре белка [Louros et al., 2013; Louros et al., 2015].

Для подтверждения амилоидной природы белков ZP авторы статьи использовали весьма широкий ряд методов. Изолированные ооциты были окрашены такими амилоид-специфичными красителями, как тиофлавин-S и конго красный. При связывании с конго красным амилоидные фибриллы приобретают способность преломлять поляризованный свет, в результате чего в поляризационный микроскоп можно наблюдать свечение яблочно-зеленого цвета. Также оболочка изолированных ооцитов связывала конформационно-зависимые антитела, распознающие амилоидные олигомеры, в электронном микроскопе были видны фибриллярные структуры, а рентгеноструктурный анализ подтвердил их амилоидную природу *in vitro*.

Важно отметить тот факт, что zona pellucida и белки, ее составляющие, имеются у всех высших млекопитающих, включая, разумеется, человека, и таким образом, исследование этой группы белков может быть интересно не

только с фундаментальной точки зрения, но и с практической, так как возможные нарушения оплодотворения и последующего эмбрионального развития зародыша могут быть связаны, в том числе, и с нарушениями амилоидной структуры вышеупомянутых белков [Han et al., 2010].

1.4.3. Белки-кандидаты на роль функциональных амилоидов в оогенезе

Xvelo и белки ZP – единственные белки, которые на данный момент достаточно уверенно можно назвать функциональными амилоидами в оогенезе позвоночных. Однако есть еще ряд белков, для которых характерны некие амилоидные свойства, но данных пока явно недостаточно.

Как было сказано ранее, белки ZP, как и образуемая ими оболочка ооцита, встречаются у широкого спектра видов животных, однако только на мышах были проведены достаточно полные исследования. Есть несколько работ, посвященных белкам ZP у курицы *Gallus gallus domesticus*, однако на данный момент известно лишь, что эти белки также способны полимеризоваться *in vitro*, а также участвуют во взаимодействии яйцеклетки со сперматозоидами при оплодотворении [Han et al., 2010].

Есть информация, что в оболочке икринок рыб вида *Austrofundulus limnaeus* представлены амилоидные фибриллы неидентифицированных белков [Podrabsky et al. 2001]. В данном случае исследования проводились не только на неоплодотворенных яйцеклетках, но и на оплодотворенных с уже развивающимся зародышем. В обоих случаях при помощи окрашивания конго красным были выявлены амилоидоподобные структуры в оболочках икринок. Важным моментом здесь является то, что амилоидоподобные структуры были обнаружены в оплодотворенной икре, что открывает перспективы для исследования функциональных амилоидов, вовлеченных не только в оогенез, но и непосредственно в эмбриогенез [Marlow and Mullins, 2008; Bontems et al., 2009].

Можно подвести небольшой итог и сказать, что в ооцитах разных организмов однозначно присутствуют амилоиды и амилоидоподобные белки,

однако их обнаружение никак нельзя назвать системным, их амилоидная природа была установлена в ходе изучения конкретных белков, а не масштабного скрининга амилоидов. Именно системный анализ белков, вовлеченных в оогенез, таких модельных объектов, как домашняя курица *Gallus gallus domesticus* и плодовая мушка *Drosophila melanogaster*, является целью данной работы.

1.5. Заключение

На основании обобщения литературных данных можно сделать заключение, что функциональные амилоиды обнаружены в яйцах тутового шелкопряда, в ооцитах ксенопуса и млекопитающих, а также в икринках рыбки *Austrofundulus limnaeus*. За одним исключением все эти белки формируют фибриллы в оболочке яиц и ооцитов. Возникает вопрос – является ли наличие амилоидных фибрилл в оболочках яиц и ооцитов животных универсальным свойством? Пока мы не можем ответить на этот вопрос, поскольку имеющиеся данные являются разрозненными. В нашей лаборатории был разработан и успешно апробирован метод протеомного скрининга амилоидов [Ryzhova et al., 2018; Sopova et al., 2019]. С помощью этого метода мы решили провести скрининг на наличие амилоидных структур в яйцах таких классических генетических объектов, как курица *Gallus gallus domesticus* и плодовая мушка *Drosophila melanogaster*. В связи с этим в заключении обзора литературы необходимо дать основные представления об оогенезе данных организмов.

1.5.1. Развитие яиц курицы *Gallus gallus domesticus*

Перед овуляцией клетки-предшественники яйцеклетки, то есть ооциты, подвергаются созреванию в фолликуле яичника [Tanghe et al., 2002]. Во время созревания ооцитов у яйцекладущих видов, включая птиц, в цитоплазме накапливаются все материалы и питательные вещества, необходимые для раннего развития эмбриона. У птиц цитоплазма яйцеклеток содержит

чрезвычайно большое количество яичного желтка [Wyburn et al., 1965; Johnson, 2015]. Оогенез инициируется в примордиальных фолликулах. Фолликулы, несущие первичные ооциты, растут во время полового созревания и становятся первичными фолликулами диаметром от 1 до 2 мм, в которых начинает развиваться гранулезный клеточный слой, окружающий ооцит. У куриц за 8–9 дней до овуляции первичные белые фолликулы диаметром от 6 до 8 мм содержат богатый белком желток. Затем один из них начинает созревание: начинается быстрое накопление желтого желтка, содержащего большое количество липидов и ксантофилла, и увеличение в размерах, например, у курицы до ~40 мм в диаметре и ~16 г в весе к моменту овуляции.

Во время быстрого роста желтого фолликула перивителлиновый слой (соответствующий *zona pellucida* у млекопитающих) растягивается и расширяется до овуляции и играет важную роль в оплодотворении и раннем развитии. Яичный желток в созревшем курином ооците содержит большое количество липидов (более 30% веса), которые в основном поступают из липопротеинов очень низкой плотности (VLDL) и вителлогенина (VTG), которые синтезируются в печени и выделяются из печени в кровоток в ответ на эстрогеновую стимуляцию [Schneider, 2007; Li et al., 2014]. Считается, что VLDL или VTG поступают в развивающийся ооцит путем эндоцитоза [Schneider, 2007; Stifani et al., 1990].

Во время развития фолликула ооцит птиц задерживается в профазе первого мейоза так же, как и у млекопитающих. Ооцит возобновляет первый мейоз за несколько часов до овуляции и снова останавливается в метафазе второго мейоза до овуляции [Hughes, 1963; Nakamura et al., 2013; Perry, 1987]. После овуляции ооцит захватывается воронкой, передней областью яйцевода, где происходит оплодотворение, при котором несколько сперматозоидов проникают через перивителлиновый слой и сливаются с ооцитом в области зародышевого диска, образуя мужские пронуклеусы [Perry, 1987; Nakamura et al., 2013]. Примерно через 1–6 ч после захвата воронкой, ооцит возобновляет второй мейоз, и образовавшийся женский пронуклеус сливается с одним из

мужских пронуклеусов, формируя ядро зиготы в следующие ~3ч [Perry, 1987]. После овуляции и захвата воронкой ооцит или оплодотворенная яйцеклетка с окружающим перивителлиновым слоем дополнительно покрывается рядом оболочек, формируя зрелое яйцо [Menkhorst and Selwood, 2008].

1.5.2. Оогенез *Drosophila melanogaster*

Яичники *Drosophila melanogaster* – популярная модельная система для исследования широкого спектра биологических процессов: развития половых клеток, мейоза, миграции клеток, морфогенеза, межклеточной передачи сигналов, локализации мРНК и трансляционного контроля.

D. melanogaster относится к отряду *Diptera*, или высшим мухам, для которых характерно развитие с полным превращением – метаморфозом. Для мух характерно наличие двух яичников политрофического мероистического типа организации, то есть, кроме фолликулярных клеток, окружающих ооцит, имеются еще и дополнительные питающие клетки (трофоциты), снабжающие ооцит большим количеством мРНК и белка, связь с которыми осуществляется через кольцевые цитоплазматические каналы [McLaughlin and Bratu, 2015].

Главным компонентом яичников *D. melanogaster* являются яйцевые трубки (овариолы), всего один яичник включает 16-20 овариол, каждая из которых является автономной и содержит цепь созревающих яйцевых камер (фолликулов). Новые яйцевые камеры образуются в передней части овариолы – гермарии, содержащем соматические и первичные половые клетки. Гермарий подразделяется на 4 зоны, в соответствии со стадией развития ооцита [Swevers et al., 2005].

Процесс оогенеза у дрозофилы занимает примерно неделю и произвольно разделен на 14 стадий на основе морфологии. Так, 1 стадия – это начало деления первичных половых клеток, а 14 стадия – зрелое яйцо [Bastock et Johnston, 2008]. На первых стадиях первичные половые клетки делятся ассиметрично с образованием стволовой клетки и дочерней клетки, которая

вступает на путь дифференцировки. Она делится четыре раза путем митоза с неполным цитокинезом, образуя цисту из 16 клеток, связанных цитоплазматическими мостиками. Одна из этих 16 клеток будет образовывать ооцит, другие станут полиплоидными питающими клетками. Основная их функция – синтез питательных веществ, белков и РНК, и их транспорт в ооцит. Ооцит делится мейозом, но останавливается во время первой фазы перед выходом из гермария. Далее идет образование яйцевой камеры. Каждая яйцевая камера содержит питающие и фолликулярные клетки соматического происхождения, окружающие ооцит [Bastock et Johnston, 2008].

На следующих этапах развития яйцевая камера удлиняется, фолликулярные клетки мигрируют вокруг ооцита, и начинается образование хориона (яичной оболочки). Образование хориона происходит, когда клетки фолликулярного эпителия подвергаются дифференцировке и начинают синтезировать белки хориона, которые впоследствии секретируются из клеток [Wu et al., 2008]. В оболочке яйца дрозофилы идентифицировано пять морфологически различных слоев: проксимальная вителлиновая мембрана ооцита (приблизительно 300 нм), слой липидного воска, внутренний слой хориона (40–50 нм), эндохорион (500–700 нм) и экдохорион (300–500 нм) (рис.1А).

В ходе описанных ранее событий питающие клетки транспортируют свое содержимое в ооцит и погибают. Начинают формироваться парные дорсальные отростки, в просвет которых фолликулярными клетками крыши секретируются белки хориона и полисахариды (рис.1Б). После завершения хориогенеза фолликулярные клетки также дегенерируют [Berg, 2008].

Яичная оболочка защищает зародыш от агрессивных условий окружающей среды. Кроме того, что степень испарения влаги должна быть минимизирована для предотвращения высыхания, яичная оболочка также должна обеспечивать достаточный газообмен для дыхания развивающегося эмбриона. Фолликулярные клетки секретируют полисахариды, которые формируют прочную полимерную структуру в области эндохориона

[Margaritis, 1986; Farnesi et al., 2015]. Так как в составе защитных оболочек яиц насекомых присутствуют соединения, формирующие «полисахаридный панцирь», для яйца имеют особую роль поровые структуры, обеспечивающие газообмен и собственно оплодотворение яйца. В качестве органов дыхания у зародыша выступают дорсальные отростки (плавательные усики) и аэропиле. Так называемые пилларс (столбики) также важны для газообмена, они разграничивают полости в структуре эндохориона [Cavaliere et al., 2008]. Яичная оболочка также содержит другие специализированные структуры, такие как микропиле, расположенное на переднем конце яйца (рис1Б). Оно формирует канал, который позволяет сперматозоидам проникать в ооцит через яичные оболочки для оплодотворения [Swevers et al., 2005].

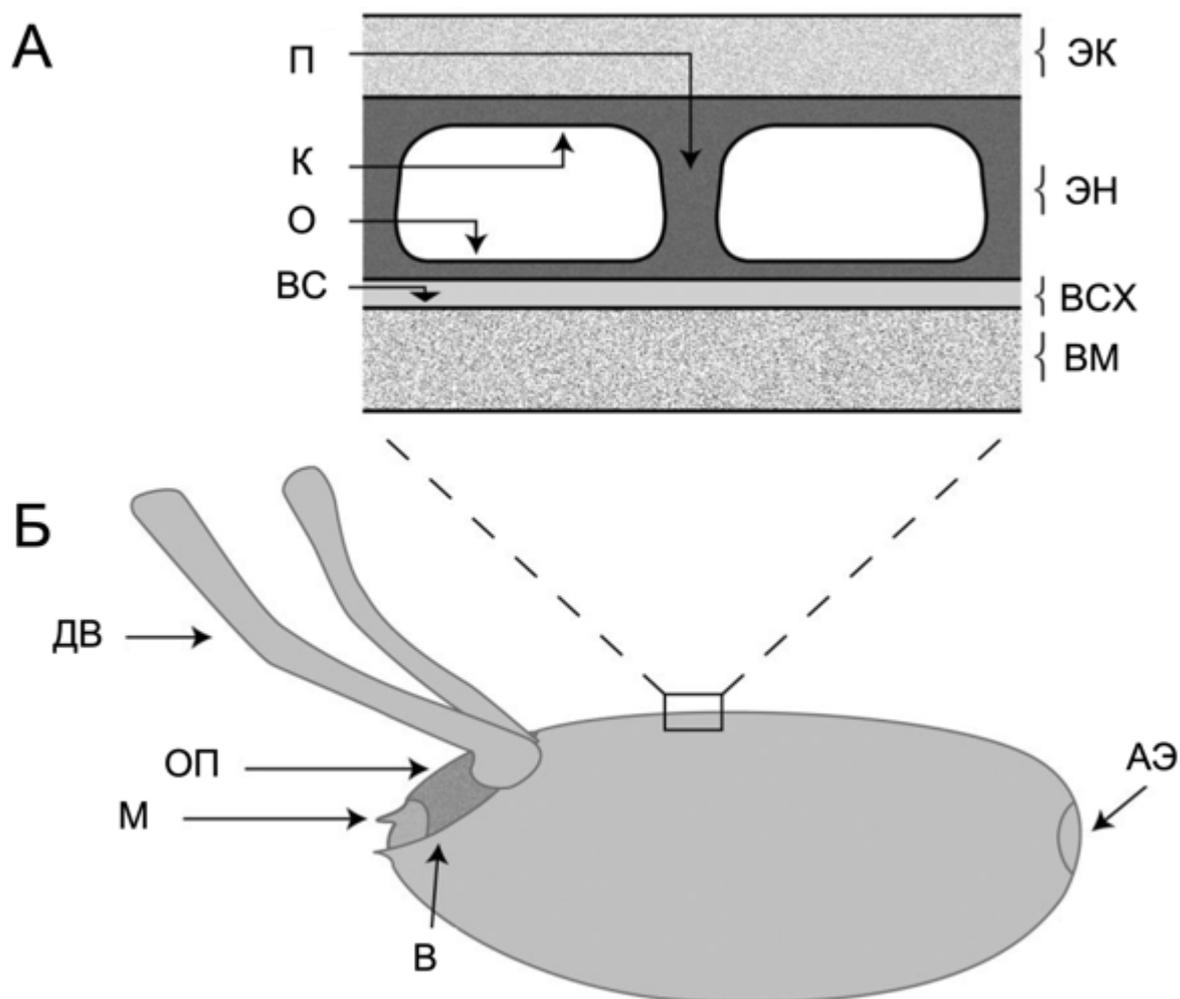


Рисунок 1. Морфология оболочки яйца *D.melanogaster*. А: Схематический вид многослойной оболочки яйца. Внутренние слои включают вителлиновую мембрану (ВМ), восковой слой (ВС) и внутренний слой

хориона (ВСХ). Внешние слои включают экзохорион (ЭК) и эндохорион (ЭН), его тонкое основание (О) отделено от внешней крыши (К) вертикальными столбиками – пилларс (П). Б: Схематическая структура яйца дрозофилы, иллюстрирующая специализированные области оболочки. Структуры - микропиле (М), оперкулум (ОП) и дорсальные выросты (ДВ). Также указаны аэропиле (АЭ) и воротник (В) [по: Cavaliere et al., 2008].

Белковая структура хориона у *Drosophila melanogaster* относительно проста и включает шесть мажорных и 14 минорных белков [Hamodrakas et al., 1989]. Гены, кодирующие основные структурные белки яичной скорлупы, транскрибируются в клетках фолликулов на стадиях 8–14 оогенеза в четко определенном временном порядке [King, 1970; Spradling, 1993; Waring, 2000].

Основные гены хориона расположены в двух кластерах, соответственно, расположенных в области 7F на X-хромосоме (s36 и s38) [Parks et al., 1986] и в области 66D на третьей хромосоме (s15, s16, s18 и s19) [Spradling, 1981; Griffin-Shea et al., 1982]. В соответствии со стадиями хориогенеза, основные белки хориона обозначаются как ранние (s38, s36), средние (s19, s16) и поздние (s18, s15) [Griffin-Shea et al., 1982; Parks et al., 1986]. Отметим, что так называемые ранние белки начинают продуцироваться на первых стадиях оогенеза и их продукция продолжается до его заключительных стадий.

2. 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 у[1] cv[1] Cp36[dec2-1] v[1] f[1]/FM0 (BL:4842), приобретённой в Bloomington Drosophila Stock Center (Indiana, USA). Сбор яиц *Drosophila melanogaster* осуществлялся на 4–5 день после выхода самок из куколок. Курицы породы Русская белая возраста 6 месяцев были приобретены в подразделении Всероссийского научно-исследовательского института генетики и разведения сельскохозяйственных животных Генофонд (Ленинградская обл., г. Пушкин).

Умерщвление куриц проводили в соответствии с этическими требованиями государственного и международного уровня, что подтверждено имеющимся заключением Этической комиссии СПбГУ №131-03-2. Выбранные виды является хорошо разработанными модельными организмами, их геном расшифрован, собран и аннотирован, что позволяет использовать существующие открытые базы данных для идентификации белков - кандидатов на роль функциональных амилоидов.

2.1. Изготовление и подготовка криосрезов

Яичники *Gallus gallus domesticus* и *Drosophila melanogaster* были зафиксированы в 4% растворе PFA на PBS и заморожены в -70°C в криосреде Tissue freezing medium (Leica, Германия). Криосрезы толщиной 20 мкм были получены с использованием криотома CM1850UV (Leica Microsystems, Германия). Демаскировка антигенов была достигнута путем инкубации срезов в 0,01M цитратном буфере в течение 10 мин при температуре 95° с последующим медленным охлаждением до температуры комнаты. После этого криосрезы инкубировали 20 минут в PBS с 0,1% Triton X-100. Трёхкратная отмывка образцов на каждом этапе обработки материала осуществлялась раствором PBS по 5 мин при комнатной температуре.

2.2. Подготовка и окрашивание препаратов хромосом «ламповых щеток»

Хромосомы типа ламповых щёток выделяли микрохирургическим способом из превителлогенных ооцитов половозрелых куриц в соответствии со стандартной методикой [Saifitdinova, et al. 2017]. После фиксации в 2% растворе формальдегида в PBS препараты выдерживали в 70% этаноле при +4 °C до использования.

а) Окрашивание тиофлавином S

Хромосомы ламповых щеток окрашивали 1% раствором тиофлавина S (Sigma, США) в 70 % этаноле во влажной камере при комнатной температуре в течение 5 мин. После этого препараты трижды промывали по 5 мин в 70 % этаноле, обезвоживали в 96 % этаноле и сушили на воздухе. Препараты помещали в антифейд-среду (PBS с 1 % DABCO (Sigma D2522, США) и 90% глицерином), для дальнейшего цитологического анализа.

б) Окрашивание конго красным

Препараты хромосом ламповых щеток последовательно регидратировали до 50 % этанола и окрашивали 1% водным раствором конго красного (Reanal, Венгрия) во влажной камере при комнатной температуре в течение 10 мин. После этого препараты трижды промывали по 5 мин в 50 % этаноле, обезвоживали в серии спиртов до 96 % и сушили на воздухе. Препараты заключали в антифейд-среду с 1 мкг/мл DAPI.

в) Окрашивание антиамилоидными антителами (OC)

Для минимизации неспецифического связывания антител регидратированные препараты ламповых щеток инкубировали в PBS с 1% блокирующим реагентом (Blocker BSA in PBS) (ThermoFisher Scientific, США) в течение 1 ч при комнатной температуре. Использовали первичные конформационно-специфические антитела к амилоидным фибриллам (OC, ab2286, Sigma, США) в разведении 1:500. Препараты хромосом ламповых щеток инкубировали с первичными антителами в течение ночи при +4 °C и с

вторичными антикроличьими антителами, конъюгированными с Alexa Fluor 594 (ThermoFisher Scientific, США), в течение 1 ч при +37 °С. Оба раствора антител разводили в PBS с 1% блокирующим реагентом (Blocker BSA in PBS) (ThermoFisher Scientific, США). Препараты дополнительно окрашивали DAPI и помещали в антифейд-среду, описанную ранее.

г) Обработка пепсином

Регидратированные препараты ламповых щеток промывали в течение 5 мин в 2xSSC, обрабатывали 0,0002 % раствором пепсина в 0,01 N HCl при +37°С в течение 10 мин и постфиксировали 1 % параформальдегидом (в PBS, 50 mM MgCl₂). Обезвоженные препараты окрашивали тиофлавином S, как описано выше.

2.3. Окрашивание криосрезов тиофлавином S

Препараты, обработанные по протоколу, описанному выше (п. 2.1), частично дегидратировали в 70% этаноле, после чего инкубировали в 1% растворе тиофлавина S в 70% этаноле в течение 5 мин. После трехкратной отмывки срезов в 70% этаноле, образцы регидратировали в PBS и заключали в раствор глицерина, PBS и DAPI (1 мкг/мл) для цитологического анализа.

2.4. Окрашивание криосрезов конго красным

Криосрезы отмывали в PBS от заключающей криосреды, после чего окрашивали 1% водным раствором конго красного (Reanal, Венгрия) в течение 10 минут с последующей трехкратной отмывкой в PBS и заключали в раствор глицерина, PBS для последующей микроскопии.

2.5. Иммуногистохимический анализ

Детекцию белков s36 и s38 в ткани яиц дрозофилы проводили методом иммунофлюоресцентного анализа. Для снижения неспецифической флуоресценции препараты инкубировали в PBS с 1% BSA в течение часа при +37°С. Криосрезы с антителами к s36 или s38 (Алма-Бион, Россия) в разведении 1: 1000 инкубировали в течение ночи при температуре +4°С. После

трехкратной отмывки в 0,1% растворе Tween-20 в PBS образцы инкубировали со вторичными антителами, конъюгированными с Alexa Fluor® 647, Goat anti-Rabbit IgG (Thermo Fisher Scientific, США) в разведении 1: 1500 в течение 1 ч при температуре +37°C. После трехкратной отмывки в 0,1% растворе Tween-20 в PBS препараты заключали в раствор antifade для последующего анализа локализации s36 или s38. Окрашивание амилоид-специфичными антителами (OC, ab2286, Sigma, США) проводили по тому же протоколу с теми же разведениями антител.

2.6. Микроскопия

Препараты анализировали с использованием конфокального лазерного сканирующего микроскопа TCS SP5 (Leica Microsystems GmbH, Германия) с программным обеспечением «Leica Application Suite X 3.3.0.16799», флуоресцентного микроскопа Leica DM6000B (Leica Microsystems GmbH, Германия) с программным обеспечением «Leica QWin standart V. 3.2.0.». Препараты, окрашенные конго красным, анализировали с помощью инвертированного микроскопа Leica DMI6000B с программным обеспечением «Leica Application Suite». Анализ структуры фибрилл проводился с использованием электронного микроскопа JEM-2100 HC (JEOL Ltd., Япония).

2.7. Протеомный скрининг

Протеомные скрининги были проведены по стандартной методике, разработанной в нашей лаборатории и успешно апробированной ранее [Ryzhova et al., 2018; Sopova et al., 2019]. Данный метод основан на универсальном свойстве амилоидных фибрилл – их высокой устойчивости к обработке SDS. Фракция белков, формирующих нерастворимые SDS-устойчивые агрегаты, отделяется от прочих белков ультрацентрифугированием, после чего белки расщепляются трипсином и идентифицируются методом LC-MALDI [Galkin, 2017].

а. Выделение фракции белковых агрегатов, устойчивых к обработке детергентами

1) Яичники *Drosophila melanogaster* или *Gallus gallus domesticus* были гомогенизированы при помощи криомельницы. Полученный гомогенат хранили при -70°C .

2) К измельчённой ткани (500-800 мг) добавляли ~3 мл раствора TBS, 10мМ EDTA, 2мМ PMSF), тщательно суспендировали.

3) Центрифугирование проводили с помощью CR3i multifunctional Centrifuge («Jouan SA», США) при 3000 rpm (ротор AC 2.14) в течение 5 мин при $+4^{\circ}\text{C}$.

4) Супернатант отбирали, затем к образцу добавляли 5 мг РНКазы А (160-330 единиц активности) («Sigma-Aldrich», США), доводили объем пробы до 7 мл, инкубировали 30 мин при комнатной температуре.

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

6) Ультрацентрифугирование проводили при 50 000 rpm (ротор Ti75) (центрифуга Optima L-100 XP Ultracentrifuge; «Beckman Coulter», США) в течение 2 ч при $+8^{\circ}\text{C}$. Последующие центрифугирования проводились с использованием этой же модели центрифуги и типа ротора.

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

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

9) Наслаивали на 2 мл раствора TBS с 20% сахара и 0,1% SDS в пробирки. Инкубировали 8 ч при $+18^{\circ}\text{C}$.

10) Ультрацентрифугировали при 50 000 rpm в течение 8 ч при $+18^{\circ}\text{C}$.

11) Осадок суспендировали в минимальном количестве воды, затем добавляли воды до объема равного 8 мл и ультрацентрифугировали при 50 000 rpm в течение 2 ч при $+8^{\circ}\text{C}$.

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

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

б. Идентификация белков

Из пробы были удалены соли на колонках Zeba™ Spin Desalting Columns (#89882, ThermoFisher Scientific, США) и детергенты на колонках HiPPR™ Detergent Removal Spin Column Kit (#88305, ThermoFisher Scientific, США) по протоколам производителей, после чего проба была отдана в РЦ РМиКТ СПбГУ на проведение высокоэффективной жидкостной хроматографии, совмещенной с масс-спектрометрией.

2.8. Биоинформатический анализ

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

2.9. Штаммы микроорганизмов, среды и условия культивирования

В данной работе использовали штаммы *Escherichia coli* DH5α (генотип: supE44 ΔlacU169 (φ80lacZΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1), XL10-Gold (генотип: endA1 glnV44 recA1 thi-1 gyrA96 relA1 lac Hte Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 tetR F'[proAB lacIqZΔM15 Tn10(TetR Amy CmR)]), Rosetta (генотип: E. coli str. B F- ompT gal dcm lon? hsdSB(rB-mB-) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7p07 ind1 sam7 nin5]) [malB+]K-12(λS) pLysSRARE[T7p20 ileX argU thrU tyrU glyT thrT argW metT leuW proL orip15A](CmR)) и NiCo21(DE3) (генотип: can::CBD fhuA2 [lon] ompT gal (λ DE3) [dcm] arnA::CBD slyD::CBD glmS6Ala ΔhsdS λ DE3 = λ sBamHIo ΔEcoRI-B int::(lacI::PlacUV5::T7 gene1) i21Δnin5).

Для культивирования бактерий использовали твёрдую и жидкую среды LB, отбор бактериальных трансформантов проводился на среде LB с

добавлением ампициллина в концентрации 50 мкг/мл, бактериальные трансформанты штамма Rosetta отбирались на среде, содержащей дополнительно хлорамфеникол в концентрации 34 мкг/мл. Штаммы бактерий культивировали при температуре 37°C.

2.10. Выделение тотальной РНК из гомогенизированной ткани печени *Gallus gallus domesticus* и яичников *Drosophila melanogaster*

В связи с тем, что белок Vtg2 синтезируется в печени и транспортируется в ооциты с током крови, РНК для последующего получения кДНК, кодирующей Vtg2, выделяли именно из печени. Белки хориона синтезируются непосредственно в яичниках, поэтому для выделения РНК дрозофил использовали материал яичников.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

10) Хранили РНК при -20°C.

11) Полученную тотальную РНК проверяли методом электрофореза.

2.11. Стандартные генно-инженерные методы

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

Нуклеотидные последовательности использованных в работе праймеров приведены в Таблице 2. Для подбора праймеров использовали последовательность гена VTG2, кодирующего белок Vitellogenin-2, из базы данных NCBI Genbank, применяли программное обеспечение «Oligonucleotide properties calculator» (США), «BioEdit Sequence Alignment Editor» и «Vector NTI Advance» (Life Technologies, США). Синтез праймеров осуществляла компания «Beagle» (РФ).

Таблица 2. Использованные в работе праймеры

Название	Последовательность 5'-3'
For2-His Vit2	CGCCTCGAGAAAGCTCTGCAGGGATGG
Rev2-His Vit2	CAGGATCCTTAATGAACTGGCATCAAAACTA
For2-CP36-NHis	CGCCTCGAGCTGGTGAGCGCTAACTATGGTC
Rev2-CP36-NHis	CAGGATCCTTAGTAGTTGGGCTGGCCATAGGG
For cp7Fa DNA	CTCCCACAGTCAGTCCAAACT

Rev cp7Fa DNA	ACATCCATTCTCTCCTTGGC
For cp7Fb DNA	ATTCTGCGGCTAGTAGCCAG
Rev cp7Fb DNA	TTAAGCCGAGCTCAGCAGAT
For cp7Fc DNA	AATCGAGCTACTTTTGTGGGTA
Rev cp7Fc DNA	CTCAATGGTCTGGAGACCG

Реакцию амплификации для гена *VTG2* проводили в следующих условиях:

95°C – 2 мин. (1 цикл)

94°C – 1 мин., 44°C – 45 сек., 72°C – 1 мин. (1 цикл)

94°C – 1 мин., 62°C – 45 сек., 72°C – 1 мин. (30 циклов)

72°C – 10 мин. (1 цикл)

Реакцию амплификации для гена *Cp36* проводили в следующих условиях:

95°C – 2 мин. (1 цикл)

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

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

72°C – 10 мин. (1 цикл)

Реакцию амплификации для генов *cp7F* проводили в следующих условиях:

95°C – 3 мин. (1 цикл)

95°C – 30 сек., 52°C – 30 сек., 72°C – 2 мин. (35 циклов)

72°C – 5 мин. (1 цикл)

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

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

Для рестрикции последовательности *VTG2*, полученной в результате ПЦР на специфичных праймерах (табл. 1) были использованы эндонуклеазы рестрикции XhoI и BamHI, для *ch36* – XhoI и XbaI.

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* также проводили по стандартной методике [Inoue et al., 1990]. Выделение плазмидной ДНК из *E. coli* осуществляли при помощи метода щелочного лизиса [Sambrook et al., 1989].

2.12. Иммунохимический анализ

2.12.1. Выделение белка

Ткань гомогенизировали с помощью криомельницы. Затем гомогенат суспендировали в 300 мкл буфера (50 mM Tris-HCl, pH 7.6, 150 mM NaCl, 10 mM EDTA, 10 mM PMSF) и центрифугировали (5 мин, 3000 об/мин) при 4°C. Для дальнейшей работы использовались надосадочная жидкость (клеточные лизаты). Центрифугирование клеточных лизатов проводили при 75000 g 50 мин при 4°C. Надосадочную фракцию переносили в новую пробирку, а осадку добавляли равный объем буфера. Для денатурации белков перед нанесением их на гель или хранением (при -20°C или -70°C) к пробам добавляли 1/3 объема 4-х кратного буфера для образцов (100 mM Tris-HCl pH

6,8, 20% 2-меркаптоэтанол, 8% SDS, 0,2% бромфеноловый синий, 40% глицерин), после чего инкубировали 15 минут при 100°C.

2.12.2. Белковый электрофорез и «Вестерн-блот»

Денатурирующий белковый электрофорез проводили в 10% или 12% полиакриламидном геле в камере «Mini-PROTEAN 3 Cell» «Bio-Rad» (Италия). Перенос белков на мембрану PVDF Hybond-P осуществляли в буфере TAE с добавлением 20% этилового спирта и 1% додецил-сульфата натрия с помощью модуля для переноса «Mini-PROTEAN 3 Cell» «Bio-Rad» (Италия). Для определения размера белков использовали маркер молекулярного веса «RainBow» «Amersham» (Великобритания).

Иммунохимическую детекцию проводили с использованием следующих первичных антител: к VTG2 – ab36794 (Abcam, Великобритания) в разведении 1: 500, к s36 – антитела, произведенные на заказ в разведении 1:10000, и вторичных моноклональных антител к иммуноглобулинам мыши (для антител к VTG2) или кролика (для антител к s36), конъюгированных с пероксидазой хрена производства фирмы «Amersham» (Великобритания). Вторичные антитела детектировали с использованием наборов реактивов «ESL» и «ESL-advanced» фирмы «Amersham» (Великобритания), согласно прилагающейся инструкции.

2.12.3. Нарботка и очистка рекомбинантного белка

Исследуемые белки, тагированные последовательностью 6xHis были наработаны в *E. coli*. Белок s36 был наработан в штамме NiCo21(DE3)), индукция синтеза белка производилась 0.2mM IPTG, клетки инкубировались при +22°C в течение ночи; фрагмент белка Vtg2 был наработан в штамме Rosetta (индукция 0.2mM IPTG, инкубация +37°C в течение ночи).

Клетки бактерий были лизированы при помощи ультразвука в 20mM натрий-фосфатном буфере (pH 8.0) с добавлением 0.7mM NaCl, 1.5mM DTT, 1mM EDTA, 1.2mM PMSF. Клеточный дебрис осаждали (10 мин, 12000 об/мин) при 4°C, наработанный белок из осветленного лизата далее был очищен с помощью аффинной хроматографии на колонке Ni Sepharose High Performance (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Sweden) по протоколу производителя.

Очищенный белок для избегания потерь был переведен на концентраторе Amicon Ultra (10kDa, Sigma-Aldrich, США) из буфера для хроматографии в буфер PBS с 2mM DTT и ингибиторами протеаз (Halt™ Protease Inhibitor Cocktail (100X), ThermoFisher Scientific, США). Для получения амилоидных фибрилл белки инкубировали в данном буфере в течение 5 суток при комнатной температуре с медленным вращением.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1. Поиск амилоидных структур в яичниках *Gallus gallus domesticus*

3.1.1. Цитологическое окрашивание яичников куриц амилоидспецифичными красителями.

Из фиксированных яичников были подготовлены препараты и изготовлены криосрезы. Данные криосрезы были окрашены амилоид-специфичным красителем тиофлавин S (рис. 2) и ДНК-связывающим красителем То-Pro.

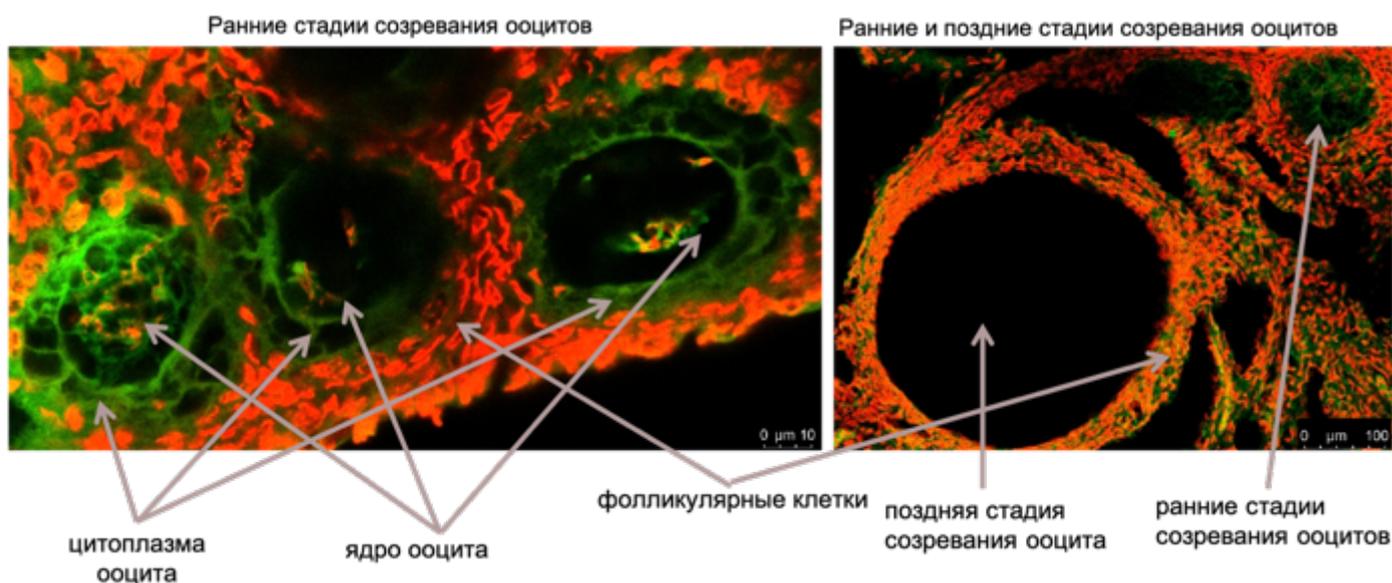


Рисунок 2. Криосрезы яичника курицы окрашены красителем То-Pro, связывающим ДНК, и амилоид-специфичным красителем тиофлавин S.

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 3.

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. 3). Окрашивание конго красным и двойное лучепреломление (жёлто-зелёное свечение) после такого окрашивания принято считать основным критерием при выявлении амилоидных структур [Howie et al., 2008; Venson 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.

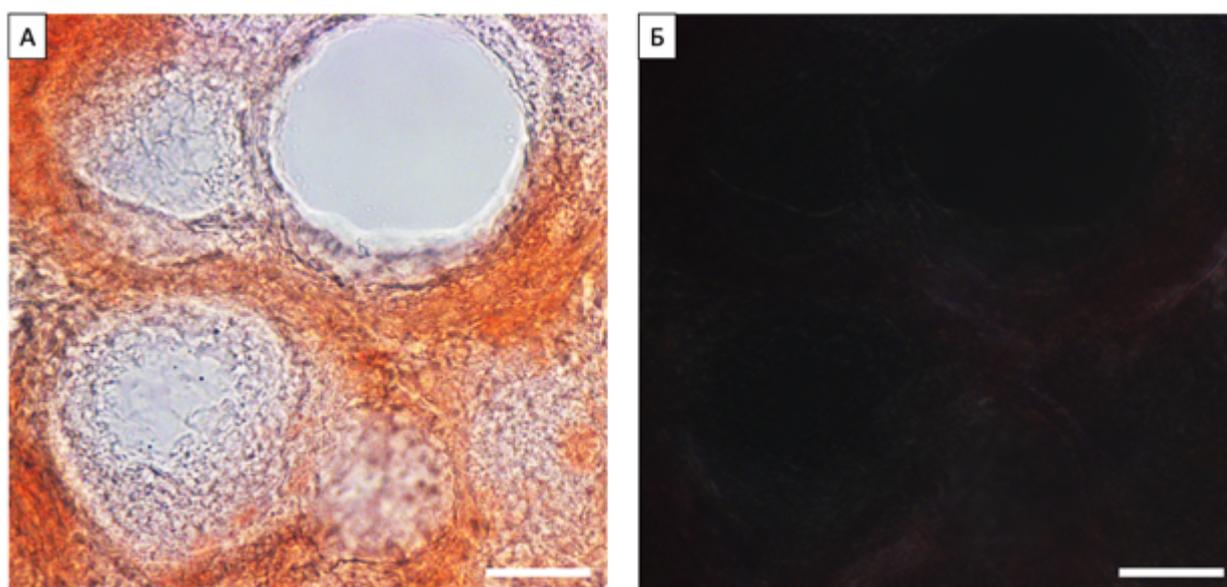


Рисунок 3 Окрашивание криосрезов яичников курицы конго красным. А, Б – окрашивание ооцитов курицы на ранних стадиях созревания амилоид-специфичным красителем конго красный; А – светлое поле, Б – поляризованный свет.

3.1.2. Протеомный скрининг белков, формирующих SDS-устойчивые амилоидоподобные агрегаты в яичниках куриц.

Помимо цитологических окрашиваний мы провели протеомный скрининг белков, формирующих в яичниках куриц амилоидоподобные SDS-

устойчивые агрегаты. Было проведено четыре скрининга – по одному для каждой стадии роста ооцитов. Белки яичника куриц, идентифицированные этим методом, представлены в таблице 3.

Таблица 3. Белки идентифицированные в яичнике курицы методом протеомного скрининга амилоидов

Белок	Функция	Источник
VTG2	Предшественник 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, <i>Developmental Biology</i>
-------	--	---

Белок вителлогенин 2 (VTG2) является основным предшественником белков яичного желтка. Он синтезируется в печени и образует везикулы, которые с током крови транспортируются в фолликулярные клетки яичников. Из фолликулярных клеток везикулы поступают в ооциты, по всей видимости по трансосомам [Nimpf and Schneider, 1991]. На ранних стадиях развития ооцита цитоплазма содержит большое количество вителлогенина, но затем под действием протеазы катепсина D этот белок-предшественник расщепляется на четыре белка, которые представляют собой основной запасующий компонент яичного желтка [Elkin et al., 1995]. Также методом протеомного скрининга был идентифицирован белок вителлогенин 1 (VTG1), однако со значительно более низким счетом масс-спектрометрии. Данный белок также является предшественником запасующих белков желтка, однако является минорным по сравнению с вителлогенином 2.

Кроме вителлогенина в яичниках курицы методом протеомного скрининга амилоидов были идентифицированы четыре ядерных белка, ассоциированных с хроматином (PDS5, SMC5, PRPF3 и CHD7), и два белка теплового шока HS90A и HSP7C. Ранее при выявлении амилоидов в клетках дрожжей *S. cerevisiae* мы показали, что некоторые шапероны образуют очень прочные комплексы с амилоидными фибриллами [Nizhnikov et al., 2016; Ryzhova et al., 2018]. 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.

На рисунке 2 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. Напомним, что вителлогенин, идентифицированный нами в протеомном скрининге амилоидов, представлен в фолликулярных клетках и является мажорным компонентом цитоплазмы ооцитов на ранней стадии развития [Elkin et al., 1995]. Как уже отмечено, 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. 2).

Тиофлавин-позитивные структуры, которые детектируются в ядрах ранних ооцитов, могут соответствовать хроматин-ассоциированным белкам (PDS5, SMC5, PRPF3 или CHD7), которые выявлены нами методом протеомного скрининга во фракции SDS-устойчивых агрегатов (Табл. 3).

3.1.3. 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 яичниках куриц. Тотальный белок, выделенный из исследуемых тканей, был разделён на надосадочную и осадочную фракции с помощью центрифугирования. Иммунохимический анализ проводился с использованием первичных антител специфичных к вителлогенину. 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. 4).

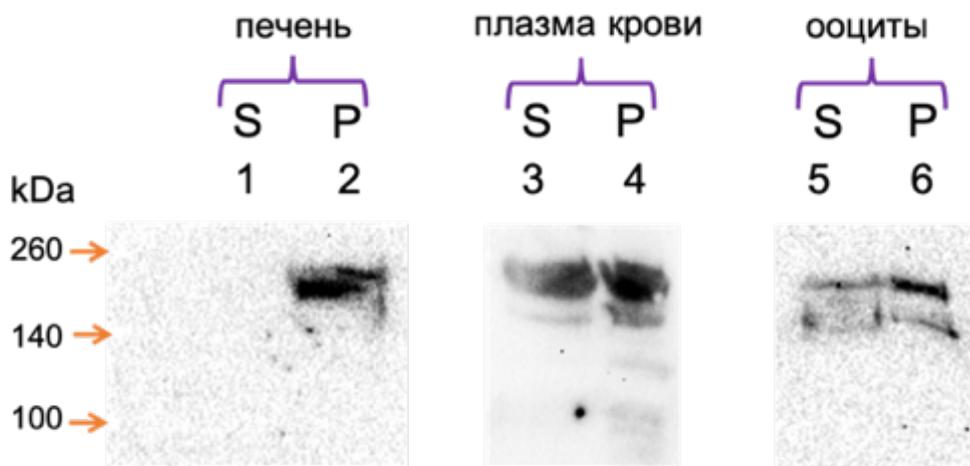


Рисунок 4. Vtg2 присутствует в плазме крови и ооцитах как в мономерном, так и в агрегированном состоянии, в печени – только в агрегатах (S – супернатант, P – осадок).

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 (рис. 5). Данный фрагмент (696–1019 а.к.) на относительно небольшой протяженности содержит ряд предсказанных потенциально амилоидогенных регионов.

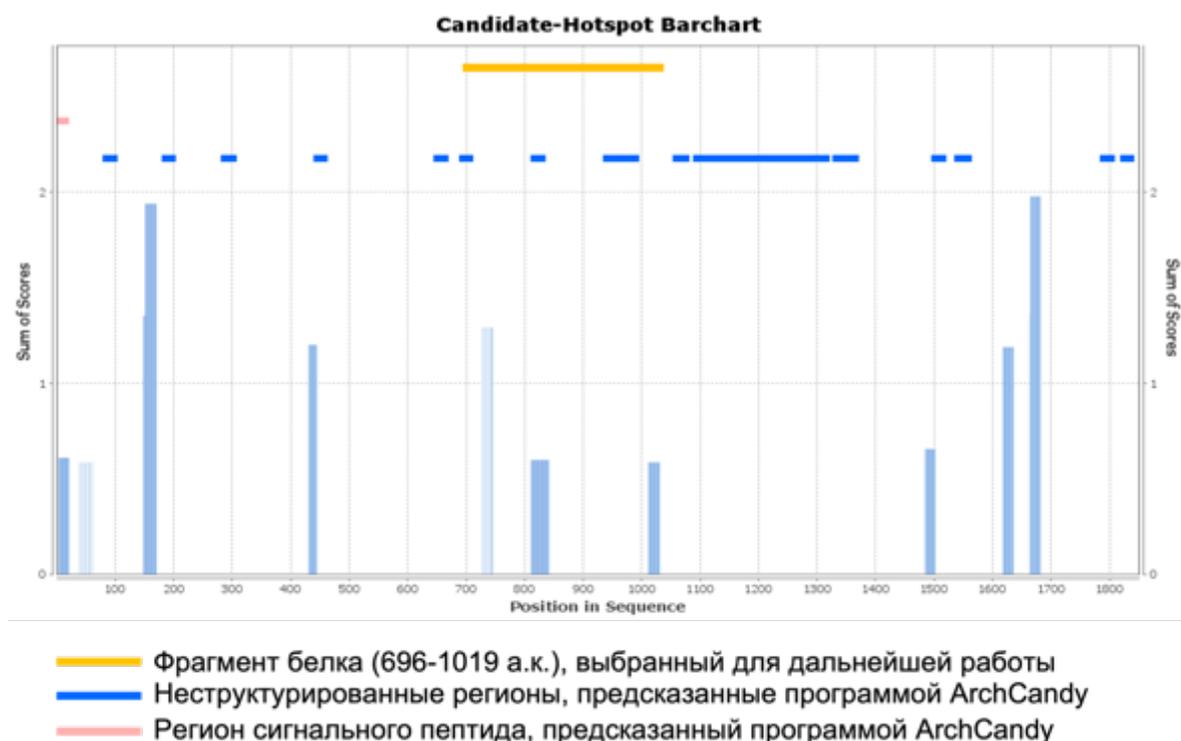


Рисунок 5. Биоинформатический анализ Vit2 с использованием программы ArchCandy.

Был проведён анализ амилоидных свойств выбранного фрагмента вителлогенина. Была сконструирована плазмида 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. Более того, электрофоретический анализ показал, что фрагмент белка Vtg2 является мажорным компонентом телец включения (рис. 6) и выделяется из них практически в чистом виде. В тельцах включения он представлен в виде агрегатов, которые показали устойчивость к 1% SDS при комнатной температуре, однако в присутствии 2% SDS агрегаты белка разбирались.

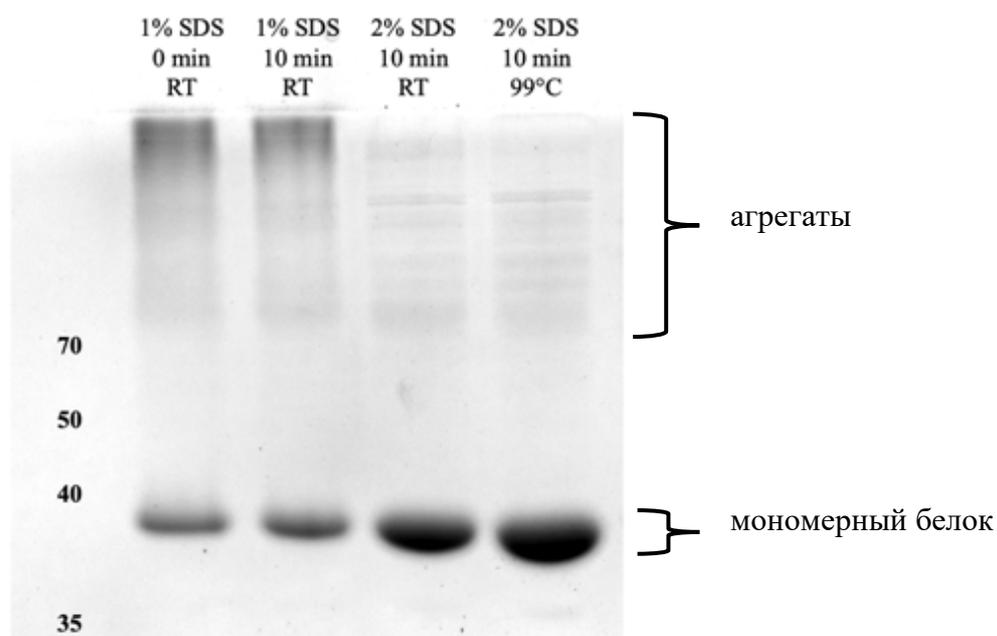


Рисунок 6. Обработка SDS очищенных телец-включений. Белок, находящийся в тельцах-включениях, демонстрирует устойчивость к 1% SDS.

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.7). 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.

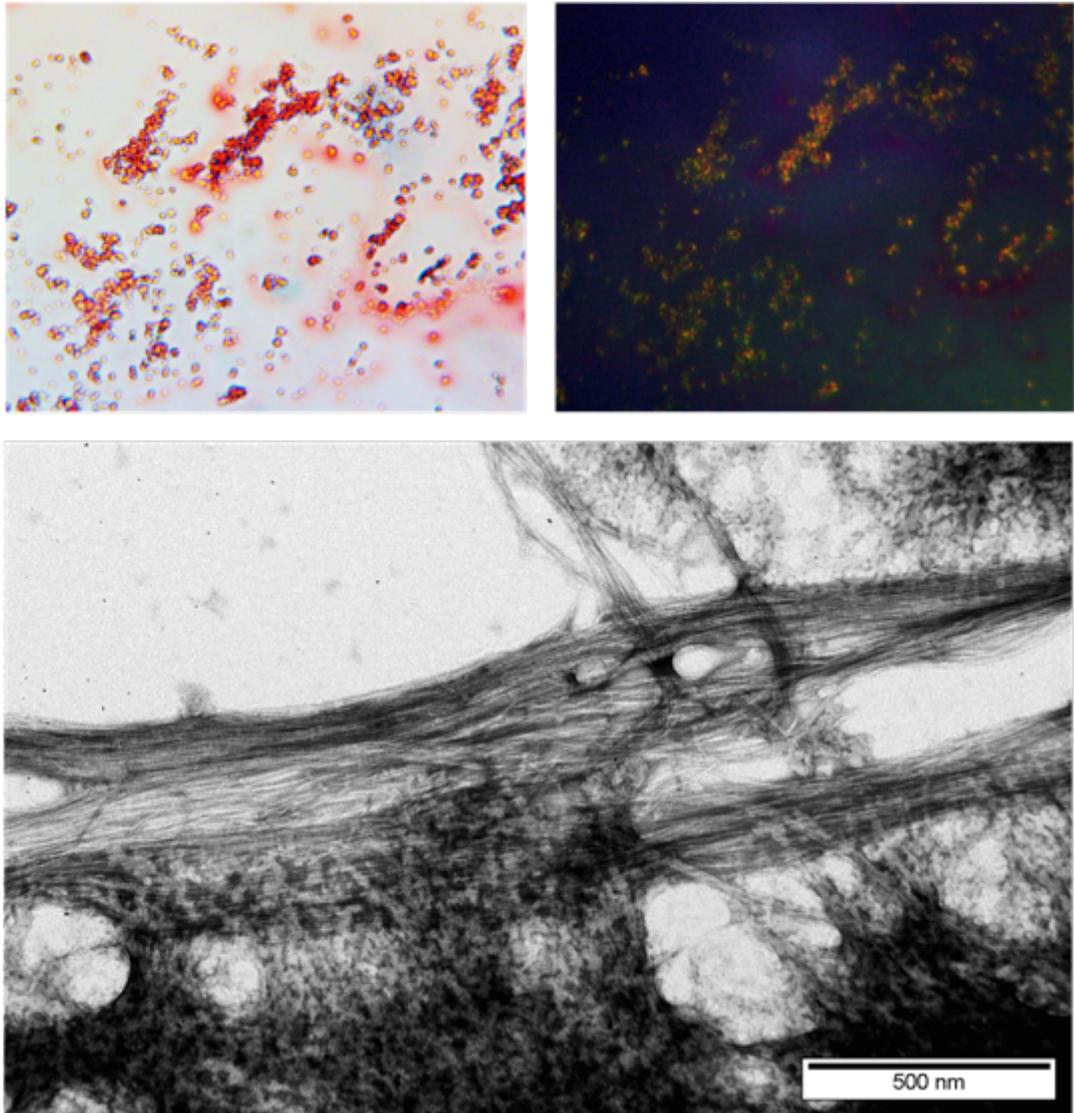


Рисунок 7. Анализ рекомбинантного фрагмента 2 вителлогенина. Очищенные тельца-включения, содержащие целевой белок, при окрашивании конго красным демонстрируют двойное лучепреломление в поляризованном свете (А – светлое поле, Б – поляризованный свет), а также формируют фибриллы (В – электронная микроскопия).

3.1.4. 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. 8А) [Kulikova et al., 2015]. Чтобы убедиться, что тиофлавин S связывает именно белки, мы обработали препараты хромосом типа ламповых щеток пепсином. Данные, представленные на рисунке 8В, показывают, что после обработки пепсином, который расщепляет молекулы белка, тиофлавин S не связывается с хромосомами. Сравнительный анализ интенсивности окрашивания GITERA без обработки пепсином и после такой обработки представлен на рисунке 8С. Таким образом, можно сделать вывод, что данный краситель окрашивает именно белковые компоненты GITERA.

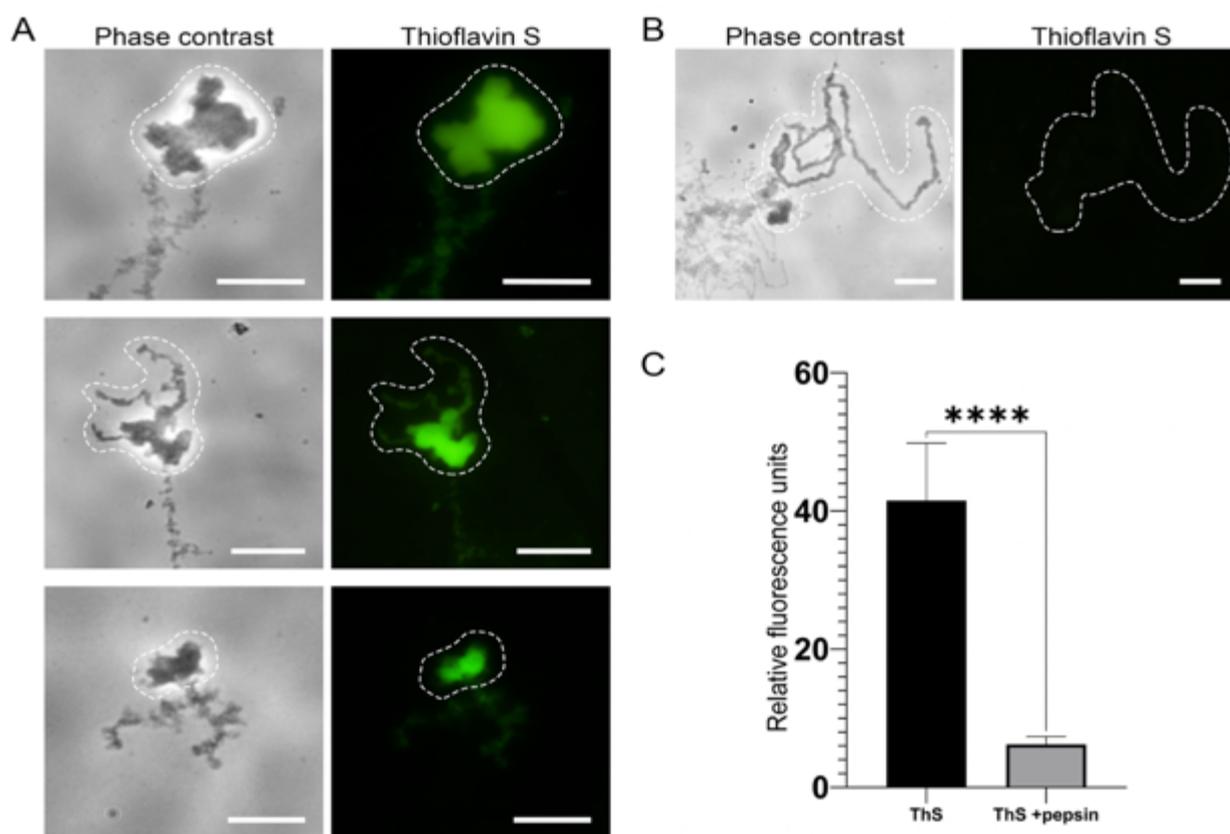


Рисунок 8. Хромосомы типа ламповых щеток, окрашенные амилоид-специфическим красителем тиофлавин S. (А) Тиофлавин S специфически связывает GITERA; (В) GITERA не связывают тиофлавин S после обработки

пепсином. Область локализации GITERA обведена пунктирной линией. Масштабные линейки - 10 мкм; (С) 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. Для детекции антител ОС использовали вторичные антитела, конъюгированные с AlexaFluor594. В этих экспериментах хромосомы дополнительно окрашивали DAPI. DAPI ярко окрашивал ось хромосомы, но его флуоресценция практически не обнаруживалась в областях локализации обогащенных РНК GITERA (рис. 9). Конго красный, а также амилоидспецифичные антитела не окрашивали GITERA (рис. 9). 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.

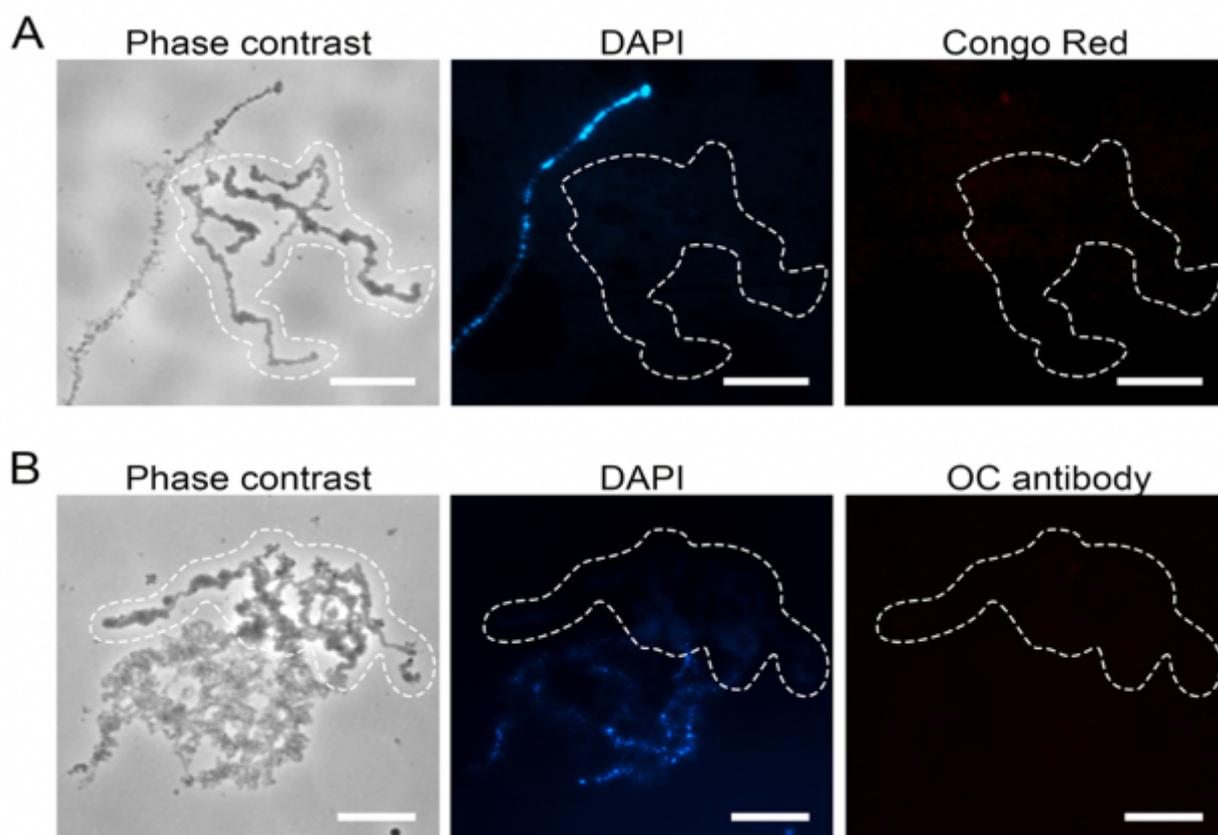


Рисунок 9. Хромосомы типа ламповых щеток после окрашивания амилоид-специфическим красителем конго красный (А) и конформационно-зависимыми антителами против амилоидных фибрилл ОС (В). Область локализации GITERA обведена пунктирной линией. Масштабные линейки - 10 мкм.

3.2. Поиск амилоидных структур в яичниках *Drosophila melanogaster*

3.2.1. Окрашивание яиц *Drosophila melanogaster* амилоидспецифичными красителями

Из фиксированных яичников были подготовлены препараты и изготовлены криосрезы. Данные криосрезы были окрашены амилоидспецифичными красителями тиофлавин S и конго красный. На рисунке 10 продемонстрированы результаты данных окрашиваний. Амилоидспецифичные красители интенсивно окрашивают отдельные структуры хориона дрозофилы, а именно микропиле, дорзальные выросты (они же – плавательные усики) (рис. 10 А–В) и пилларс – столбики (рис. 10 Г–Е). Эти структуры, окрашенные конго красным, также демонстрируют желто-зеленое двойное лучепреломление, что является характерным признаком амилоидов (рис. 10 Е). Все эти специализированные структуры хориона играют важную роль в развитии яиц насекомых.

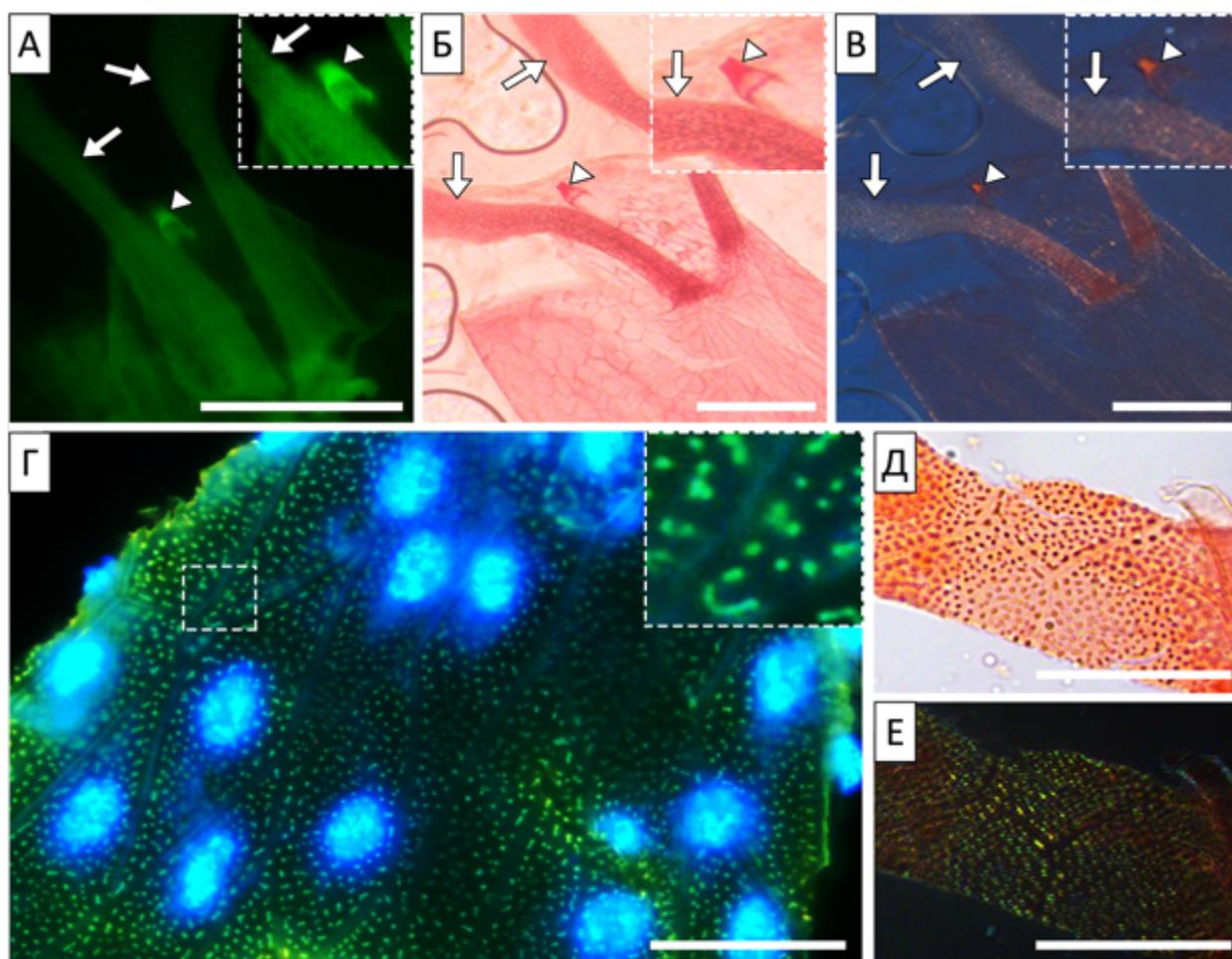


Рисунок 10. Окрашивание хориона яиц дрозофилы амилоид-специфичными красителями. Наиболее интенсивно связывают красители дорзальные выросты хориона (стрелки) и микропиле (наконечники стрелок). А, Г – окрашивание яиц дрозофилы амилоид-специфичным красителем тиофлавин S; Г – дополнительное окрашивание ядерным 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.

3.2.2. 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. 4, приложение А, Б). Обобщая данные цитологических окрашиваний и результаты протеомного скрининга можно заключить, что мажорные белки хориона являются наиболее перспективными кандидатами на роль функциональных амилоидов в оболочке ооцитов плодовой мушки. С наибольшим счётом во всех четырёх случаях выявлялся мажорный белок хориона s36. Напомним, что показатель «счёт масс-спектрометрии» отражает достоверность идентификации белка. После обработки хитиназой, разрушающей полисахаридный остов хориона, белки s18 и s16 во фракции детергент-устойчивых агрегатов не идентифицировались.

Таблица 4. 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*

3.2.3. 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 11).

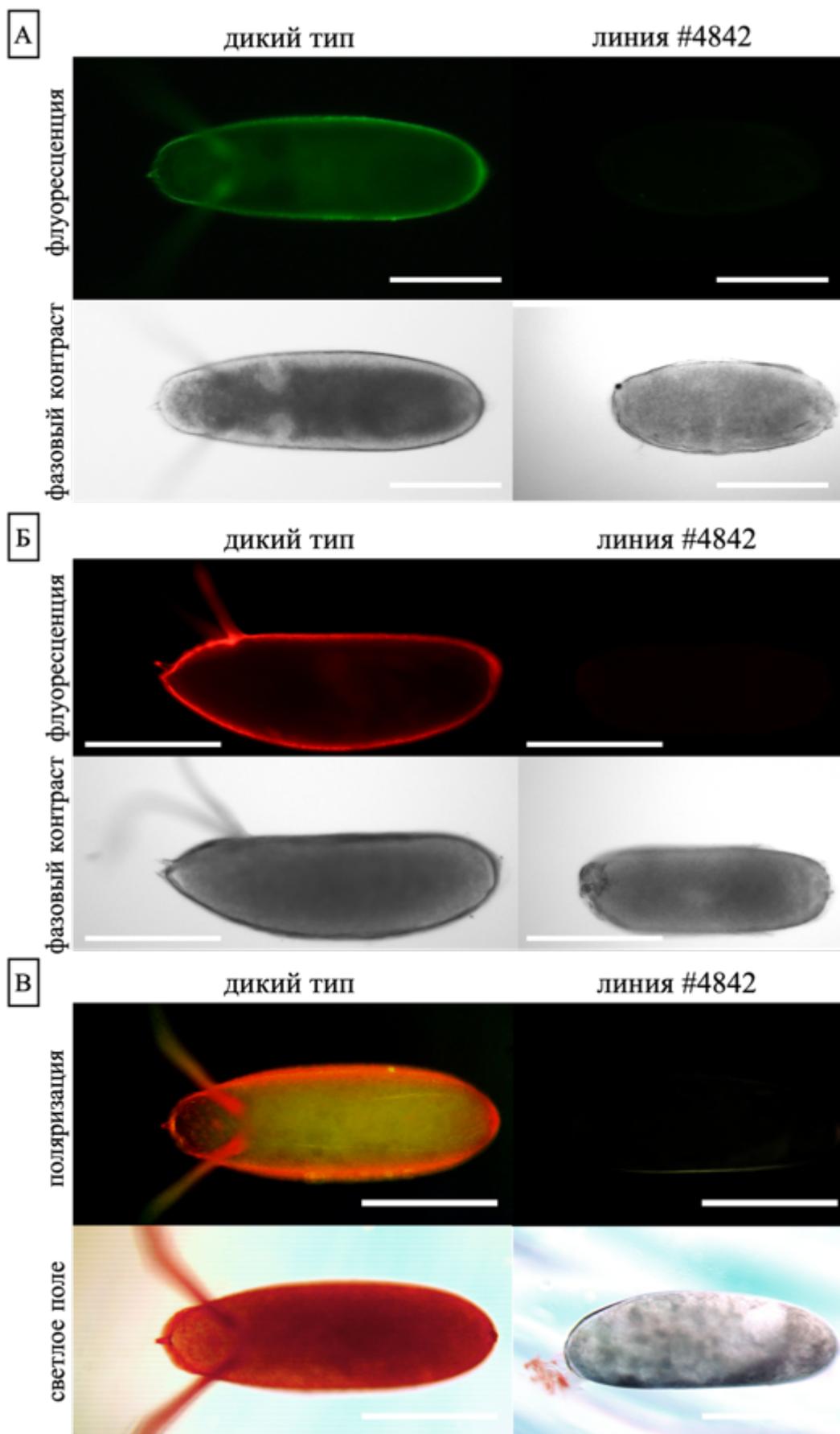


Рисунок 11. Окрашивание яиц дрозофил дикого типа и мутантов (линия #4842 BDSC) амилоид-специфичными красителями, хорион мутантных мух не

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 4) 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.

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

Для дальнейшей работы были получены антитела к белкам s36 и s38. Для исследования белка s38 компанией Алмабион были получены поликлональные антитела к пептиду CSAVNHPPLVVKPAPV. Для s36 та же фирма осуществляла производство антител, но уже к наработанному и очищенному нами рекомбинантному белку.

Для данной части работы была выделена тотальная РНК из яичников дрозофилы, наработана кДНК гена *cr36* с использованием специфических праймеров. Последовательность гена (без его сигнальной последовательности)

была встроена в вектор pET303, где была слита с С-конца с гистиридиновым тагом (6xHis-Tag). Очищенный белок был предоставлен компании Алмабион для наработки поликлональных антител.

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. 12). Оба белка продуцируются как у мух дикого типа, так и мух с хромосомной перестройкой.

В случае белка s38 и у мух дикого типа, и у мутантов белок в основном находится в агрегированной форме (рис. 12А), 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. 12Б). 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.

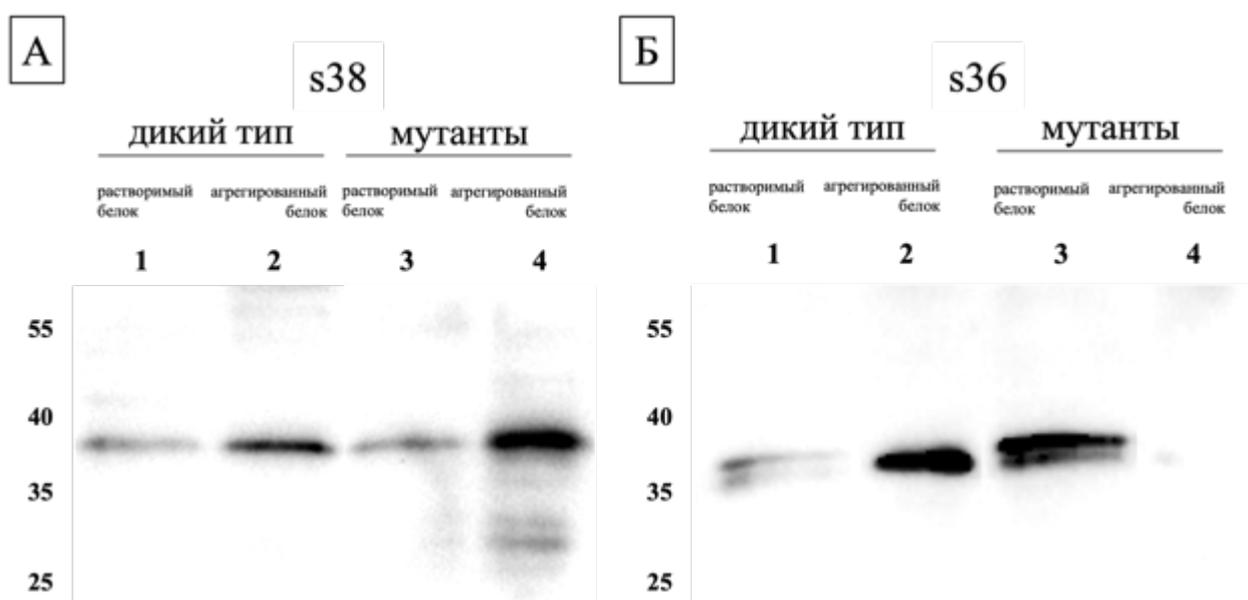


Рисунок 12. Анализ распределения белков хориона у мух дикого типа и у мутантов (линия #4842 BDSC). А – белок s38 присутствует и у мух дикого типа, и у мутантных мух преимущественно в агрегированном состоянии; Б -

белок s36 присутствует у дикого типа преимущественно в агрегированном состоянии, а у мутантных мух – в растворимом.

На следующем этапе работы были проведены иммуноцитологические окрашивания оболочек яиц дрозифил дикого типа и с хромосомной перестройкой в районе 7F антителами к белкам s36 и s38. Полученные результаты (рис. 13) 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. 13). На основании этих результатов можно заключить, что хромосомная перестройка препятствует секреции s36 из фолликулярных и питающих клеток в хорион.

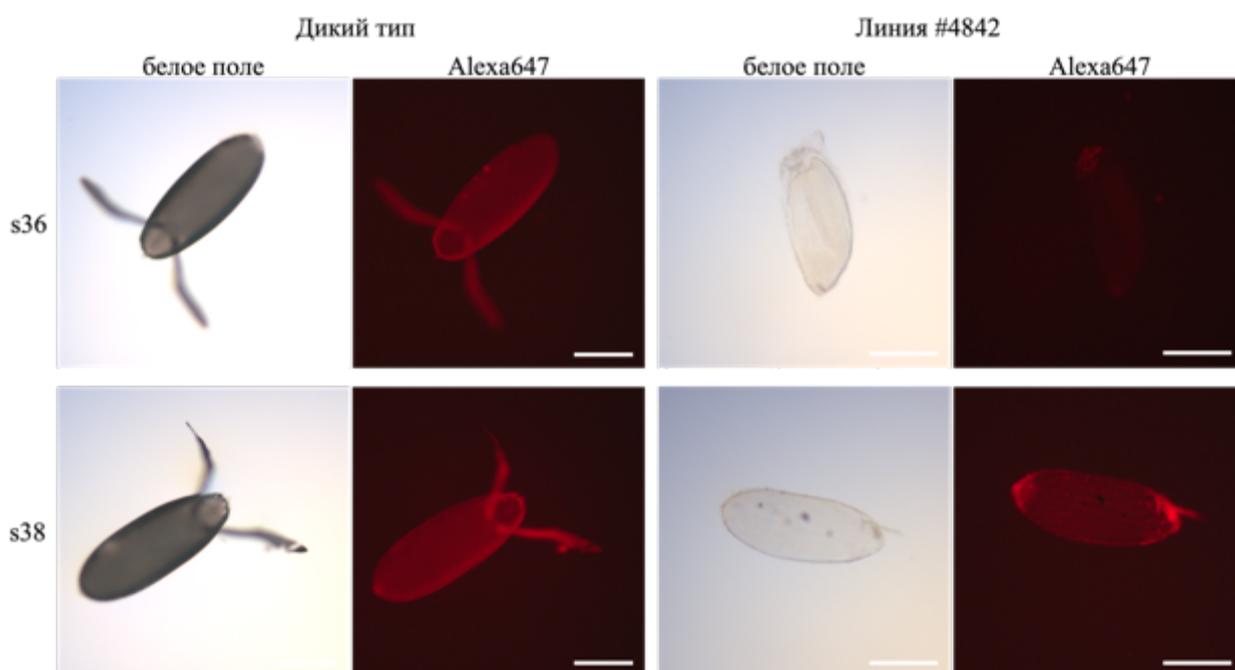


Рисунок 13. Окрашивание оболочек яиц дрозифил дикого типа и мутантов (линия #4842 BDSC) антителами к белкам s36 и s38, хорион мутантных мух окрашивается антителами к s38, однако не связывает антитела к белку s36.

Очевидно, что нарушение секреции из клеток во внешнюю оболочку яйца может быть обусловлено следующими причинами: а) произошла мутация непосредственно в белок-кодирующем регионе (например, в последовательности, кодирующей сигнальный пептид s36; б) для нормальной секреции и агрегации белка s36 необходим другой белок, который кодируется одним из генов в районе 7F, и хромосомная перестройка нарушает работу этого гена.

Для проверки первой гипотезы было проведено секвенирование последовательности гена *sr36*, полученной из мутантных мух. Было показано, что последовательности генов *sr36* у мух дикого типа и у мутантных мух не отличается (рис. 14).

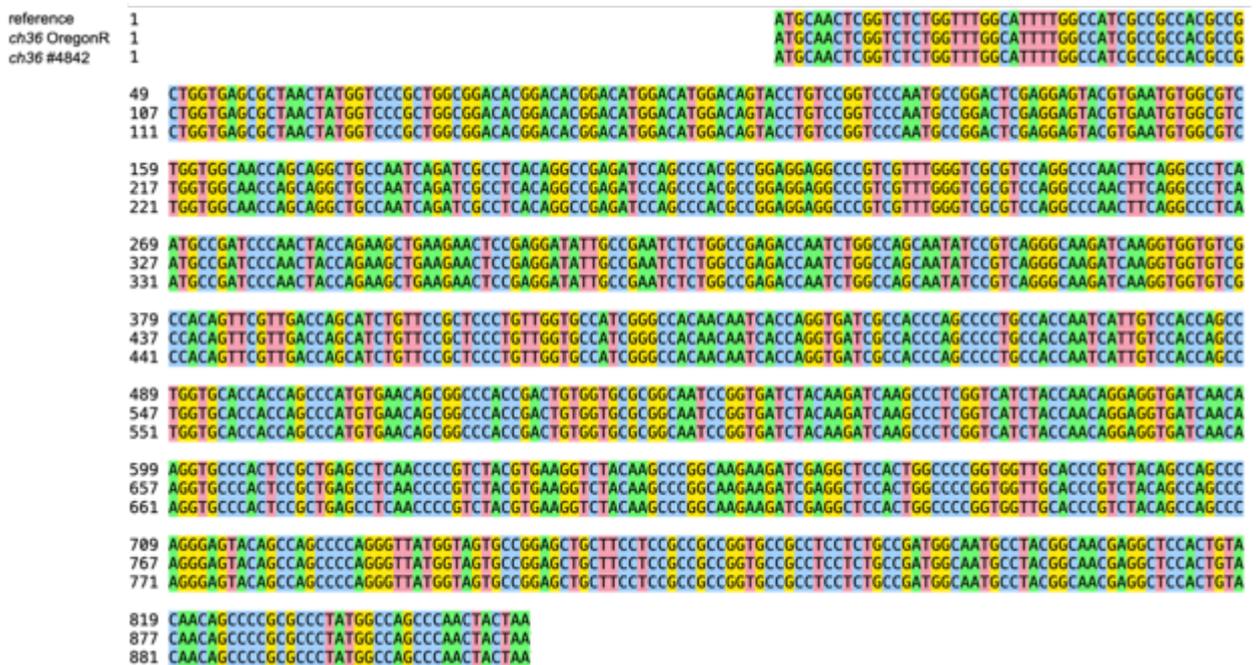


Рисунок 14. Результаты секвенирования последовательностей гена *sr36* мух дикого типа (вторая строка «*ch36 OregonR*») и мух с хромосомной перестройкой (третья строка «*ch36 #4842*»). Первая строка «reference» представляет собой референсную последовательность гена, взятую из открытого репозитория FlyBase.

Также, кроме генов *sr36* и *sr38* в регионе X-хромосомы 7F находятся три белок-кодирующие последовательности (*sr7Fa*, *sr7Fb* и *sr7Fc*), которые

кодируют слабо охарактеризованные минорные белки хориона [Fakhouri et. al, 2006]. Мы предположили, что хромосомная перестройка могла привести к утрате участка, кодирующего один или все эти минорные белки, которые, в свою очередь, могут способствовать секреции s36. Для проверки этой гипотезы у мух дикого типа и у мутантных мух была выделена геномная ДНК, с которой на специфичных праймерах были поставлены три ПЦР-реакции для каждого из исследуемых из генов (*cp7Fa*, *cp7Fb* и *cp7Fc*). Однако и у мутантов, и у дикого типа все три последовательности присутствуют и их размер соответствует ожидаемому (рис. 15).

Таким образом, фактор, влияющий на секрецию и агрегацию белка s36 пока не охарактеризован.

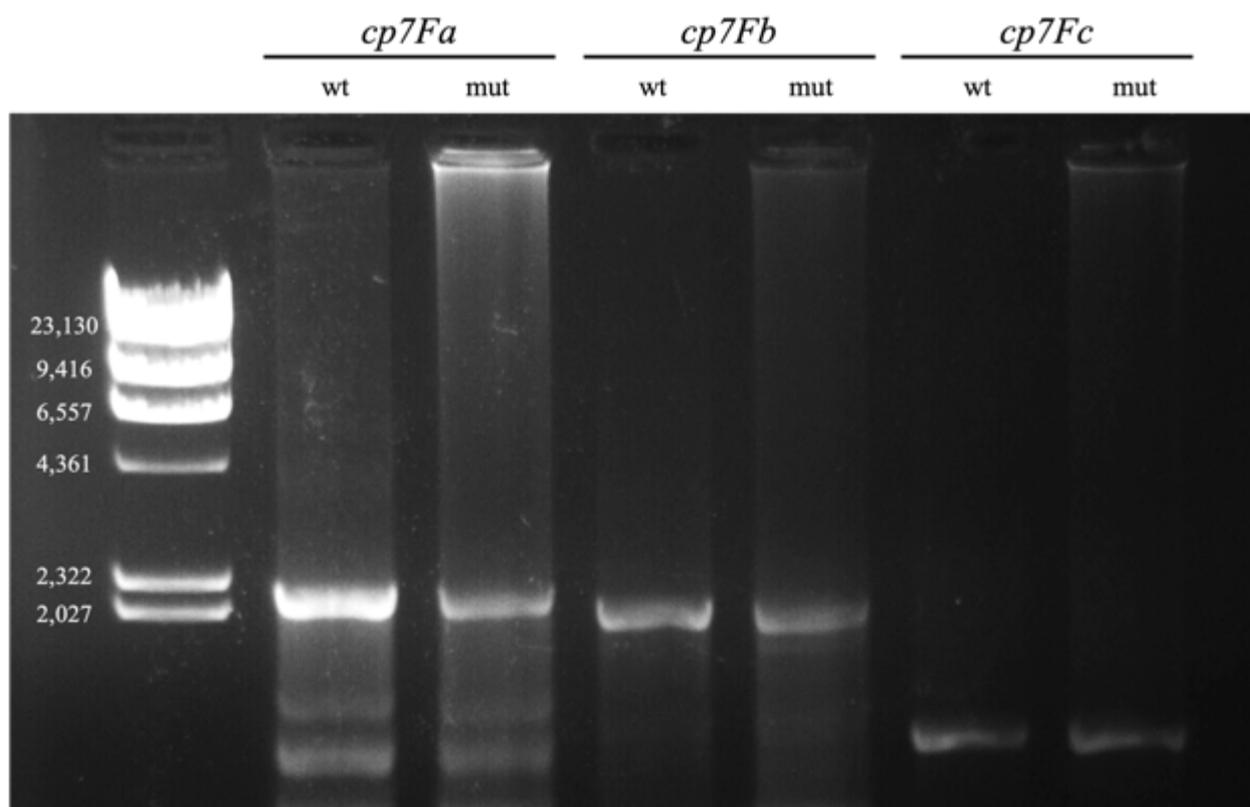


Рисунок 15. Результаты ПЦР последовательностей *cp7Fa*, *cp7Fb* и *cp7Fc* у мух дикого типа (линия OregonR) и мух с хромосомной перестройкой (линия #4842). У обеих линий все три последовательности присутствуют и имеют ожидавшийся размер.

На следующем этапе работы мы оценили возможную колокализацию s36 с тиофлавином S в оболочках яиц мух «дикого типа». Проведённый анализ показал, что антитела к белку s36 окрашивают микропиле, пилларс и плавательные усики и чётко колокализуются с амилоидспецифичным красителем тиофлавин S (рис. 16).

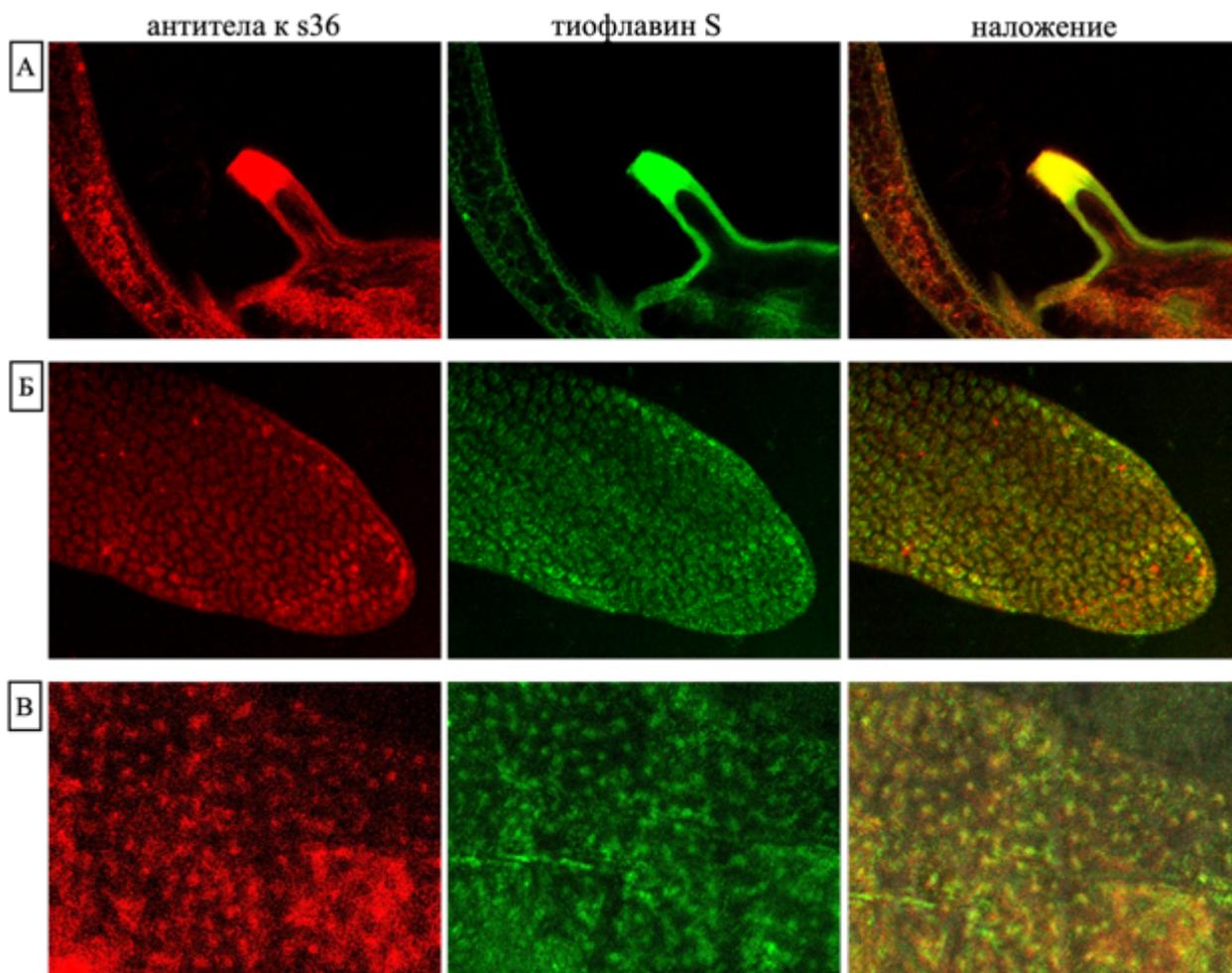


Рисунок 16. Антитела к белку s36, конъюгированные со вторичными антителами Alexa Fluor® 647, Goat anti-Rabbit IgG (Thermo Fisher Scientific, США), колокализуются с амилоид-специфичным красителем тиофлавином S. Антитела и тиофлавин S связывают специализированные структуры оболочки яиц *Drosophila melanogaster*, а именно: А – микропиле, Б – дорзальные выросты, В – пилларс.

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.

3.2.5. Анализ амилоидных свойств белка s36 *in vitro*

Рекомбинантный белок s36 был продуцирован и очищен как описано в разделе «Материалы и методы». Очищенный белок инкубировался в течение 4-х суток в PBS при комнатной температуре. После инкубации белок осаждали центрифугированием, окрашивали кумасси и анализировали в полиакриламидном геле. Значительная часть белка даже не входила в гель, оставаясь в лунках, после инкубации белка в буфере с 1% SDS при 95°C в течение 15 минут (рис. 17А, Б). Также было показано, что после инкубации белок s36 формирует фибриллы, которые детектируются с помощью электронной микроскопии (рис. 17Д). Кроме того, белок связывает конго красный и демонстрирует двойное лучепреломление после такого окрашивания (рис. 17В, Г).

На основании полученных результатов можно заключить, что белок s36 формирует функциональные амилоидные фибриллы в специализированных структурах хориона дрозофилы и демонстрирует амилоидные свойства *in vitro*.

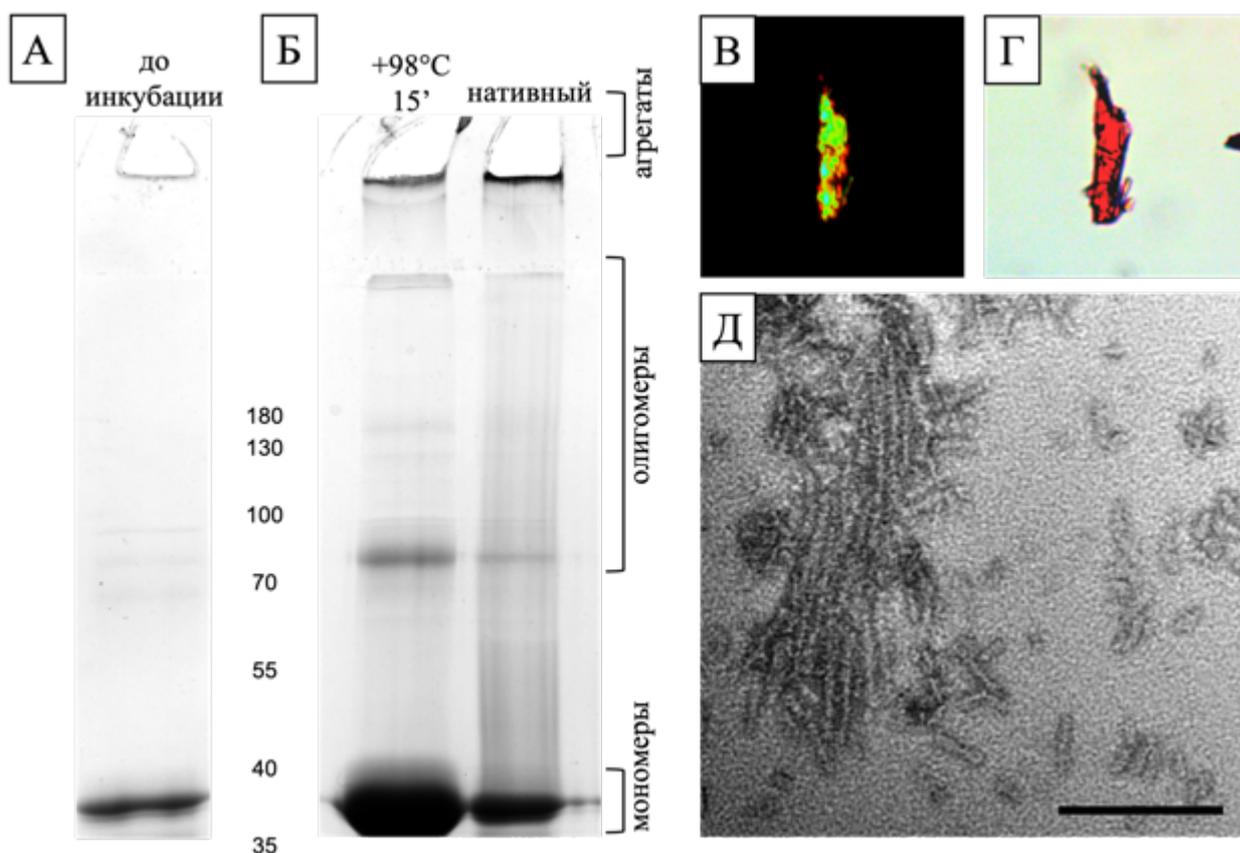


Рисунок 17. Рекombинантный белок s36 с 6xHis-тагом с N-конца. А - рекомбинантный белок s36 до инкубации, Б – после инкубации в течение 4х суток. В, Г – окрашивание агрегатов белка s36 амилоид-специфичным красителем конго красный, В – поляризованный свет, Г – светлое поле. Д – фибриллы белка, полученные при помощи электронного микроскопа (масштабная линейка – 200нм).

4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

4.1. Методология системного поиска и идентификации функциональных амилоидов

С момента появления первых статей о выявлении функциональных амилоидов [Iconomidou, 2000] начал изменяться взгляд на функции, которые белки могут выполнять в амилоидном состоянии, постепенно расширялся список функциональных амилоидов, обнаруженных на данный момент у представителей как прокариот, так и эукариот. Однако, несмотря на годы исследований, количество белков, которые бы можно было назвать действительно функциональными амилоидами, чрезвычайно мало. Белков, для которых были показаны лишь некоторые амилоидные свойства, а также не идентифицированных структур, которые окрашиваются амилоидспецифичными красителями значительно больше. Потенциал использования амилоидных фибрилл различными организмами огромен и то, что было обнаружено на сегодняшний день, скорее всего, является лишь вершиной айсберга.

За годы исследований, в первую очередь патологических амилоидов, был разработан определенный набор методик, позволяющих проверять белок на наличие определенных характеристик, типичных для амилоидов. На данный момент «золотым стандартом» является связывание амилоидными белками красителя конго красный, что, в свою очередь, вызывает двойную рефракцию в поляризованном свете [Divry, 1927; Vuxbaum and Linke, 2012]. Однако до сих пор данные по амилоидным белкам являются очень разрозненными, так как ранее известные функциональные амилоиды были обнаружены в результате исследований свойств отдельно взятых белков. В нашей лаборатории был разработан и успешно апробирован метод протеомного скрининга амилоидов [Ryzhova et al., 2018; Sopova et al., 2019; Sergeeva et al., 2021]. Данный метод основывается на универсальном свойстве амилоидов – устойчивости к ионным детергентам (таким как SDS) и позволяет

идентифицировать белки, которые можно рассматривать в качестве кандидатов на роль функциональных амилоидов. Сочетание метода протеомного скрининга, традиционного цитологического подхода и анализа структурных характеристик индивидуальных белков позволяет успешно идентифицировать белки, формирующие амилоидные фибриллы в различных органах и тканях у любых организмов [Ryzhova et al., 2018; Sopova et al., 2019]. В нашей работе проводился поиск амилоидных белков в ооцитах модельных объектов - домашних куриц и *Drosophila melanogaster*.

4.2. Поиск амилоидных структур в ооцитах домашних куриц

При проведении протеомных скринингов яичников *Gallus gallus domesticus* нами был идентифицирован ряд белков (табл. 3). Белком, идентифицированным с наибольшим счетом масс-спектрометрии, стал вителлогенин (Vtg2) – основной предшественник запасующих белков желтка. Он синтезируется в печени и образует гранулы, которые с током крови транспортируются в фолликулярные клетки яичников. Из фолликулярных клеток везикулы поступают в ооциты, по всей видимости по трансосомам [Nimpf and Schneider, 1991]. На ранних стадиях развития ооцита цитоплазма содержит большое количество вителлогенина, но затем под действием протеазы катепсина Д этот белок-предшественник расщепляется на четыре белка, которые представляют собой основной запасующий компонент яичного желтка [Elkin et al., 1995]. Гипотеза, согласно которой Vtg2 является функциональным амилоидом, показалась нам крайне привлекательной. В случае её подтверждения можно было бы говорить о том, что не только патологические амилоиды (такие как PrP^{Sc}), но и функциональные амилоиды транспортируются по организму.

Кроме вителлогенина в яичниках курицы методом протеомного скрининга амилоидов были идентифицированы четыре ядерных белка, ассоциированных с хроматином (PDS5, SMC5, PRPF3 и CHD7), и два белка теплового шока HS90A и HSP7C. Ранее при выявлении амилоидов в клетках

дрожжей *S. cerevisiae* мы показали, что некоторые шапероны образуют очень прочные комплексы с амилоидными фибриллами [Ryzhova et al., 2018]. Вместе с тем, 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 было рассматривать лишь в качестве вероятных кандидатов на роль функциональных амилоидов.

На рисунке 2 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. Сигнал локализации тиофлавина S в фолликулярных клетках и в цитоплазме ооцита располагается там же, где согласно литературным данным, локализуется вителлогенин [Schneider 2007; Li et al., 2014]. Тиофлавин-позитивные структуры, которые детектируются в ядрах ранних ооцитов, могут соответствовать хроматин-ассоциированным белкам (PDS5, SMC5, PRPF3 или CHD7), которые выявлены нами методом протеомного скрининга во фракции SDS-устойчивых агрегатов (Табл. 3).

Однако, последующие окрашивания яичников курицы конго красным не подтвердили результаты, полученные при помощи тиофлавина S (рис. 3). 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.

Способность белка Vtg2 к агрегации была проверена при помощи иммунохимического анализа. Мы показали, что Vtg2 присутствует в плазме крови и ооцитах как в мономерном, так и в агрегированном состоянии, в печени – только в агрегатах (рис. 4). Фрагмент белка также был выбран для анализа амилоидных свойств *in vitro* (рис. 5). Данный фрагмент действительно показал способность формировать амилоидные фибриллы (рис. 6,7). Вместе с тем данные, полученные *in vitro*, не позволяют сделать вывод, что Vtg2

формирует амилоидные агрегаты *in vivo* в организме курицы. По всей вероятности, присутствие амилоидных структур в оболочке ооцитов не является универсальной характеристикой позвоночных, так как в оболочке ооцитов куриц и в самих ооцитах амилоидные фибриллы в нашей работе не выявлены.

Так как в протеомных скринингах были идентифицированы ядерные белки, а при окрашивании тиофлавином были выявлены хроматин-ассоциированные структуры, нами было принято решение окрасить непосредственно препараты хромосом типа ламповых щеток, формирующихся в ооцитах именно на ранних стадиях развития.

При окрашивании тиофлавином S наиболее ярко окрашивались петли GITERA (рис. 8A). На данный момент белковый состав этих специфических агрегатов РНП изучен слабо. Известно только, что GITERA обогащены факторами сплайсинга SC35 и snRNPs [Krasikova et al., 2012; Kulikova et al., 2015]. Полученные данные позволили предположить, что идентифицированные структуры имеют амилоидную природу. Однако, как уже было упомянуто ранее, на данный момент золотым стандартом для идентификации амилоидов является окрашивание конго красным. Данный краситель, а также амилоид-специфические антитела ОС не окрашивали GITERA (рис. 9). 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. Отсутствие связывания конформационно-зависимых антиамилоидных антител с петлями GITERA подтверждает этот вывод. Важно отметить, что при дальнейших исследованиях тиофлавин S не должен использоваться как основной инструмент для обнаружения амилоидов, а только лишь как вспомогательный. Способность тиофлавина S связывать структуры, которые не окрашиваются конго красным и амилоидспецифичными антителами показана нами впервые.

4.3. Поиск амилоидных структур в яйцах плодовой мушки

Анализ яичников *Drosophila melanogaster* был начат с окрашиваний амилоид-специфичными антителами и проведения протеомных скринингов (рис. 10; табл. 4). В оболочке яиц дрозофилы были выявлены структуры, которые окрашивались как амилоидспецифичными красителями (тиофлавин S и конго красный), так и конформационно-зависимыми антителами ОС, распознающими амилоидные фибриллы. Таким образом, в данном случае можно сделать однозначный вывод о наличии в оболочке яиц (хорионе) функциональных амилоидов. С помощью протеомного скрининга белков, формирующих SDS-устойчивые агрегаты, мы выявили шесть мажорных белков хориона. Именно они стали основной мишенью дальнейших исследований. Необходимо учитывать, что присутствие во фракции детергент-устойчивых агрегатов может быть связано не только со способностью белка формировать фибриллы, но и с тем, что полисахаридный компонент хориона прочно связывает белки и плохо растворяется.

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 оболочках яиц самок линии #4842, гомозиготных по неохарактеризованной хромосомной перестройке в районе 7F X хромосомы. Эта хромосомная перестройка в гомозиготе приводит к стерильности, у мух с данной мутацией нарушено формирование хориона на финальных стадиях развития яиц, не формируются пилларс, микропиле, дорсальные дыхательные выросты, оболочка яйца намного более тонкая (в ней полностью разрушен эндохорион), кроме того, данные мухи стерильны [Cernilogar et al., 2001]. Анализ окрашивания амилоидспецифичными красителями яиц дрозофил линии Oregon R (дикий тип) и линии #4842 показал, что оболочка яиц мутантных мух, в отличие от мух дикого типа, не связывает конго красный, а также тиофлавин S (рис 11). Таким образом, белок,

формирующий амилоидные структуры в хорионе яиц дрозофилы, кодируется геном, расположенном в районе 7F X хромосомы. В данном регионе имеется девять рамок считывания, из них две кодируют s36 и s38, а еще три – минорные белки хориона Cr7Fa, Cr7Fb и Cr7Fc, функциональная роль которых практически не охарактеризована [Fakhouri et. al, 2009].

Известно, что при нарушении продукции мажорных белков s36 и s38 не формируются специализированные структуры хориона [Velentzas et al., 2016; Velentzas et al., 2018], которые, как мы показали, окрашиваются амилоидспецифичными красителями в яйцах мух «дикого типа» (рис. 10).

При сравнительном анализе агрегации белков s36 и s38 у мутантов и у мух дикого типа было показано, что оба белка продуцируются как у мух дикого типа, так и мух с хромосомной перестройкой. Однако, только для s36 показана разница: на фоне хромосомной перестройки в районе 7F белок s36 не агрегирует (рис.12). Более того, оболочка яиц особей, гомозиготных по этой хромосомной перестройке, не окрашивается антителами к белку s36 (рис. 13). Эти данные однозначно говорят о том, что хромосомная перестройка блокирует возможность секреции s36 в оболочку яиц и его агрегацию. Иммуногистохимическое окрашивание яиц особей линии Oregon R показало, что белок s36 чётко колокализуется с амилоидспецифичным красителем (рис. 16). Эти данные позволяют обосновано заключить, что именно белок s36 формирует амилоидные агрегаты в хорионе дрозофилы.

Фактор, обеспечивающий секрецию белка s36 из питающих и фолликулярных клеток в хорион остаётся неизвестен. Очевидно, что хромосомная перестройка в районе 7F либо приводит к нарушению структуры самого белка s36 (например, аминокислотной последовательности самого белка или его секреторного пептида), либо к нарушению работы других белков, гены которых локализованы в этом участке X хромосомы. Как уже упоминалось, анализ генома *Drosophila melanogaster* показывает наличие девяти рамок считывания в районе 7F. Помимо генов, кодирующих s36 и s38, в этой области есть ещё три гена, кодирующих минорные белки хориона

(*cp7Fa*, *cp7Fb* и *cp7Fc*). Мы установили, что последовательность гена, кодирующего белок s36, не отличается у мух дикого типа и у мух линии #4842 (рис. 14). Более того, ПЦР анализ показал, что с геномной ДНК мутантов и мух дикого типа амплифицируются одинаковые продукты, соответствующие по размеру генам *cp7Fa*, *cp7Fb* и *cp7Fc* (рис 15). Выявление фактора, препятствующего секреции белка s36 во внешнюю оболочку яйца является предметом дальнейших исследований.

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. 17). 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.

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. Как было упомянуто в обзоре литературы, 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.

У ряда насекомых в хорионе, а также в коконах выявляются фибриллярные β -складчатые структуры неамилоидной природы [Mello et al., 2018]. Мономеры, формирующие такие β -слои, располагаются не перпендикулярно (как в случае амилоидов), а параллельно основной оси фибриллы. Эти неамилоидные β -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 β -складчатые фибриллярных структур является эволюционной закономерностью. Это один из ярких примеров эволюционного параллелизма при формировании жизненно важных структур.

4.4. 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 ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. // М.: Мир, 1984. – 480 с.
2. Ahmed A.B., Kajava A.V. Breaking the amyloidogenicity code: methods to predict amyloids from amino acid sequence. // FEBS Lett. – 2013. – Vol. 587. – №8. – P. 1089–1095.
3. Alteri C.J., Xicohtencatl-Cortes J., Hess S., Caballero-Olin G., Giron J.A., Friedman R.L. Mycobacterium tuberculosis produces pili during human infection. // Proc Natl Acad Sci. – 2007. – Vol. 104. – P. 5145–5150.
4. Amo A., Rodríguez-Pérez R., Blanco J., Villota J., Juste S., Moneo I., Caballero M.L. Gal d 6 is the second allergen characterized from egg yolk. // J. Agric. Food Chem. – 2010. – Vol. 58, №12. – P. 7453–7.
5. Antonets K.S., Belousov M.V., Sulatskaya A.I., Belousova M.E., Kosolapova A.O., Sulatsky M.I., Andreeva E.A., Zykin P.A., Malovichko Y.V., Shtark O.Y., Lykholay A.N., Volkov K.V., Kuznetsova I.M., Turoverov K.K., Kochetkova E.Y., Bobylev A.G., Usachev K.S., Demidov O.N., Tikhonovich I.A., Nizhnikov A.A. Accumulation of storage proteins in plant seeds is mediated by amyloid formation. // PLOS Biology. – 2020. – Vol. 18, №7:e3000564
6. Aramaki M., Kimura T., Udaka T., Kosaki R., Mitsuhashi T., Okada Y., Takahashi T., Kosaki K. Embryonic expression profile of chicken CHD7, the ortholog of the causative gene for CHARGE syndrome. // Birth Defects Res A Clin Mol Teratol. – 2007. – Vol. 79, №1. – P. 50–57.
7. Arranz R., Mercado G., Martín-Benito J., Giraldo R., Monasterio O., Lagos R., Valpuesta J.M. Structural characterization of microcin E492 amyloid formation: Identification of the precursors. // J. Struct. Biol. – 2012. Vol. 178, №1. – P. 54–60.
8. Bastock R., Johnston D.S. Drosophila oogenesis. // Curr Biol. – 2008. Vol. 18, №23:R1082-7.

9. Bavdek A., Kostanjšek R., Antonini V., Lakey J.H., Dalla Serra M., Gilbert R.J.C., et. al. pH dependence of listeriolysin O aggregation and pore-forming ability. // *FEBS J.* – 2012. – Vol.279, №1 – P. 126–141.
10. Bednarska N.G., Schymkowitz J., Rousseau F., Van Eldere J. Protein aggregation in bacteria: the thin boundary between functionality and toxicity. // *Microbiology.* – 2013. – Vol. 159, №9. – P. 1795–1806.
11. Benson M.D., Buxbaum J.N., Eisenberg D.S., Merlini G., Saraiva M.J.M., Sekijima Y., Sipe J.D. and Westermark P. Amyloid nomenclature 2020: update and recommendations by the International Society of Amyloidosis (ISA) nomenclature committee. // *Amyloid.* – 2020. – Vol. 27, №4. – P. 217–222.
12. Berg C.A. Tube formation in *Drosophila* egg chambers. // *Tissue Eng Part A.* – 2008. – Vol. 14, №9. – P. 1479–1488.
13. Berruti G.; Paiardi C. Acrosome biogenesis: Revisiting old questions to yield new insights. // *Spermatogenesis.* – 2011. – Vol. 1. – P. 95–98.
14. Biéler S., Estrada L., Lagos R., Baeza M., Castilla J., Soto C. (2005). Amyloid formation modulates the biological activity of a bacterial protein. // *J. Biol. Chem.* – 2005. – Vol. 280, № 29. – P. 26880–26885.
15. Blanco L.P., Evans M.L., Smith D.R., Badtke M.P. and Chapman M.R. Diversity, biogenesis and function of microbial amyloids. // *Trends Microbiol.* – 2012. – Vol. 20, №2. – P. 66–73.
16. Boke E., Ruer M., Wühr M., Coughlin M., Lemaitre R., Gygi S.P., Alberti S., Drechsel D., Hyman A.A., Mitchison T.J. Amyloid-like Self-assembly of a Cellular Compartment. // *Cell.* – 2016. – Vol. 166, №3. – P. 637–650
17. Bontems F., Stein A., Marlow F., Lyautey J., Gupta T., Mullins M.C., Dosch R. Bucky Ball Organizes Germ Plasm Assembly in Zebrafish. // *Current Biology.* – 2009. – Vol. 19, №5. – P. 414–422.
18. Brown D.R. Neurodegeneration and oxidative stress: prion disease results from loss of antioxidant defence. // *Folia Neuropathol.* – 2005. – Vol. 43, №4. – P. 229–243.

19. Buxbaum J.N., Linke R.P. A molecular history of the amyloidoses. // *J. Mol. Biol.* – 2012. – Vol. 421. – P. 142–159.
20. Campioni S., Mannini B., Zampagni M., Pensalfini A., Parrini C., Evangelisti E., Relini A., Stefani M., Dobson C.M., Cecchi C., et al. A causative link between the structure of aberrant protein oligomers and their toxicity. // *Nat. Chem. Biol.* – 2010. – Vol. 6. – P. 140–147.
21. Cavaliere V., Bernardi F., Romani P., et al. Building up the *Drosophila* eggshell: first of all the eggshell genes must be transcribed. // *Dev Dyn.* – 2008. – Vol. 237, №8. – P. 2061–2072.
22. Cernilogar F.M., Fabbri F., Andrenacci D., Taddei C., Gargiulo G. *Drosophila* vitelline membrane cross-linking requires the *fs(1)Nasrat*, *fs(1)polehole* and chorion genes activities. // *Dev Genes Evol.* – 2001. – Vol. 211. – P. 573–580.
23. Chakrabortee S. et al. Luminidependens (LD) is an Arabidopsis protein with prion behavior. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 2016. – Vol. 113. – P. 6065–6070.
24. Chapman M.R. Role of *Escherichia coli* Curli Operons in Directing Amyloid Fiber Formation // *Science.* – 2002. – Vol. 295, №5556. – P. 851–855.
25. Chimileski S., Franklin M.J. and Papke R.T. Biofilms formed by the archaeon *Haloferax volcanii* exhibit cellular differentiation and social motility, and facilitate horizontal gene transfer. // *BMC Biology.* – 2014. – 12:65.
26. Chiti F., Dobson C.M. Protein misfolding, amyloid formation, and human disease: A summary of progress over the last decade. // *Annu. Rev. Biochem.* – 2017. – Vol. 86. – P. 27–68.
27. Claessen D., Rink R., de Jong W., Siebring J., de Vreugd P., Boersma F.G.H., Dijkhuizen L., Wosten H.A.B. A novel class of secreted hydrophobic proteins is involved in aerial hyphae formation in *Streptomyces coelicolor* by forming amyloid-like fibrils. // *Genes Dev* – 2003. – Vol. 17. – P. 1714–1726.
28. Cook D. et al. FXR1P limits long-term memory, long-lasting synaptic potentiation, and de novo GluA2 translation. // *Cell Rep.* – 2014. – Vol. 9. – P. 1402–1416.

29. Coustou V., Deleu C., Saupe S., Begueret J. The protein product of the het-s heterokaryon incompatibility gene of the fungus *Podospora anserina* behaves as a prion analog. // Proc Natl Acad Sci U.S.A. – 1997. – Vol. 94, №18. – P. 9773–9778.
30. de la Rosa E.J., Vega-Núñez E., Morales A.V., Serna J., Rubio E., de Pablo F. Modulation of the chaperone heat shock cognate 70 by embryonic (pro)insulin correlates with prevention of apoptosis. // Developmental Biology. – 1998. – Vol. 85, №17. – P. 9950–5.
31. Del’Guidice T. et al. FXR1P is a GSK3 β substrate regulating mood and emotion processing. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA – 2015. – Vol. 112, – E4610–9.
32. Dispenzieri A., Gertz M.A., Buadi F. What do I need to know about immunoglobulin light chain (AL) amyloidosis? // Blood Rev. – 2012. – V. 26, №4. – P. 137–54.
33. Divry P., Florkin M. Sur les propriétés optiques de l’amyloïde // Compt. rend. Soc. Biol. – 1927. – Vol. 97. – P. 1808–1810.
34. Dueholm M.S., Albertsen M., Otzen D., Nielsen P.H. Curli Functional Amyloid Systems Are Phylogenetically Widespread and Display Large Diversity in Operon and Protein Structure // PLoS One. – 2012. – Vol. 7, №12. – e51274.
35. Easterhoff D., Ontiveros F., Brooks L.R., Kim Y., Ross B., Silva J.N., Olsen J.S., Feng C., Hardy D.J., Dunman P.M., et al. Semen-derived enhancer of viral infection (SEVI) binds bacteria, enhances bacterial phagocytosis by macrophages, and can protect against vaginal infection by a sexually transmitted bacterial pathogen. // Antimicrob. – 2013. – V. 57. – P. 2443–2450.
36. Egge N., Muthusubramanian A., Cornwall G.A. Amyloid Properties of the Mouse Egg Zona Pellucida. // PLOS ONE. – 2015. – Vol. 10, №6. – P. 1–19.
37. Elam J.S., Taylor A.B., Strange R., Antonyuk S., Doucette P.A et al. Amyloid-like filaments and water-filled nanotubes formed by SOD1 mutant

- proteins linked to familial ALS. // *Nat Struct Biol.* – 2003. – Vol. 10, № 6. – P. 461–467.
38. Elkin R.G., Freed M.B., Danetz S.A., Bidwell C.A. Proteolysis of Japanese quail and chicken plasma apolipoprotein B and vitellogenin by cathepsin D: similarity of the resulting protein fragments with egg yolk polypeptides. // *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* – 1995. – Vol. 112, №2. – P. 191–6.
39. Emanuele M., Chierigatti E. Mechanisms of alpha-synuclein action on neurotransmission: cell-autonomous and non-cell autonomous role. // *Biomolecules.* – 2015. – Vol. 5, №2. – P. 865–892.
40. Epifano O., Liang L.F., Familiarì M., Moos M.C.Jr, Dean J. Coordinate expression of the three zona pellucida genes during mouse oogenesis. // *Development.* – 1995. – Vol. 121, №7. – P. 1947–1956.
41. Fakhouri M., Elalayli M., Sherling D., Hall J.D., Miller E., Sun X., Wells L., LeMosy E.K. Minor proteins and enzymes of the *Drosophila* eggshell matrix. // *Dev Biol* – 2006. – Vol. 293. – P. 127–141.
42. Fitzpatrick A.W., Debelouchina G.T., Bayro M.J., Clare D.K., Caporini M.A., Bajaj V.S., Jaroniec C.P., Wang L., Ladizhansky V., Müller S.A., MacPhee C.E., Waudby C.A., Mott H.R., De Simone A., Knowles T.P., Saibil H.R., Vendruscolo M., Orlova E.V., Griffin R.G., and Dobson C.M. Atomic structure and hierarchical assembly of a cross- β amyloid fibril. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2013. – Vol. 110, №14. – P. 5468–5473.
43. Fowler D.M., Koulov A.V., Alory-Jost C., Marks M.S., Balch W.E., Kelly J.W. Functional amyloid formation within mammalian tissue. // *PLoS Biol.* – 2006. – Vol. 4, № 1. – e6.
44. Gajdusek D.C., Zigas V. Degenerative disease of the central nervous system in New Guinea; the endemic occurrence of kuru in the native population. // *N. Engl. J. Med.* – 1957. – Vol. 257, №20. – P. 974–978.
45. Galkin A.P. Prions and the concept of polyprionic inheritance. // *Curr Genet* – 2017 – Vol. 63. – P. 799– 802.

46. Gerven N. Van, Klein R.D., Hultgren S.J., Remaut H. Bacterial amyloid formation: structural insights into curli biogenesis. // *Trends Microbiol.* – 2015. – Vol. 23, №11. – P. 693–706.
47. Gibbs C.J.Jr, Gajdusek D.C., Asher D.M., Alpers M.P., Beck E. et al. Creutzfeldt–Jakob disease (spongiform encephalopathy): transmission to the chimpanzee. // *Science.* – 1968. – Vol. 161. – P. 388–389.
48. Griffin-Shea R., Thireos G., Kafatos F.C. Organization of a cluster of four chorion genes in *Drosophila* and its relationship to developmental expression and amplification. // *Dev Biol* – 1982. – Vol. 91. – P. 325–336.
49. Guyonnet B., Egge N., Cornwall G.A. Functional amyloids in the mouse sperm acrosome. // *Mol Cell Biol.* – 2014. – Vol. 34, № 14. – P. 2624–2634.
50. Hamodrakas S.J., Batrinou A., Christophoratos T. Structural and functional features of *Drosophila* chorion proteins s36 and s38 from analysis of primary structure and infrared spectroscopy. // *Int J Biol Macromol.* – 1989. – Vol. 11, № 5. – P. 307–313.
51. Han G.A., Malintan N.T., Collins B.M., Meunier F.A., Sugita S. Munc18-1 as a key regulator of neurosecretion. // *J. Neurochem.* – 2010. – Vol. 115. – P. 1–10.
52. Hardy D.M., Oda M.N., Friend D.S., Huang T.T. A mechanism for differential release of acrosomal enzymes during the acrosome reaction. // *Biochem. J.* – 1991. – Vol. 285. – P. 759–766.
53. Hervas R., Rau M.J., Park Y., et al. Cryo-EM structure of a neuronal functional amyloid implicated in memory persistence in *Drosophila*. // *Science.* – 2020. – Vol. 367, № 6483. – P. 1230–1234.
54. Hewetson A., Do H.Q., Myers C., Muthusubramanian A., Sutton R.B., Wylie B.J., Cornwall G.A. Functional amyloids in reproduction. // *Biomolecules* – 2017. – Vol. 7, № 46.
55. Howie A.J., Brewer D.B., Howell D., and Jones, A.P. Physical basis of colors seen in Congo red-stained amyloid in polarized light. // *Laboratory Investigation* – 2008. – Vol. 88, № 3. – P. 232–242.

56. Hughes G.C. The population of germ cells in the developing female chick. // *J Embryol Exp Morphol.* – 1963. – Vol. 11. – P. 513–536.
57. Iconomidou V.A., Cordopatis P., Hoenger A., Hamodrakas S.J. The silkworm eggshell as a natural amyloid shield for the safe development of insect oocyte and embryo: insights from studies of silkworm chorion protein peptide-analogues of the B family. // *Biopolymers* – 2011. – Vol. 96, №6. – P. 723–733.
58. Iconomidou V.A., Hamodrakas S.J. Natural protective amyloids. // *Curr Protein Pept Sci.* – 2008. – Vol. 9, №3. – P. 291–309.
59. Iconomidou V.A., Vriend G., Hamodrakas S.J. Amyloids protect the silkworm oocyte and embryo. // *FEBS Lett.* – 2000. – Vol. 479, №3. – P. 141–145.
60. Imran M., Mahmood S. An overview of human prion diseases. // *Virology* – 2011. – Vol. 8:559.
61. Inoue H., Nojima H., Okayama H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids // *Gene.* – 1990. – Vol. 96, №1. – P. 23–28.
62. Iqbal K., Liu F., Gong C.X., Alonso Adel C., Grundke-Iqbal I. Mechanisms of tau-induced neurodegeneration. // *Acta Neuropathol.* – 2009. – Vol. 118, №1. – P. 53–69.
63. Johnson A.L. Ovarian follicle selection and granulosa cell differentiation. // *Poult Sci.* – 2015. – Vol. 94, №4. – P. 781–785.
64. Jovine L., Darie C.C., Litscher E.S., Wassarman P.M. Zona pellucida domain proteins. // *Annu Rev Biochem* – 2005. – Vol. 74. – P. 83–114.
65. Kaye R., Head E., Sarsoza F. et al. Fibril specific, conformation dependent antibodies recognize a generic epitope common to amyloid fibrils and fibrillar oligomers that is absent in prefibrillar oligomers. // *Mol Neurodegener.* – 2007. – Vol. 2:18.
66. Kfoury N., Holmes B.B., Jiang H., Holtzman D.M., Diamond M.I. Transcellular propagation of tau aggregation by fibrillar species. // *J Biol Chem.* – 2012. – Vol. 287. – P. 19440–19451.

67. Kim K.-S., Gerton G.L. Differential release of soluble and matrix components: Evidence for intermediate states of secretion during spontaneous acrosomal exocytosis in mouse sperm. // *Dev. Biol.* – 2003. – Vol. 264. – P. 141–152.
68. King R.C. Ovarian development in *Drosophila melanogaster*. // New York: Academic Press. – 1970. – 227 p.
69. Knowles T.P.J., Vendruscolo M., Dobson C.M. The amyloid state and its association with protein misfolding diseases. // *Nat Rev Mol Cell Biol.* – 2014. – Vol. 15, №6. – P. 384–396.
70. Krasikova A., Khodyuchenko T., Maslova A., Vasilevskaya E. Three-dimensional organisation of RNA-processing machinery in avian growing oocyte nucleus. // *Chromosome Research* – 2012. – Vol. 20, №8. – P. 979–994.
71. Kulikova, T., Chervyakova, D., Zlotina, A., Krasikova, A., Gaginskaya, E. Giant poly(A)-rich RNP aggregates form at terminal regions of avian lampbrush chromosomes. // *Chromosoma* – 2016. – Vol. 125, №4. – P. 709–724.
72. Ladiwala A.R.A., Lin J.C., Bale S.S., Marcelino-Cruz A.M., Bhattacharya M., Dordick J.S., Tessier P.M. Resveratrol selectively remodels soluble oligomers and fibrils of amyloid A into off-pathway conformers. // *J. Biol. Chem.* – 2010. – Vol. 285. – P. 24228–24237.
73. Larsen P., Nielsen J.L., Dueholm M.S., Wetzel R., Otzen D.E., Nielsen P.H. Amyloid adhesins are abundant in natural biofilms. // *Environ Microbiol* – 2007. – Vol. 9. – P. 3077–3090.
74. Lasagna-Reeves C.A., Castillo-Carranza D.L., Sengupta U., Guerrero-Munoz M.J., Kiritoshi T. et al. Alzheimer brain-derived tau oligomers propagate pathology from endogenous tau. // *SciRep.* – 2012. – Vol. 2. – e700.
75. Lee C.Y., Cantle J.P., Yang X.W. Genetic manipulations of mutant huntingtin in mice: new insights into Huntington's disease pathogenesis. // *FEBS J.* – 2013. – Vol. 280, № 18. – P. 4382–4394.

76. Li C., Born A.K., Schweizer T., Zenobi-Wong M., Cerruti M., Mezzenga R. Amyloid-hydroxyapatite bone biomimetic composites. // *Adv. Mater.* – 2014. – Vol. 26. – P. 3207–3212.
77. Losada A., Yokochi T., Hirano T. Functional contribution of Pds5 to cohesin-mediated cohesion in human cells and *Xenopus* egg extracts. // *J. Cell Sci.* – 2005. – Vol. 118, №10. – P. 2133–41.
78. Louros N.N., Baltoumas F.A., Hamodrakas S.J., Iconomidou V.A. A β -solenoid model of the Pmel17 repeat domain: insights to the formation of functional amyloid fibrils. // *J Comput Aided Mol Des.* – 2016. – Vol. 30, №2. – P. 153–164.
79. Louros N.N., Chrysina E.D., Baltatzis G.E., Patsouris E.S., Hamodrakas S.J., Iconomidou V.A. A common ‘aggregation-prone’ interface possibly participates in the self-assembly of human zona pellucida proteins. // *FEBS Letters.* – 2015. – Vol. 590. – P. 619–630.
80. Louros N.N., Iconomidou V.A., Giannelou P., Hamodrakas S.J. Structural Analysis of Peptide-Analogues of Human Zona Pellucida ZP1 Protein with Amyloidogenic Properties: Insights into Mammalian Zona Pellucida Formation. // *PLOS ONE.* – 2013. – Vol. 8, №9. – P. 1–10.
81. Luk K.C., Kehm V., Carroll J., et al. Pathological α -synuclein transmission initiates Parkinson-like neurodegeneration in nontransgenic mice. // *Science.* – 2012. – Vol. 338, № 6109. – P. 949–953.
82. Maji S.K., Perrin M.H., Sawaya M.R., Jessberger S., Vadodaria K. et al. Functional amyloids as natural storage of peptide hormones in pituitary secretory granules. // *Science.* – 2009. – Vol. 325, №5938. – P. 328–332.
83. Majumdar A., Cesario W.C., White-Grindley E., Jiang H., Ren F. et al. Critical role of amyloid-like oligomers of *Drosophila* Orb2 in the persistence of memory. // *Cell.* – 2012. – V. 148, №3. – P. 515–529.
84. Makarava N., Kovacs G.G., Bocharova O., Savtchenko R., Alexeeva I. et al. Recombinant prion protein induces a new transmissible prion disease in wild-type animals // *Acta Neuropathol.* – 2010. – Vol. 119. – P. 177–187.

85. Marcoleta A., Marin M., Mercado G., Valpuesta J.M., Monasterio O., Lagos R. Microcin E492 Amyloid Formation Is Retarded by Posttranslational Modification // *J. Bacteriol.* – 2013. – Vol. 195, №17. – P. 3995–4004.
86. Margaritis L.H. The eggshell of *Drosophila melanogaster*. II. New staging characteristics and fine structural analysis of choriogenesis. // *Can. J. Zool.* – 1986. – Vol. 64. – P. 2152–2175.
87. Marlow F.L. and Mullins M.C. Bucky ball functions in Balbiani body assembly and animal vegetal polarity in the oocyte and follicle cell layer in zebrafish. // *Dev Biol.* – 2008. – Vol. 321, №1. – P. 40–50.
88. Masuda–Suzukake M., Nonaka T., Hosokawa M., Oikawa T., Arai T. et al. Prion–like spreading of pathological α –synuclein in brain. // *Brain.* – 2013. – Vol. 136. – P. 1128–1138.
89. McLaughlin J.M., Bratu D.P. *Drosophila melanogaster* Oogenesis: An Overview. // *Methods Mol Biol.* – 2015. – Vol. 1328. – P. 1–20.
90. Medina M., Avila J. The role of extracellular Tau in the spreading of neurofibrillary pathology. // *Front Cell Neurosci.* – 2014. – Vol. 8. – e113.
91. Meeto D., McGovern P., Safadi R. An epidemiological overview of diabetes across the world. // *Br. J. Nurs.* – 2007. – Vol. 16, №16. – P. 1002–1007.
92. Mello M.L.S., Vidal B.C., Rozen J.G. Polarization Microscopy and Infrared Microspectroscopy of Integument Coverings of Diapausing Larvae in Two Distantly Related Nonsocial Bees. // *Microsc Microanal.* – 2018. – Vol. 24, №1. – P. 75–81.
93. Menkhorst E., Selwood L. Vertebrate extracellular preovulatory and postovulatory egg coats. // *Biol Reprod.* – 2008. – Vol. 79, №5. – P. 790–797.
94. Moreno M.J., Romero J. Sporadic Creutzfeldt–Jakob disease: phenotypic variability. // *Neurologia.* – 2002. – Vol. 17, №7. – P. 366–77.
95. Mostaert A.S., Higgins M.J., Fukuma T., Rindi F., Jarvis S.P. Nanoscale mechanical characterisation of amyloid fibrils discovered in a natural adhesive. // *J Biol Phys.* – 2006. – Vol. 32, № 5. – P. 393–401.

96. Münch J., Rücker E., Ständker L., et al. Semen-derived amyloid fibrils drastically enhance HIV infection. // *Cell* – 2007. – Vol. 131, №6. – P. 1059–1071.
97. Nakamura Y., Kagami H., Tagami T. Development, differentiation and manipulation of chicken germ cells. // *Develop Growth Differ.* – 2013. – Vol. 55, №1. – P. 20–40.
98. Nimpf J., Schneider W.J. Receptor-mediated lipoprotein transport in laying hens. // *J Nutr.* – 1991. – Vol. 121, №9. – P. 1471–1474.
99. Nizhnikov A. A., Antonets K.S., Inge-Vechtomov S.G. Amyloids: from pathogenesis to function // *Biochem.* – 2015. – V. 80, №9. – P. 1127–1144.
100. Nizhnikov A.A., Ryzhova T.A., Volkov K.V., Zadorsky S.P., Sopova J.V., Inge-Vechtomov S.G., Galkin A.P. Interaction of Prions Causes Heritable Traits in *Saccharomyces cerevisiae*. // *PLOS Genet.* – 2016. – Vol. 27, №12. – e1006504.
101. O’Nuallain B., Wetzel R. Conformational Abs recognizing a generic amyloid fibril epitope. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2002. – V. 99. – P. 1485–1490.
102. Oh J., Kim J.G., Jeon E., Yoo C.H., Moon J.S., Rhee S., Hwang I. Amyloidogenesis of type III-dependent harpins from plant pathogenic bacteria. // *J. Biol. Chem.* – 2007. – Vol. 282, №18. – P. 13601–13609.
103. Olanow C.W., McNaught K. Parkinson’s disease, proteins, and prions: Milestones // *Mov. Disord.* – 2011. – Vol. 26, №6. – P. 1056–1071.
104. Oliveberg M. Waltz, an exciting new move in amyloid prediction. // *Nat Methods.* – 2010. – Vol. 7, №3. – P. 187–188.
105. Parks S., Wakimoto B.T., Spradling A. Replication and expression of an X-linked cluster of *Drosophila* chorion genes. // *Dev Biol.* – 1986. – V. 117. – P. 294–305.
106. Perry M.M. Nuclear events from fertilisation to the early cleavage stages in the domestic fowl (*Gallus domesticus*). // *J Anat.* – 1987. – Vol. 150. – P. 99–109.

107. Podrabsky J.E., Carpenter J.F, Hand S.C. Survival of water stress in annual fish embryos: dehydration avoidance and egg envelope amyloid fibers. // *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* – 2001. – Vol. 280, №1:R123–31.
108. Prusiner S.B. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. // *Science.* – 1982. – Vol. 216, №4542. – P. 136–44.
109. Prusiner S.B., Groth D.F., Bolton D.C., Kent S.B., Hood L.E. Purification and structural studies of a major scrapie prion protein. // *Cell.* – 1984. – Vol. 38, №1. – P. 127–134.
110. Prusiner S.B., Scott M.R. Genetics of prions // *Annu Rev Genet.* – 1997. – Vol. 31. – P. 139–175.
111. Reitz C., Brayne C., Mayeux R. Epidemiology of Alzheimer disease // *Nat. Rev. Neurol.* – 2011. – Vol. 7, №3. – P. 137–152.
112. Romero D, Aguilar C, Losick R, Kolter R. Amyloid fibers provide structural integrity to *Bacillus subtilis* biofilms. // *Proc Natl Acad Sci.* – 2010. – V. 107. – P. 2230–2234.
113. 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. // *Current Genetics* – 2018. – Vol. 64, №2. – P. 469–478.
114. Saifitdinova A., Galkina S., Volodkina V. and Gaginskaya, E. Preparation of lampbrush chromosomes dissected from avian and reptilian growing oocytes. // *Bio Comm.* – 2017. – Vol. 62, №3. – P. 165–168.
115. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular cloning. A laboratory manual // New York: Cold Spring Harbor Lab. Press. – 1989. – 1626 p.
116. Schneider W.J. Low density lipoprotein receptor relatives in chicken ovarian follicle and oocyte development. // *Cytogenet Genome Res.* – 2007. – Vol. 117, №1–4. – P. 248–255.

117. Sengupta U., Nilson A.N., Kayed R. The role of amyloid- oligomers in toxicity, propagation, and immunotherapy. // *Biomedicine* – 2016. – Vol. 6. – P. 42–49.
118. Sergeeva A.V., Galkin A.P. Functional amyloids of eukaryotes: criteria, classification, and biological significance. // *Curr Genet.* – 2020. – Vol. 66, №5. – P. 849–866.
119. Sipe J.D., Benson M.D., Buxbaum J.N., Ikeda S., Merlini G., Saraiva M.J.M., Westermark P. Nomenclature 2014: Amyloid fibril proteins and clinical classification of the amyloidosis // *Amyloid.* – 2014. – V. 21, №4. – P. 221–224.
120. Sipe J.D., Benson M.D., Buxbaum J.N., Ikeda S.I., Merlini G., Saraiva M.J., Westermark P. Amyloid fibril proteins and amyloidosis: chemical identification and clinical classification International Society of Amyloidosis 2016 Nomenclature Guidelines. // *Amyloid.* – 2016. – Vol. 23, №4. – P. 209–213.
121. Sivanathan V., Hochschild A. A bacterial export system for generating extracellular amyloid aggregates. // *Nat Protoc* – 2013. – Vol. 8. – P. 1381–1390.
122. Song E.J., Werner S.L., Neubauer J., Stegmeier F., Aspden J., Rio D., Harper J.W., Elledge S.J., Kirschner M.W., Rape M. The Prp19 complex and the Usp4Sart3 deubiquitinating enzyme control reversible ubiquitination at the spliceosome. // *Genes Dev.* – 2010. – Vol. 24, №13. – P. 1434–1447.
123. 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.
124. Spradling A.C. Developmental genetics of oogenesis. // Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press. – 1993. – 70 p.

125. Spradling A.C. The organization and amplification of two chromosomal domains containing *Drosophila* chorion genes. // *Cell* – 1981. – Vol. 27. – P. 193–201.
126. Spradling A.C., Waring G.L., and Mahowald A.P. *Drosophila* bearing the *ocelliless* mutation underproduce two major chorion proteins both of which map near this gene. // *Cell* – 1979. – Vol. 16. – P. 609–616.
127. Stefani M. Biochemical and biophysical features of both oligomer/fibril and cell membrane in amyloid cytotoxicity. // *FEBS J.* – 2010. – Vol. 277. – P. 4602–4613.
128. Stephan A.K., Kliszczak M., Dodson H., Cooley C., Morrison C.G. Roles of vertebrate Smc5 in sister chromatid cohesion and homologous recombinational repair. // *Mol Cell Biol.* – 2011. – Vol. 31, №7. – P. 1369–1381.
129. Stifani S., Barber D.L., Nimpf J., Schneider W.J. A single chicken oocyte plasma membrane protein mediates uptake of very low density lipoprotein and vitellogenin. // *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* – 1990. – Vol. 87, №5. – P. 1955–1959.
130. Swevers L., Morou E., Balatsos N., Iatrou K., Georgoussi Z. Functional expression of mammalian opioid receptors in insect cells and high-throughput screening platforms for receptor ligand mimetics. // *Cell Mol Life Sci* – 2005. – Vol. 62, №7-8. – P. 919–930.
131. Tanghe S., Van Soom A., Nauwynck H., Coryn M., de Kruif A. Minireview: functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation, and fertilization. // *Mol Reprod Dev.* – 2002. – Vol. 61, №3. – P. 414–424.
132. Tycko R., Wickner R.B. Molecular structures of amyloid and prion fibrils: Consensus versus controversy. // *Accounts Chem. Res.* – 2013. – Vol. 463. – P. 1487–1496.
133. Velentzas A.D., Velentzas P.D., Katarachia S.A., Anagnostopoulos A.K., Sagioglou N.E., Thanou E.V., Tsioka M.M., Mpakou V.E., Kollia Z.,

- Gavriil V.E., Papassideri I.S., Tsangaris G.T., Cefalas A.C., Sarantopoulou E., Stravopodis D.J. The indispensable contribution of s38 protein to ovarian-eggshell morphogenesis in *Drosophila melanogaster*. // *Sci Rep* – 2018. – Vol. 8, №1:16103
134. Velentzas A.D., Velentzas P.D., Sagioglou N.E., Konstantakou E.G., Anagnostopoulos A.K., Tsioka M.M., Mpakou V.E., Kollia Z., Consoulas C., Margaritis L.H., Papassideri I.S., Tsangaris G.T., Sarantopoulou E., Cefalas A.C., Stravopodis D.J. Targeted Downregulation of s36 Protein Unearths its Cardinal Role in Chorion Biogenesis and Architecture during *Drosophila melanogaster* Oogenesis. // *Sci Rep*. – 2016. – Vol. 6:35511
135. Velizhanina M.E. and Galkin A.P. Amyloid Properties of the FXR1 Protein Are Conserved in Evolution of Vertebrates. // *Int J Mol Sci*. – 2022. – Vol. 23, №14:7997.
136. Wang E.T., Moyzis R.K. Genetic evidence for ongoing balanced selection at human DNA repair genes ERCC8, FANCC, and RAD51C. // *Mutat Res*. – 2007. – Vol. 616, № 1-2. – P. 165–174.
137. Waring G.L. Morphogenesis of the eggshell in *Drosophila*. // *Int Rev Cytol* – 2000. – Vol. 198. – P. 67–108.
138. Westermark G.T., Westermark P. Serum amyloid A and protein AA: molecular mechanisms of a transmissible amyloidosis. // *FEBS Lett*. – 2009. – Vol. 583, № 16. – P. 2685–2690.
139. Wickner R.B. [URE3] as an altered URE2 protein: evidence for a prion analog in *Saccharomyces cerevisiae*. // *Science*. – 1994. – V. 264, №5158. – P. 566–569.
140. Wickner R.B. Scrapie in ancient China? // *Science*. – 2005. – Vol. 309, №5736. – P. 874.
141. Wickner R.B., Edskes H.K., Maddelein M.L., Taylor K.L., Moriyama H. Prions of yeast and fungi. Proteins as genetic material. // *J Biol Chem*. – 1999. – Vol. 274, №2. – P. 555–558.

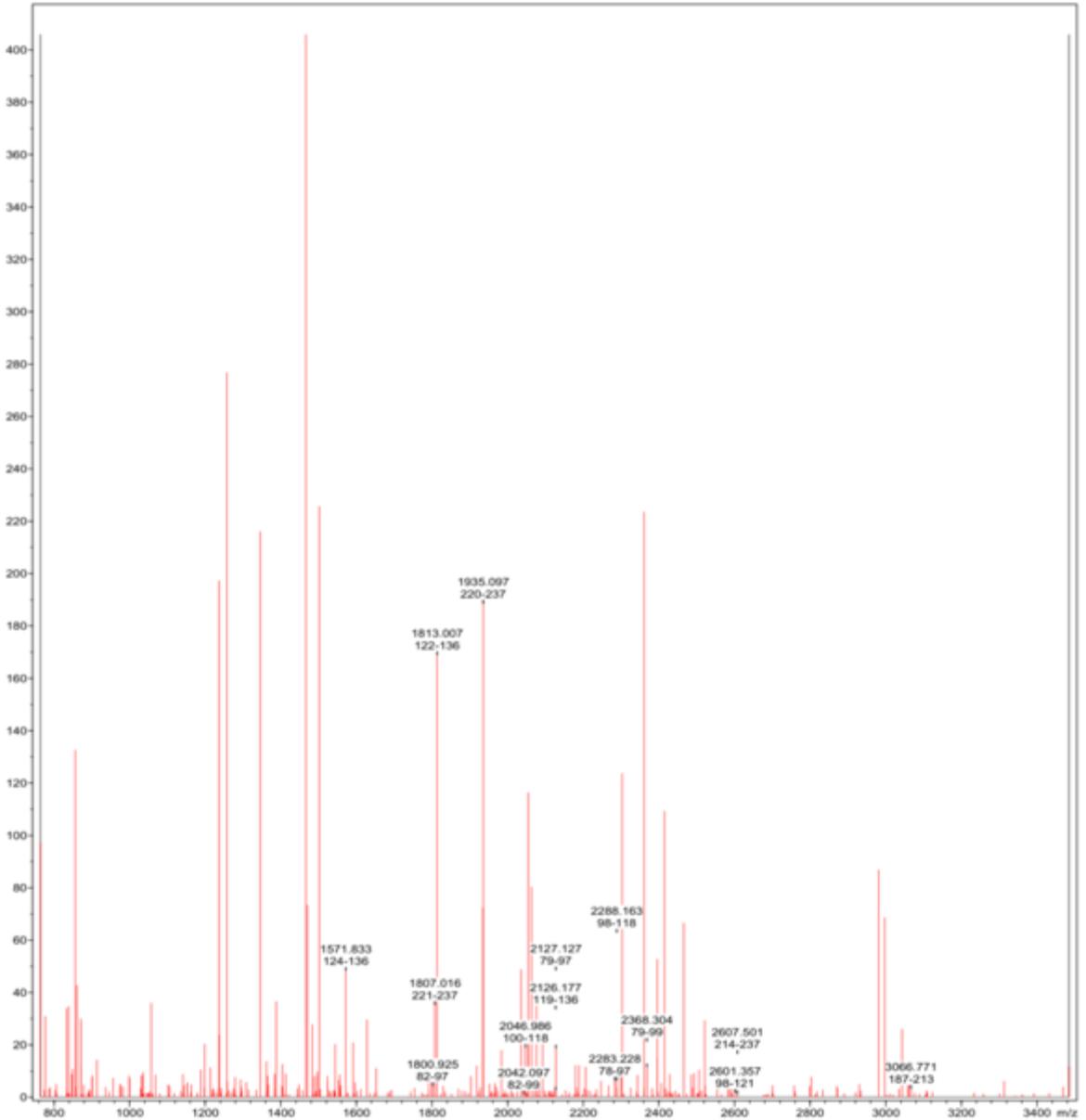
142. Wickner R.B., Kelly A.C. Prions are affected by evolution at two levels. // *Cell Mol Life Sci.* – 2016. – Vol. 73, № 6. – P. 1131–1144.
143. Wu X., Tanwar P.S., Raftery L.A. *Drosophila* follicle cells: morphogenesis in an eggshell. // *Semin Cell Dev Biol.* – 2008. – Vol. 19, №3. – P. 271–282.
144. Wyburn G.M., Aitken R.N., Johnston H.S. The ultrastructure of the zona radiata of the ovarian follicle of the domestic fowl. // *J Anat.* – 1965. – Vol. 99. – P. 469–484.
145. Zhang X.H., Wu H., Tang S., Li Q.N., Xu J., Zhang M., Su Y.N., Yin B., Zhao Q.L., Kemper N., Hartung J., Bao E.D. Apoptosis in response to heat stress is positively associated with heat-shock protein 90 expression in chicken myocardial cells in vitro. // *J Vet Sci.* – 2017. – Vol. 18, №2. – P. 129–140.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение А. Идентификация белка s36 (табл. 4)

Sequence Name: Chorion protein S36 OS=Drosophila melanogaster GN=Cp36 PE=3 SV=2 CH36_DROME
 MH+ (mono): 1.008 MH+ (avg): 1.008 Threshold (a.i.): 0.000
 Tolerance (Da): 5.500 Number of Peaks: 364

Abs. Int. * 1000



Intensity Coverage: 10.8 % (530318 cnts)
 Sequence Coverage MS/MS: 37.7%

Sequence Coverage MS: 38.7%
 pI (isoelectric point): 9.1

10	20	30	40	50	60	70	80	90
MQLGLWFGIL	AIAATPLVSA	NYGPAGGHGH	GHGHCQYLSG	PNAGLEEVN	VASGGNQQA	NQIASQAEIQ	PTPEEARLIG	RVQAGLQALN
100	110	120	130	140	150	160	170	180
ADPNYQKLKN	SEDAESLAE	TNLASNIRQG	KIKVVSPQFV	DQHLFRLSLV	PSGHNNHQVI	ATQPLPPIIV	HQPGAPPAHV	NSGPPTVVRG
190	200	210	220	230	240	250	260	270
NPVIYKIKPS	VIYQAEVINK	VFTPLSLNPV	YVKVYKPKGK	IEAPLAPVVA	PVYSQPREYS	QPQGYGSAGA	ASSAAGAASS	ADGNAYGNEA
280	290							
PLYNSPAPYG	QPNY							

Display Parameter:

Sequence Name: Chorion protein S36 OS=Drosophila melanogaster GN=Cp36 PE=3 SV=2 CH36_DROME
 MH+ (mono): 1.008 MH+ (avg): 1.008 Threshold (a.i.): 0.000
 Tolerance (Da): 5.500 Number of Peaks: 364

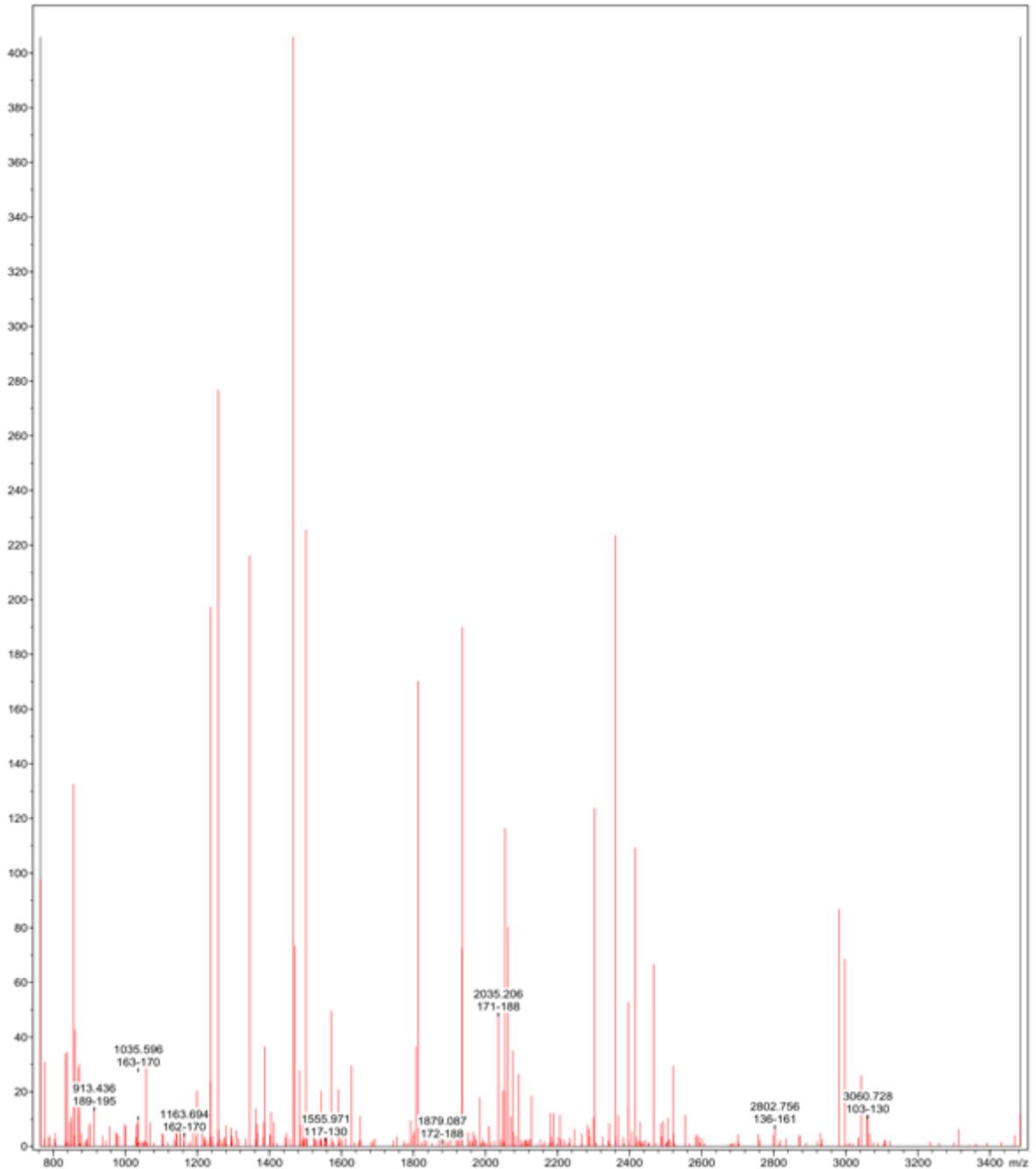
Peaklist:

Peak	Mass	Intensity	Peak	Mass	Intensity	Peak	Mass	Intensity
1	764.376	97358.550	2	774.344	2742.515	3	776.418	30966.176
4	786.362	3238.837	5	789.446	3768.477	6	803.382	2727.034
7	805.415	4944.103	8	807.402	1487.028	9	833.073	848.695
10	833.078	2837.319	11	833.081	33991.075	12	835.451	1456.940
13	839.091	34770.225	14	841.397	1564.106	15	846.478	8845.044
16	848.730	632.237	17	849.432	10821.919	18	856.406	132574.851
19	857.393	4031.997	20	861.076	42761.481	21	870.453	28548.952
22	871.032	11728.420	23	871.034	30141.477	24	874.465	1273.164
25	878.389	4711.205	26	881.262	407.636	27	889.464	1697.982
28	893.011	2641.569	29	894.362	2708.204	30	894.476	799.066
31	900.482	7229.324	32	900.485	7618.363	33	901.385	8420.853
34	913.436	14321.707	35	936.502	3841.997	36	945.528	2040.036
37	956.175	7326.562	38	974.568	5126.836	39	975.529	3779.198
40	976.461	4623.457	41	982.295	3984.448	42	998.547	8232.201
43	1000.569	7180.854	44	1028.553	3368.098	45	1031.985	8276.478
46	1032.487	8229.902	47	1033.517	1359.548	48	1033.524	918.223
49	1035.596	9619.157	50	1038.672	1618.214	51	1046.476	1670.946
52	1046.604	1540.488	53	1050.546	1447.576	54	1053.617	2190.402
55	1057.487	35973.755	56	1060.058	1265.353	57	1060.066	1443.849
58	1068.621	8667.034	59	1079.464	1383.518	60	1101.651	4818.105
61	1104.075	631.263	62	1105.560	4307.871	63	1117.565	1668.856
64	1135.564	2397.302	65	1140.554	8797.972	66	1141.672	1511.713
67	1143.519	4593.669	68	1152.061	5386.707	69	1152.563	5625.906
70	1162.537	2069.679	71	1162.584	1568.731	72	1163.694	4860.085
73	1178.512	1031.140	74	1179.658	1764.889	75	1188.652	10507.020
76	1197.645	3672.657	77	1198.712	20388.917	78	1213.590	11260.031
79	1218.573	2948.297	80	1220.520	1743.138	81	1221.593	3263.955
82	1228.726	1819.722	83	1234.687	3615.414	84	1236.576	197279.131
85	1236.582	23774.400	86	1241.692	1855.574	87	1242.553	3546.374
88	1255.732	1621.214	89	1257.567	276773.791	90	1258.558	5969.410
91	1262.718	2679.181	92	1269.703	1738.926	93	1274.527	3451.866
94	1277.690	1483.658	95	1277.707	2725.363	96	1279.546	7691.253
97	1280.539	825.643	98	1293.599	6831.724	99	1293.621	1553.611
100	1295.517	4047.324	101	1296.735	2525.199	102	1307.680	5806.004
103	1314.595	2867.264	104	1334.661	2858.905	105	1344.878	216057.922
106	1361.683	2432.870	107	1362.478	13691.969	108	1365.737	8118.265
109	1366.864	4796.850	110	1382.834	3340.862	111	1383.458	8849.424
112	1387.650	36573.383	113	1401.902	4357.694	114	1403.640	12651.866
115	1404.779	3835.434	116	1411.871	1415.385	117	1412.702	8924.857
118	1421.764	1173.278	119	1443.778	3321.178	120	1446.879	1243.562
121	1447.724	4822.704	122	1457.701	2670.319	123	1465.735	405827.288
124	1470.685	73414.545	125	1482.721	27813.827	126	1486.679	1345.601
127	1487.719	8024.833	128	1492.665	2252.983	129	1493.737	2035.207
130	1495.647	8152.550	131	1496.817	9854.234	132	1501.690	225639.867
133	1502.686	2677.001	134	1503.697	3134.068	135	1522.767	8064.727
136	1522.796	4633.027	137	1523.673	5857.578	138	1527.703	2678.734
139	1531.721	1962.999	140	1539.645	2669.512	141	1541.865	2535.786
142	1543.893	20360.783	143	1544.750	1814.973	144	1553.785	6602.386
145	1555.736	8703.146	146	1555.971	3125.756	147	1556.709	2467.023
148	1558.716	4468.792	149	1571.833	49649.634	150	1575.728	1403.461
151	1577.720	1899.382	152	1591.630	20886.234	153	1593.692	1464.751
154	1596.573	5668.866	155	1601.823	2298.923	156	1611.757	3121.300
157	1627.580	29672.941	158	1635.796	1525.056	159	1646.850	1657.522
160	1651.742	2379.941	161	1651.888	11063.474	162	1652.916	2107.212
163	1682.904	1577.199	164	1687.883	2209.378	165	1693.007	2825.085
166	1742.940	2118.274	167	1753.481	3541.066	168	1772.826	1888.757
169	1777.821	1089.978	170	1784.992	1134.822	171	1790.895	9463.013
172	1791.726	2637.359	173	1799.906	4447.093	174	1800.925	5663.769
175	1807.016	36600.618	176	1813.007	170211.540	177	1814.000	498.180
178	1822.909	1351.456	179	1829.914	4290.900	180	1834.982	2125.210
181	1850.951	1302.047	182	1870.027	3189.132	183	1879.087	2408.099
184	1887.993	2223.647	185	1895.860	1576.051	186	1902.959	8066.547
187	1918.084	11947.672	188	1923.917	2083.074	189	1927.856	3653.455

Приложение Б. Идентификация белка s38 (табл. 4)

Sequence Name: Chorion protein S38 OS=Drosophila melanogaster GN=Cp38 PE=2 SV=1 CH38_DROME
 MH+ (mono): 1.008 MH+ (avg): 1.008 Threshold (a.i.): 0.000
 Tolerance (Da): 5.500 Number of Peaks: 364

Abs. Int. * 1000



Intensity Coverage: 2.1 % (102394 cnts)
 Sequence Coverage MS/MS: 31.2%

Sequence Coverage MS: 37.6%
 pI (isoelectric point): 4.3

10	20	30	40	50	60
<!DOCTYPE	HTML PUBLI	C "-//IETF	//DTD HTML	2.0//EN">	</HTML><HE
AD><TITLE	>404 NOT F	OUND</TITL	E></HEAD>	<BODY><H1	>NOT FOUND
</H1><P>T	HE REQUEST	ED URL /MA	SCOT/CGI/M	SHIOTOOLS	PROTEIN GE
T.PL WAS N	OT FOUND	ON THIS SER	VER.</P><	/BODY></HT	ML><

Display Parameter:

Sequence Name: Chorion protein S38 OS=Drosophila melanogaster GN=Cp38 PE=2 SV=1 CH38_DROME
 MH+ (mono): 1.008 MH+ (avg): 1.008 Threshold (a.i.): 0.000
 Tolerance (Da): 5.500 Number of Peaks: 364

Peaklist:

Peak	Mass	Intensity	Peak	Mass	Intensity	Peak	Mass	Intensity
1	764.376	97358.550	2	774.344	2742.515	3	776.418	30966.176
4	786.362	3238.837	5	789.446	3768.477	6	803.382	2727.034
7	805.415	4944.103	8	807.402	1487.028	9	833.073	848.695
10	833.078	2837.319	11	833.081	33991.075	12	835.451	1456.940
13	839.091	34770.225	14	841.397	1564.106	15	846.478	8845.044
16	848.730	632.237	17	849.432	10821.919	18	856.406	132574.851
19	857.393	4031.997	20	861.076	42761.481	21	870.453	28548.952
22	871.032	11728.420	23	871.034	30141.477	24	874.465	1273.164
25	878.389	4711.205	26	881.262	407.636	27	889.464	1697.982
28	893.011	2641.569	29	894.362	2708.204	30	894.476	799.066
31	900.482	7229.324	32	900.485	7618.363	33	901.385	8420.853
34	913.436	14321.707	35	936.502	3841.997	36	945.528	2040.036
37	956.175	7326.562	38	974.568	5126.836	39	975.529	3779.198
40	976.461	4623.457	41	982.295	3984.448	42	998.547	8232.201
43	1000.569	7180.854	44	1028.553	3368.098	45	1031.985	8276.478
46	1032.487	8229.902	47	1033.517	1359.548	48	1033.524	918.223
49	1035.596	9619.157	50	1038.672	1618.214	51	1046.476	1670.946
52	1046.604	1540.488	53	1050.546	1447.576	54	1053.617	2190.402
55	1057.487	35973.755	56	1060.058	1265.353	57	1060.066	1443.849
58	1068.621	8667.034	59	1079.464	1383.518	60	1101.651	4818.105
61	1104.075	631.263	62	1105.560	4307.871	63	1117.565	1668.856
64	1135.564	2397.302	65	1140.554	8797.972	66	1141.672	1511.713
67	1143.519	4593.669	68	1152.061	5386.707	69	1152.563	5625.906
70	1162.537	2069.679	71	1162.584	1568.731	72	1163.694	4860.085
73	1178.512	1031.140	74	1179.658	1764.889	75	1188.652	10507.020
76	1197.645	3672.657	77	1198.712	20388.917	78	1213.590	11260.031
79	1218.573	2948.297	80	1220.520	1743.138	81	1221.593	3263.955
82	1228.726	1819.722	83	1234.687	3615.414	84	1236.576	197279.131
85	1236.582	23774.400	86	1241.692	1855.574	87	1242.553	3546.374
88	1255.732	1621.214	89	1257.567	276773.791	90	1258.558	5969.410
91	1262.718	2679.181	92	1269.703	1738.926	93	1274.527	3451.866
94	1277.690	1483.658	95	1277.707	2725.363	96	1279.546	7691.253
97	1280.539	825.643	98	1293.599	6831.724	99	1293.621	1553.611
100	1295.517	4047.324	101	1296.735	2525.199	102	1307.680	5806.004
103	1314.595	2867.264	104	1334.661	2858.905	105	1344.878	216057.922
106	1361.683	2432.870	107	1362.478	13691.969	108	1365.737	8118.265
109	1366.864	4796.850	110	1382.834	3340.862	111	1383.458	8849.424
112	1387.650	36573.383	113	1401.902	4357.694	114	1403.640	12651.866
115	1404.779	3835.434	116	1411.871	1415.385	117	1412.702	8924.857
118	1421.764	1173.278	119	1443.778	3321.178	120	1446.879	1243.562
121	1447.724	4822.704	122	1457.701	2670.319	123	1465.735	405827.288
124	1470.685	73414.545	125	1482.721	27813.827	126	1486.679	1345.601
127	1487.719	8024.833	128	1492.665	2252.983	129	1493.737	2035.207
130	1495.647	8152.550	131	1496.817	9854.234	132	1501.690	225639.867
133	1502.686	2677.001	134	1503.697	3134.068	135	1522.767	8064.727
136	1522.796	4633.027	137	1523.673	5857.578	138	1527.703	2678.734
139	1531.721	1962.999	140	1539.645	2669.512	141	1541.865	2535.786
142	1543.893	20360.783	143	1544.750	1814.973	144	1553.785	6602.386
145	1555.736	8703.146	146	1555.971	3125.756	147	1556.709	2467.023
148	1558.716	4468.792	149	1571.833	49649.634	150	1575.728	1403.461
151	1577.720	1899.382	152	1591.630	20886.234	153	1593.692	1464.751
154	1596.573	5668.866	155	1601.823	2298.923	156	1611.757	3121.300
157	1627.580	29672.941	158	1635.796	1525.056	159	1646.850	1657.522
160	1651.742	2379.941	161	1651.888	11063.474	162	1652.916	2107.212
163	1682.904	1577.199	164	1687.883	2209.378	165	1693.007	2825.085
166	1742.940	2118.274	167	1753.481	3541.066	168	1772.826	1888.757
169	1777.821	1089.978	170	1784.992	1134.822	171	1790.895	9463.013
172	1791.726	2637.359	173	1799.906	4447.093	174	1800.925	5663.769
175	1807.016	36600.618	176	1813.007	170211.540	177	1814.000	498.180
178	1822.909	1351.456	179	1829.914	4290.900	180	1834.982	2125.210
181	1850.951	1302.047	182	1870.027	3189.132	183	1879.087	2408.099
184	1887.993	2223.647	185	1895.860	1576.051	186	1902.959	8066.547
187	1918.084	11947.672	188	1923.917	2083.074	189	1927.856	3653.455
190	1934.094	72460.703	191	1935.097	189890.675	192	1951.903	5168.503
193	1956.077	1599.317	194	1957.071	2263.754	195	1962.884	1726.064
196	1965.929	5347.359	197	1970.028	3951.320	198	1973.033	2464.146
199	1983.935	17974.468	200	1986.023	1285.710	201	1991.114	1227.739
202	1991.914	1141.094	203	1992.120	2648.310	204	1996.901	1445.275