

САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

На правах рукописи

Данилов Лаврентий Глебович

**Изучение амилоидных свойств белков нуклеопоринов и влияния их
агрегации на импорт макромолекул в ядро в клетках дрожжей
*Saccharomyces cerevisiae***

Научная специальность 1.5.7. Генетика

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель: канд.биол.наук

Станислав Александрович Бондарев

Санкт-Петербург

2024

Оглавление	
Список сокращений и условных обозначений	4
Введение.....	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	9
1. Общая характеристика амилоидов	9
2. Биологическая роль амилоидов	10
2.1. Функциональные амилоиды.....	11
3. Патологические амилоиды	17
3.1. Амилоидный пептид β	17
3.2. Белок SSA	17
3.3 Белок tau	18
3.4 Белок хантингтин	18
4. Методы идентификации амилоидов.....	19
4.1. Экспериментальные методы	19
5. Семейство белков нуклеопоринов.....	23
5.1. Характеристика белков нуклеопоринов.....	23
5.2 Амилоидные свойства нуклеопоринов	25
5.3 Влияние агрегации белков на ядерно-цитоплазматический транспорт.....	28
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	30
2.1 Штаммы и плазмиды.....	30
2.2 Среды и условия культивирования.....	35
2.3 Бактериальная трансформация	36
2.4 Дрожжевая трансформация.....	36
2.5. Потеря приона [<i>PIN</i> ⁺].....	37
2.6. Микроскопия	38
2.6.1 Флуоресцентная микроскопия	38
2.6.2 Просвечивающая электронная микроскопия.....	38
2.6.3 Поляризационная микроскопия	38
2.7 Методы работы с нуклеиновыми кислотами.....	39
2.7.1 Выделение и очистка ДНК	39
2.7.2 ПЦР (полимеразная цепная реакция)	39
2.7.3 ПЦР с колоний.....	44
2.7.4 Электрофорез нуклеиновых кислот.....	44
2.7.5 Получение кДНК.....	45
2.7.6 Рестрикция и лигирование фрагментов	45
2.7.7 Рекомбинационное клонирование (Gateway reaction)	45
2.7.8 Секвенирование ДНК.....	45

2.8 Методы работы с белками.....	46
2.8.1 Денатурирующий электрофорез белков в полиакриламидном геле (SDS-PAGE).....	46
2.8.2 Окраска белков красителем Кумасси	46
2.8.3 Полуденатурирующий электрофорез белковых агрегатов в агарозном геле (SDD-AGE).....	46
2.8.4 Полусухой перенос белков на мембрану	47
2.8.5 Капиллярный перенос.....	47
2.8.6 Вестерн-блот гибридизация	48
2.8.7 Очистка рекомбинантных белков	48
2.8.8 Обработка протеиназой К.....	49
2.9 Статистическая обработка.....	49
2.10 Анализ ядерно-цитоплазматического транспорта	49
2.11 Биоинформатические методы	50
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ.....	52
3.1. Белок человека NUP58 демонстрирует амилоидные свойства в различных системах	52
3.1.1 Амилоидные свойства белка NUP58 <i>in vitro</i>	53
3.1.2 Амилоидогенные свойства белка NUP58 в модельных системах	60
3.2. Фрагменты нуклеопорина NUP58 обладают амилоидогенными свойствами	64
3.2.1 Проверка агрегации фрагментов белка NUP58 в системе C-DAG	64
3.2.2 Проверка агрегации фрагментов белка NUP58 в дрожжевой системе	67
3.3. Ортологи белка человека NUP58 и дрожжевого белка Nup100 демонстрируют амилоидогенные свойства	68
3.3.1 Биоинформатический анализ амилоидных свойств ортологов белков нуклеопоринов....	68
3.3.2 Белки нуклеопорины различных организмов демонстрируют амилоидогенные свойства в системе C-DAG.....	72
3.3.3 Белки нуклеопорины различных организмов демонстрируют амилоидогенные свойства в дрожжевой системе	75
3.3.4 Оценка влияния приона [<i>PIN</i> ⁺] на агрегацию нуклеопоринов	78
3.4. Влияние агрегации нуклеопоринов на ядерно-цитоплазматический транспорт	79
ГЛАВА 4. Обсуждение	84
4.1 Амилоидные свойства белка человека NUP58.....	84
4.2 Консервативность амилоидных свойств нуклеопоринов	85
4.3 Влияние агрегации нуклеопоринов на импорт макромолекул в ядро.....	87
ВЫВОДЫ.....	90
Список литературы	91
Благодарности	106

Список сокращений и условных обозначений

БМЭ — β -меркаптоэтанол

ИПТГ — изопропил β -D-1-тиогалактопиранозид

п. н. — пар нуклеотидов

ПЦР — полимеразная цепная реакция

ЭДТА — этилендиаминтетрауксусная кислота

ЯПК – ядерный поровый комплекс

BSA — *bovine serum albumin* (бычий сывороточный альбумин)

C-DAG — *curli-dependent amyloid generator* (система для проверки амилоидных свойств белков в бактериях)

FG-повторы — повторы фенилаланина и глицина

НТТ – *huntingtin* (белок человека хантингтин)

IPTG – Изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид

LiAc — *lithium acetate* (ацетат лития)

LBa – среда LB с ампициллином

mQ — деионизированная вода

SDS — *sodium dodecyl sulfate* (додецил сульфат натрия)

SC — *Synthetic Complete* (синтетическая среда на основе YNB)

Q/N-богатый — обогащённый остатками глутамина и аспарагина

v/v — *volume/volume* (объем к объему)

w/v — *weight/volume* (масса к объему)

YNB — *Yeast Nitrogen Base* (дрожжевая азотная основа)

В работе использованы стандартные однобуквенные обозначения нуклеотидов, а также однобуквенные и трехбуквенные обозначения аминокислот.

Введение

Актуальность темы. Амилоиды могут образовывать упорядоченные агрегаты, организованные в неразветвленные фибриллы, обогащенные β -слоями. Такие агрегаты образуются при различных амилоидозах, таких как болезни Альцгеймера, Хантингтона и Паркинсона. Эти агрегаты плохо растворимы, и накопление их в клетке приводит к нарушению клеточного гомеостаза и гибели клетки. В тоже время появляются все новые примеры амилоидов, которые считаются функциональными. Для всех амилоидов можно выделить общие свойства. К этим свойствам относятся связывание с амилоид-специфичными красителями (Конго красный и Тиофлавин Т) и образование детергент и протеазоустойчивых агрегатов. Из-за увеличения частоты возникновения амилоидных заболеваний становится актуальным анализ протеомов с целью поиска и анализа новых амилоидогенных белков. Такие белки могут сами образовывать агрегаты или входить в состав уже существующих агрегатов. Одним из важнейших процессов внутри клетки является обмен молекулами между ядром и цитоплазмой. В нем ключевую роль играют белки нуклеопорины, которые образуют специфическую структуру – ядерную пору. Ранее было показано наличие амилоидных свойств у дрожжевых нуклеопоринов, однако не было исследовано то, как их агрегация влияет на транспорт молекул между ядром и цитоплазмой. С другой стороны, консерватизм способности этих белков к агрегации с точки зрения эволюции изучен достаточно слабо, что является существенным пробелом в понимании физиологической роли агрегации конкретного белка.

Цель работы: Оценка консервативности амилоидных свойств нуклеопоринов с FG-повторами в модельных системах и влияния агрегации нуклеопоринов на ядерно-цитоплазматический транспорт в клетках дрожжей.

В рамках поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

1. Проверка амилоидных свойств белка человека NUP58 *in vitro* и в модельных системах.
2. Поиск участка NUP58, отвечающего за агрегацию, с использованием делеционного анализа в системе C-DAG и клетках дрожжей.
3. Проверка консервативности амилоидных свойств ортологов дрожжевых нуклеопоринов Nsp1 и Nup145 в системе C-DAG и клетках дрожжей.
4. Оценка влияния агрегации нуклеопоринов на ядерно-цитоплазматический транспорт в клетках дрожжей.

Научная новизна работы. В ходе данной работы нами были проанализированы амилоидные свойства белков нуклеопоринов, которые встречаются

у всех эукариотических организмов. В ранних исследованиях было показано, что некоторые дрожжевые нуклеопорины, например, белок Nup100 обладают амилоидными свойствами. Мы провели биоинформатический скрининг нуклеопоринов для оценки консервативности амилоидогенных свойств. Анализ показал, что нуклеопорины из различных организмов демонстрируют амилоидные свойства в дрожжевой системе и системе C-DAG. Кроме того, для человеческого белка NUP58 были проведены дополнительные проверки, которые позволили установить, что участок с 1 по 213 аминокислоту необходим для формирования амилоидных агрегатов. В дрожжевой системе нами было проанализировано влияние агрегации фрагментов белков нуклеопоринов на ядерно-цитоплазматический транспорт. В результате нами было показано, что сверхпродукция фрагментов нуклеопоринов Nup98₂₅₀₋₅₀₀ *Schizosaccharomyces pombe*, Nup58₆₀₋₃₂₀ *Taeniopygia guttata* и Nup98₂₅₀₋₅₀₀ *Drosophila melanogaster* приводит к снижению импорта макромолекул в ядро.

Теоретическая и практическая значимость работы. Результаты, полученные в рамках проведенного исследования, позволяют расширить представление о частоте встречаемости амилоидов. В работе продемонстрированы консервативные амилоидные свойства белков нуклеопоринов. Эти свойства подтверждены биоинформатическим анализом и частично экспериментальными методами. Более того, показан феномен влияния агрегации белков нуклеопоринов на импорт макромолекул в ядро.

Методология и методы исследования. В ходе выполнения работы было использовано большое количество современных методов исследования, включая молекулярно-биологические методы работы с нуклеиновыми кислотами и белками, биохимические методы анализа, флуоресцентная, поляризационная и электронная микроскопия. Эксперименты были проведены на различных модельных системах, таких как система *in vitro*, бактерии и дрожжи. В рамках диссертационного исследования применены методы анализа ядерно-цитоплазматического транспорта для оценки импорта макромолекул в ядро. Для оценки амилоидных свойств белков нуклеопоринов были использованы биоинформатические методы.

Степень достоверности и апробация результатов. Основные результаты диссертационной работы были доложены на четырех международных конференциях.

Материалы диссертации представлены в трёх публикациях:

1. **Danilov L.G.**, Moskalenko S.E., Matveenko A.G., Sukhanova X.V., Belousov M.V., Zhouravleva G.A., Bondarev S.A. The Human NUP58 Nucleoporin Can

Form Amyloids *In Vitro* and *In Vivo*. // Biomedicines. — 2021. — Vol. 9 — P. 1451.

2. **Danilov L.G.**, Sukhanova X.V., Rogoza T.M., Antonova E.Y., Trubitsina N.P., Zhouravleva G.A., Bondarev S.A. Identification of New FG-Repeat Nucleoporins with Amyloid Properties. // International Journal of Molecular Science. — 2023. — Vol. 24 — P. 8571.
3. Barbitoff Y.A., Matveenکو A.G., Mativ A.B., Maksiutenko E.M., Moskalenko S.E., Drozdova P.B., Polev D.E., Beliavskaia A.Y., **Danilov L.G.**, Predeus A.V., Zhouravleva G.A., Chromosome-level genome assembly and structural variant analysis of two laboratory yeast strains from the Peterhof Genetic Collection lineage //G3 Genes|Genomes|Genetics. — 2021. — Vol. 11

Основные научные результаты. В диссертационной работе представлены основные научные результаты исследования в виде публикации трех научных работ, выполненных соискателем в соавторстве:

1. В экспериментальной статье «The Human NUP58 Nucleoporin Can Form Amyloids *In Vitro* and *In Vivo*» [30], опубликованной в Biomedicines (Scopus) в соавторстве с Москаленко С.Е., Матвеевко А.Г., Сухановой К.В., Белоусовым М.В., Журавлевой Г.А. и Бондаревым С.А. изложены результаты исследования амилоидных свойств белка NUP58 и его фрагмента с 1 по 213 аминокислоту.
2. В экспериментальной статье «Identification of New FG-Repeat Nucleoporins with Amyloid Properties» [31], опубликованной в журнале International Journal of Molecular Science (Scopus) в соавторстве с Сухановой К.В., Рогозой Т.М., Антоновой Е.Ю., Трубициной Н.П., Журавлевой Г.А. и Бондаревым С.А. представлены результаты биоинформатической оценки консервативности амилоидных свойств белков нуклеопоринов и экспериментальные проверки амилоидных свойств в системе C-DAG и в дрожжах *Saccharomyces cerevisiae*. Кроме того, в данной статье опубликована информация о влиянии [*PIN*⁺] фактора на частоту агрегации фрагментов нуклеопоринов.
3. В экспериментальной статье «Chromosome-level genome assembly and structural variant analysis of two laboratory yeast strains from the Peterhof Genetic Collection lineage» [13], опубликованной в журнале G3 Genes|Genomes|Genetics (Scopus) в соавторстве с Барбитовым Ю.А., Матвеевко А.Г., Мативом А.Б., Максютенко Е.М., Москаленко С.Е.,

Дроздовой П.Б., Полевым Д. Е., Белявской А.Ю., Предусом А.В. и Журавлевой Г.А. представлены результаты влияния мутаций в гене *NUP100* на склонность к агрегации в дрожжевого белка Nup100 в различных штаммах.

В первых двух статьях автор внес персональный вклад в виде разработки дизайна исследования, сбора экспериментального материала, статистической обработки полученных данных, подготовки таблиц и рисунков и написания текста. В третьей статье автор внес вклад в виде проведения анализа амилоидных свойств белка Nup100 в различных дрожжевых штаммах, описание этих результатов и подготовке иллюстративного материала.

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Белок человека NUP58 может формировать амилоидные агрегаты, стабилизированные дисульфидными связями в системе *in vitro*, а также демонстрирует амилоидные свойства в системе C-DAG и в клетках дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*.
2. За агрегацию белка NUP58 отвечает участок с 1 по 213 аминокислотный остаток с FG-повторами.
3. Фрагменты нуклеопоринов из разных видов демонстрируют амилоидные свойства в различных тест-системах. К таким белкам относятся нуклеопорины Nup98 *Homo sapiens*, *Schizosaccharomyces pombe* и *Drosophila melanogaster*.
4. Дрожжевой фактор [*PIN*⁺] не влияет на частоту агрегации фрагментов нуклеопоринов Nup98 *Homo sapiens*, *Schizosaccharomyces pombe* и *Drosophila melanogaster*.

Объем и структура работы. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов исследования, обсуждения, выводов и списка литературы, содержащего **165** ссылок. Работа изложена на **106** страницах, содержит **31** рисунок и **11** таблиц.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1. Общая характеристика амилоидов

Амилоиды представляют собой упорядоченные белковые фибриллы, в которых β -складчатые листы формируются за счет образования межмолекулярных водородных связей. Данные связи образуются с определенной регулярностью, так как во взаимодействие вовлечены одни и те же аминокислотные последовательности мономеров [73]. На сегодняшний день амилоидом принято считать любой белок, без ассоциированных с ним компонентов, локализованный в любом клеточном компартменте и обладающий одной из следующих структур: суперскладчатой β -структурой (параллельной или не параллельной), β -соленоидом или стопкой глобул ([73, 142]). В медицине при постановке диагноза амилоидоз под амилоидом чаще понимают не только фибриллы белка с определённой структурой, а весь комплекс белков, который ассоциирован с этой структурой [16, 79, 152]. На сегодняшний день можно выделить ряд свойств, которые присущи всем амилоидам (по [1,3]):

1. Взаимодействие со специфичными красителями, такими как Конго красный и Тиофлавин Т.
2. Наличие поперечной исчерченности вдоль главной оси фибриллы, которая возникает в результате поперечного расположения мономеров белка по отношению к основной оси фибриллы.
3. Устойчивость к детергентам, таким как SDS.
4. Рост фибриллы за счет присоединения мономерного белка к протофибрилле, который сопровождается изменением конформации [99].

Амилоидогенные свойства белка определяются составом его аминокислотной последовательности, и на этом основаны некоторые алгоритмы по предсказанию амилоидных свойств того или иного белка. Считается, что аминокислотные последовательности, обогащенные гидрофобными аминокислотами, такими как валин, изолейцин, фенилаланин, а также аминокислотами глутамином и аспарагином, обладают наибольшим амилоидогенным потенциалом, в то время как последовательности, содержащие сильно заряженные аминокислоты, не способны к формированию амилоидных агрегатов [7]. Большинство известных на сегодняшний день амилоидов обладают патогенными свойствами и для них характерно повышение уровня белка в клетке [3]. Однако за последние 5 лет был выявлен ряд функциональных амилоидов, которые конститутивно образуются в клетках или начинают образовывать агрегаты в

ответ на изменения условий окружающей среды [128, 150]. Включение мономерного белка в агрегаты часто приводит к частичной или полной инактивации белка, а в редких случаях – к приобретению новых функций (по обзору [163]).

Термин «*Prion*» был впервые предложен Стенли Прузинером для описания особого варианта структуры белка PrP, которая приводит к возникновению нейродегенеративных заболеваний млекопитающих, например, скрепи или «почесуха овец» [121]. Основной причиной развития таких заболеваний является то, что мономерный белок PrP^C (*cellular*) изменяет свою конформацию и переходит в прионную конформацию – PrP^{Sc}, который накапливается в клетках в виде белковых агрегатов. Белковые агрегаты белка PrP амилоидной природы обнаруживают в головном и спинном мозге, в выделениях из лимфатической системы, а также в других органах и тканях [5]. Главными чертами белковых агрегатов, обнаруженных Стенли Прузинером, была устойчивость к обработке различными детергентами (SDS, мочевины), протеолизу, нагреванию и облучению ультрафиолетом [122]. Проверка большинства этих черт является одним из этапов доказательства того, что белок обладает амилоидными свойствами. Наличие инфекционности является главным отличием прионов от амилоидов. В ходе агрегации происходит изменение конформации мономерного белка и присоединение к агрегату, что обеспечивает рост фибриллы. На этапе инициации процессы образования прионов и амилоидов не имеют отличий [1]. В случае формирования функциональных амилоидов уровень продукции белка оказывается достаточным для того, чтобы мономеры связались друг с другом за счет формирования межмолекулярных взаимодействий [1]. Образовавшаяся затравка присоединяет новые мономеры, что приводит к формированию олигомера и протофибриллы. В случае же прионов и патологических амилоидов данный процесс инициируется повышением концентрации амилоидогенного белка. Важно подчеркнуть, что каждый новый неинфекционный амилоидный агрегат образуется независимо от предыдущего, тогда как в случае прионов агрегаты расщепляются, что приводит к возникновению цикла прионной конверсии [1, 92]. Обеспечение инфекционности прионов происходит за счет фрагментирования агрегатов, происходящего за счет взаимодействия белковых агрегатов с белками шаперонами, которые осуществляют неспецифическое разрезание агрегатов на более мелкие [85].

2. Биологическая роль амилоидов

Изначально считалось, что амилоиды могут быть только патогенными и приводить к возникновению заболеваний, однако за последнее десятилетие был описан ряд амилоидов, выполняющих различные физиологические функции в организме как

прокариотических, так и эукариотических организмов [128, 150].

2.1. Функциональные амилоиды

Функциональные амилоиды впервые были описаны как внеклеточные белковые компоненты у высших эукариот – белки спидроин и фиброин. Данные белки являются компонентами паутины и шелка соответственно. До сих пор нет четкого представления о структуре данных амилоидов. Благодаря особой последовательности (Gly-Ser-Gly-Ala-Gly-Ala)_n (у фиброина) [129] или наличию повторяющихся мотивов аланина (у спидроина) при секреции данных белков из слюнных желез происходит образование амилоидных фибрилл [66]. Интересным вопросом является то, почему отсутствует патогенность в случае функциональных амилоидов в клетке. Возможными механизмами, которые вызывают патогенез при развитии амилоидных заболеваний можно назвать: образование внеклеточных амилоидных формирований (бляшки при болезни Альцгеймер) и внутриклеточных формирований (при болезни Паркинсона и Хантингтона) [145], а также образование белковых олигомеров, которые являются наиболее цитотоксичными [76]. Важно принимать во внимание фактор взаимодействия зрелых амилоидных фибрилл с клеточными мембранами: такое взаимодействие может привести к нарушению целостности мембраны и ее деполяризации; расщепление фибриллы на токсичные олигомеры может приводить к вторичной нуклеации амилоидного белка, что будет усиливать патогенез [156]. Для нивелирования токсичности амилоидных фибрилл и сохранения нормального функционирования клетки можно выделить следующие механизмы в клетке с функциональными амилоидами [70]:

- Регуляцию продукции амилоидогенных белков и пептидов (контроль транскрипции и трансляции, а также контроль протеолитического расщепления белков).
- Минимизацию времени жизни префибрилярных олигомеров, которые обладают наибольшей токсичностью (часто это достигается за счет более высокой скорости образования зрелой фибриллы, чем скорость образования олигомеров).
- Использование молекул, регулирующих клеточный ответ на условия среды для контроля сборки фибрилл функциональных амилоидов.
- Сборка амилоидных фибрилл в различных клеточных компартментах (эндоплазматический ретикулум).
- «Разборка» фибриллы при изменении условий среды или с помощью шаперонных систем клетки.

Таким образом, главным отличием функциональных амилоидов от патологических можно назвать то, что цикл сборки-разборки фибрилл отличается большим контролем со стороны клеточных систем и сигналов из наружной среды, что, в свою очередь, позволяет контролировать место, время и количество образующихся фибрилл.

2.1.1. Функциональные амилоиды прокариот

На сегодняшний день наиболее изученными группами прокариотических функциональных амилоидов являются Курлины (Curlin) и Чаплины (Chaplins), а также есть ещё несколько групп функциональных амилоидов (по [128, 152], данные представлены в таблице 1). Большинство открытых сейчас функциональных амилоидов бактерий чаще всего выполняют защитную или адгезионную функцию, что, несомненно, обусловлено структурными и биохимическими особенностями амилоидов [128].

Таблица 1 — Бактериальные функциональные амилоиды.

Вид	Белок	Функции в клетке	Ссылки
<i>Escherichia coli, Salmonella enteritidis</i>	CsgA	Компонент биоплёнки, адгезия клетки к субстрату	[26, 53]
<i>Pseudomonas sp.</i>	FapC	Компонент биоплёнки, адгезия клетки к субстрату	[39]
<i>Streptomyces coelicolor</i>	Чаплины (ChpA-H)	Белок поверхности бактериальных спор, формирование воздушных гиф	[45]
<i>Bacillus subtilis</i>	TasA	Компонент биоплёнки, адгезия клетки к субстрату, белок поверхности бактериальных спор	[127]
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Microcin E492	Антимикробная защита	[140]
<i>Staphylococcus aureus</i>	PSM	Компонент биоплёнки, адгезия клетки к субстрату	[137]
<i>Streptococcus mutans</i>	Adhesin P1	Компонент биоплёнки, адгезия клетки к субстрату	[113]

<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	МТР	Формирование пилей, ассоциированных с ламинами – осуществление взаимодействия с хозяином	[11]
<i>Xanthomonas axonopodis</i>	НраG	Цитотоксическая активность, вирулентность	[111]

Белок CsgA является одним из первых, открытых и самым изученным из всех функциональных амилоидов бактерий. Изначально он был обнаружен как белок у патогенного штамма *E. coli* и описан как фибронектин-связывающие «завитые пилы» [115]. На первом этапе исследования экстреклаточных образований с использованием электронной микроскопии было показано, что эти белковые фибриллы, на малом увеличении выглядящие, как аморфный матрикс вокруг бактерий, на большом увеличении представлены одиночными фибриллами шириной 6-12 нм. Эти фибриллы обладают устойчивостью к воздействию протеаз и детергентов, а также связывают амилоид-специфичные красители Конго красный и Тиофлавин Т и имеют упорядоченную структуру, обогащенную β -листами [26].

Белок CsgA, кодируемый геном *csgA* (от англ. – *curlin subunit gene*) является главным структурным белком амилоидных фибрилл. Транскрипция оперона *csgBAC* запускается сигма-фактором РНК-полимеразы RpoS. Данный сигма-фактор экспрессируется на стационарной фазе роста бактерий, и его экспрессия положительно коррелирует с понижением температуры и осмолярностью среды [114]. Таким образом, фибриллы белка CsgA образуются как ответ на неблагоприятные условия среды в стационарной фазе роста бактерий, что отвечает роли биопленок в выживании микроорганизмов. Другим важным компонентом системы является белок CsgB. Он выступает фактором нуклеации белка CsgA и минорным компонентом образующихся амилоидных фибрилл [17, 60]. Белок CsgB способен самостоятельно формировать небольшие амилоидные фибриллы, однако его основная функция – инициация агрегации белка CsgA. Последовательности белков CsgA и CsgB идентичны на 30%, что способствует образованию схожих вторичных структур, за счет чего и происходит инициация агрегации [14]. Третьим белком, который необходим для образования фибрилл и функционирует на поверхности клетки стенки является белок CsgF. Данный белок обладает шаперонной активностью и отвечает за правильную локализацию амилоидных фибрилл на поверхности клетки. У штаммов с делецией гена *csgF* нарушается

связывание фибрилл с поверхностью клетки [108].

Белок CsgG также является компонентом системы образования амилоидных фибрилл белка CsgA. Это липопротеин, который связывается с внешней мембраной клеток и регулирует внутриклеточную концентрацию белков CsgA и CsgB. Эта регуляция осуществляется за счет образования канала, через который белки CsgA и CsgB попадают на поверхность клетки. Перед встройкой во внешнюю мембрану белок CsgG образует растворимые олигомеры из 16 субъединиц, организованных в 2 кольцевых октамерных комплекса. Мономеры содержат в структуре по 4 α -спирали и 6 β -листов. Однако, при переходе в связанное с мембраной состояние через прикрепление липидного якоря с N-конца белка, трансмембранный отдел канала принимает структуру β -бочонка [56]. Через образующийся канал проходят белки CsgA, CsgB и CsgF и образуют амилоидные фибриллы на поверхности клетки.

2.1.2. Функциональные амилоиды эукариот

У низших и высших эукариот также есть функциональные амилоиды, которые выполняют различные функции в организме. Примером функциональных амилоидов у низших эукариот можно привести белок Bgl2, который является важным элементом клеточной стенки у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Главным компонентом клеточной стенки являются $\beta(1-3)$ - и $\beta(1-6)$ -гликаны. Исходно гликаны синтезируются в виде линейных молекул, а затем, уже за счет гликозилтрансфераз, происходит образование новых $\beta(1-3)$ - и $\beta(1-6)$ связей. Для белка Bgl2, который обладает гликозилтрансферазной активностью, были показаны амилоидные свойства [75]. При образовании клеточной стенки белок Bgl2 в своей амилоидной конформации участвует в образовании $\beta(1-6)$ гликозидных связей между различными гликанами [8]. Другим примером функционального амилоида является белок Het-S у грибов *Podospora anserina*. Для данного вида грибов характерно преобладание в жизненном цикле стадии синцития. Синцитии двух разных грибов могут сливаться с образованием гетерокариона. Процесс слияния контролируется Het-локусом. Если данные локусы одинаковые у объединяющихся гиф, процесс слияния пройдет удачно, а если отличия есть, то вследствие вегетативной несовместимости произойдет отмирание гетерокариона. Ключевым участником процесса вегетативной несовместимости является прион [Het-s]. Существуют 2 аллели гена *het-s*: *het-s* и *het-S*. Продукт гена *het-S* – белок HET-S – не принимает прионную конформацию. Штамм *P. anserina*, несущий белок в этой форме, обозначается [Het-S] [29]. При слиянии гиф двух штаммов [Het-S] и [Het-s] происходит реакция вегетативной несовместимости и гибель гетерокариона в месте слияния. Таким образом, амилоидная форма белка Het-S приводит к запуску

программируемой клеточной гибели [125].

К функциональным амилоидам также относят белок CPEB (cytoplasmic polyadenylation element binding) моллюска *Aplysia californica*, а также его ортолог Orb2 у *Drosophila melanogaster*. Основной функцией белка CPEB является транспорт мРНК в нейронах [23]. В ответ на выброс серотонина происходит образование амилоидных агрегатов белка CPEB, в состав которых также входит РНК. Образовавшиеся агрегаты поддерживают и стабилизируют синапсы в течение нескольких дней, что обеспечивает образование долговременной памяти [143]. Аналогичные функции были продемонстрированы для ортолога Orb2 дрозофилы. Более того, было показано, что нарушение способности к агрегации у белка Orb2 приводило к потере способности запоминать информацию у мух дрозофил. В ходе образования агрегатов белка Orb2 в комплексе с РНК происходит поддержание нейронных связей, которые участвуют в запоминании новой информации [96]. Другим белком, агрегация которого ассоциирована с памятью у позвоночных является белок FXR1. Данный белок был обнаружен в составе амилоидных агрегатов в мозгах крыс, и практически не детектировался в мономерном состоянии. Основной функцией белка FXR1 является связывание с мРНК, защищая её от деградации. Этот механизм позволяет регулировать уровень экспрессии тех или иных белков, что в свою очередь может являться механизмом формирования долговременной памяти. Важной характеристикой FXR1 также является его высокая консервативность у млекопитающих, что позволяет предположить функциональную роль его ортологов [147].

Еще одним функциональным амилоидом является белок Pmel17, точнее его часть, которая образуется в результате процессинга первичного белкового продукта гена *pmel*. Этот белок в своей агрегированной форме локализуется в цитоплазме меланоцитов кожи. Существует предположение, что сетчатая структура из амилоидных фибрилл связывает меланин и в таком виде пигмент накапливается и хранится в клетках [47]. В 2017 году был идентифицирован участок, который является ответственным за переход белка PMEL в амилоидную форму. Этот участок со 148 по 223 аминокислоты был назван CAF (от англ. CoreAmyloid Fragment). Было показано, что 27 мутаций в этом участке нарушали образование фибрилл белка Pmel17, из них 9 – полностью. Это происходило за счет нарушения этапа нуклеации фибрилл. Показана важная роль ароматических радикалов аминокислот в этом участке для формирования амилоидных фибрилл [62]. Примером функциональных амилоидов, которые играют важную роль в клеточном сигналинге, являются белки семейства RIP (от англ. Receptor Interacting Protein kinase). Основной функцией сигнальной киназой RIP1 является определение судьбы клетки: если RIP1 будет полиубиквитинирована, то клетка выживает [160]; если будет взаимодействовать с киназой

RIP3, то клетка встанет на путь некроза или апоптоза в случае убиквитинилирования С киназы (по [46]). Киназы содержат гомологичную последовательность, названную RHIM (от англ. RIP Homotypic Interaction Motif), благодаря которой происходит взаимодействие их друг с другом. Наличие мутаций в этой последовательности нарушает взаимодействие киназ, тем самым нарушая функцию комплекса. Было показано, что именно комплекс киназ RIP1 и RIP3 образует фибриллы, проявляющие амилоидные свойства, и именно в этой конформации является сигнальным компонентом, индуцирующим некроз [89].

Определенная группа функциональных амилоидов ассоциирована с репродуктивной функцией. Так, одним из примеров может служить наличие телец Бальбиани – специализированных амилоидоподобных органелл в составе которых обнаруживаются митохондрии, РНК и эндоплазматический ретикулум. Также амилоидные свойства продемонстрированы для белков формирующих оболочки ооцитов у насекомых и млекопитающих. Одним из таких примеров может служить наличие амилоидных структур в составе хориона бабочки *Antheraea polyphemus* [67]. В ходе проведенных экспериментов было показано, что спектр рассеяния рентгеновского излучения схож со спектром характерным для амилоидов. Кроме того, для фрагментов белков человека ZP1– ZP4 было показано, что они связываются с амилоид специфическими красителями, а также демонстрируют характерную морфологию агрегатов, полученных *in vitro* [93]. Предположительно, подобные амилоидные структуры в оболочке ооцитов у различных организмов способствуют защите от различных внешних воздействий, в том числе от механического давления и изменений температуры. Более того, подобные амилоидные агрегаты описаны как структурные элементы куриных ооцитов, а также встречаются в оболочках яиц *D. melanogaster* [144].

Функциональные амилоиды были описаны и в другом царстве живых организмов – растений. Основную функцию, которую они выполняют является запасание питательных веществ в форме белков. Одним из примеров таких амилоидов является белок Вицилин, агрегаты которого запасаются в семенах *Pisum sativum*. В исследовании было показано, что количество агрегатов увеличивается во время созревания семян и снижается при их прорастании. Полученные агрегаты устойчивы к перевариванию ферментами желудочно-кишечного тракта и проявляют токсичность для дрожжей и клеток млекопитающих [12]. Функциональный амилоид SnAMP2 выполняет другую функцию, а именно является амилоидоподобным АМП (антимикробным пептидом). Данный белок был выделен из жидкого эндосперма кокосового ореха *Cocos nucifera*. Агрегаты, полученные в водном буфере обладают такими свойствами амилоидов как связывание с красителями (Конго красный и Тиофлавин Т), а также наблюдаются фибриллы при визуализации с

использованием просвечивающей электронной микроскопии. Однако не существует доказательств, что белок CnAMP2 проявляет свойства АМП в агрегированной форме [55].

3. Патологические амилоиды

На сегодняшний день известно более 30 заболеваний, причиной которых является образование амилоидов. Тип лечения полностью зависит от типа агрегируемого белка и, следовательно, от лежащего в основе патогенеза. К белкам, агрегация которых вызывает развитие амилоидных заболеваний относятся: А β , α -синуклеин, белок tau, β -2-микроглобулин, амилин и многие другие [120].

3.1. Амилоидный пептид β

А β (Амилоидный пептид β) является продуктом ферментативного расщепления трансмембранного домена белка APP под действием ферментов β - и γ -секретаз [138]. На сегодняшний день известно 2 пептида А β , состоящие из 40 и 42 аминокислотных остатков, соответственно. Самым токсичным является олигомеры пептида с 42 аминокислотными остатками [43]. При болезни Альцгеймера происходит накопление агрегатов пептида А β , а также существуют данные о том, что в агрегаты могут включаться различные белки, в том числе и белок tau [32]. Более того, было показано, что белок А β взаимодействует с белком PrP в клетках дрожжей [130]. Обычно симптомы болезни Альцгеймера проявляются в позднем возрасте из-за изменения соотношения ферментов β - и γ -секретаз и накопления патогенной формы белка А β в нейронах [138]. Однако были описаны мутации, которые приводят к повышению вероятности возникновения болезни Альцгеймера в раннем возрасте за счет изменения уровня продукции полноразмерного APP или усиления ферментативной активности γ -секретазы и повышения уровня пептида А β [132]. Для доказательства того, что этот амилоид является прионом были проведены эксперименты, доказывающие инфекционность агрегатов. Инъекция фибрилл, полученных *in vitro*, или гомогената мозга больного животного приводила к усилению амилоидогенеза или индуцированию прионного перехода [101, 106].

3.2. Белок SSA

Белковым детерминантом бокового амиотрофического склероза является белок SAA1 (Serum Amyloid A). Семейство генов *Saa* у человека кодирует 4 белка, один из которых экспрессируется постоянно (SAA4), а другие экспрессируются в зависимости от факторов внешней среды [162]. Уровень SAA1 повышается в ответ на хроническую

бактериальную инфекцию, и в ходе такой инфекции в сыворотке крови могут быть обнаружены амилоидные агрегаты, в большинстве своем состоящие из белка SSA1. Однако с доказательством прионных свойств белка SAA1 возникают некоторые сложности. Несмотря на то, что инъекция фибрилл, полученных от больного животного, ускоряет амилоидогенез в реципиенте, опираясь только на это нельзя сказать, что этот белок обладает инфекционными свойствами из-за того, что сам он не способен к агрегации *de novo* [107].

3.3 Белок tau

Основной функцией белка tau является стабилизация микротрубочек в нейронах. При изучении таких нейродегенеративных заболеваний, как болезнь Альцгеймера и болезнь Паркинсона, было показано, что белок tau включается в состав образующихся агрегатов белков (A β или α -синуклина) или образует отдельные небольшие агрегаты. Эти агрегаты могут переноситься из клетки в клетку и являются инфекционными при введении в мозг. Это было доказано в ходе эксперимента, в котором олигомеры белка tau, выделенные из мозга человека, умершего от болезни Альцгеймера, приводили к возникновению заболевания у мышей [87,100].

3.4 Белок хантингтин

Агрегация белка хантингтина приводит к развитию болезни Хантингтона. Это наследственное заболевание, причиной которого является увеличение количества повторов кода CAG в гене *HTT*, кодирующих аминокислоту глутамин. На настоящий момент времени считается, что белок HTT участвует в транспорте везикул и внутриклеточном транспорте. Кроме того, белок HTT выполняет роль транскрипционного фактора, в частности регулирует транскрипцию гена *BDNF* (белок, закодированный этим геном, отвечает за регуляцию образования нейронов во время нейрогенеза) [15].

В человеческой популяции в белке HTT обычно встречается до 34 а.к. остатков глутамина [88]. Однако при превышении числа повторов эти аминокислотные последовательности принимают другую конформацию, отличную от основной для белка HTT, и образуют токсичные амилоидные агрегаты, накапливающиеся в различных частях нейронов базальных ганглиев и других структур головного мозга [133]. Сначала это приводит к нарушению мелкой моторики, появлению тремора и «танцующей походки», а по мере прогрессирования заболевания нарушаются функции коры головного мозга и атрофируется стриатум, что заканчивается летальным исходом. [159]. На клеточном уровне происходит сразу несколько процессов, которые приводят к гибели нейронов и нарушению работы мозга. Агрегаты как полноразмерного белка HTT, так и его поли-Q

участка могут образовываться как в цитоплазме, так и в ядрах нейронов. В ядрах данные агрегаты секвестрируют на себя другие белки, что приводит к нарушению регуляции транскрипции. В цитоплазме клетки данные агрегаты вовлекают в себя другие белки клетки, а также уменьшается количество растворимого белка НТТ. Образование агрегатов в цитоплазме приводит к нарушению аксонального транспорта в нейронах и разрушению синапсов, что, в свою очередь, приводит к развитию болезни Хантингтона [15].

4. Методы идентификации амилоидов

4.1. Экспериментальные методы

4.1.1 Системы протеомных скринингов

Биохимические методы идентификации амилоидов основаны на их биохимических свойствах. Изначально в XX веке существовали методы, основанные на детектировании связывания с Тиофлавином Т или S, устойчивости к протеазам и детергентам, которые позволяли определить амилоидогенность одного конкретного белка. До недавнего времени экспериментальные методы выявления амилоидогенных белков в масштабах целых протеомов отсутствовали. Однако недавно были разработаны два метода, один из которых впоследствии был усовершенствован: TAPI (*Technique for Amyloid Purification and Identification* – протокол для очистки и идентификации амилоидов) и PSIA (*Proteomic Screening and Identification of Amyloids* – Протеомный анализ и идентификация амилоидов). В основу обоих легла устойчивость амилоидов к денатурирующим агентам (SDS, саркозилат) [3]. В первом методе, TAPI, для идентификации амилоидов проводится следующие манипуляции. На первом этапе производится разрушение клеток, затем полученный раствор центрифугируют в градиенте 40% сахарозы. В результате этих манипуляций происходит разделение клеточных белков, и в осадочной фракции оказываются белки, входящие в состав амилоидных фибрилл. Полученная фракция отбирается и нагревается до 37°C в 2%-м растворе SDS для разрушения неамилоидных белковых образований. Затем на SDD-PAGE происходит разделение устойчивых амилоидных агрегатов и растворимых белковых молекул. Белковые агрегаты плохо входят в полиакриламидный гель и остаются в его верхней части, откуда их вырезают и подвергают трипсинолизу для разделения на более мелкие фрагменты. Затем полученные белки идентифицируют при помощи тандемной масс-спектрометрии [82]. В методе PSIA для разделения используется методика двухмерного полиакриламидного электрофореза, которая позволяет производить сравнение молекулярного состава двух образцов с высокой точностью. Перед нанесением на гель белки из каждой пробы помечают

флуорохромом, специфичным для каждой пробы. После чего белковые фракции разделяют с помощью двумерного электрофореза. Затем фракция детергент устойчивых белков вырезается из геля, белки, содержащиеся в ней, подвергаются трипсинолизу и определению при помощи тандемной масс-спектрометрии [109]. Последний метод был модифицирован для повышения точности предсказаний. Параллельно с идентификацией с использованием двухмерного электрофореза в полиакриламидном геле осуществляется анализ с использованием жидкостной хроматографии. Для этого смесь высокомолекулярных белковых агрегатов растворяют и обрабатывают трипсином. Затем отдельные пептиды разделяют путем жидкостной хроматографии и анализируют с использованием масс-спектрометрии [1]. Важно отметить, что белки, выявляемые данными методами, являются всего лишь кандидатами на роль амилоидов, и для доказательства их амилоидных свойств требуются дополнительные экспериментальные подтверждения. К таким методам можно отнести проверку на образование SDS-устойчивых агрегатов в системах *in vivo* и *in vitro*, а также проверка связывания с амилоид-специфическими красителями, такими как Тиофлавин S или Конго красный.

4.1.2. Система C-DAG

Данная экспериментальная система была предложена в 2013 году. За основу этой системы был взят известный функциональный амилоид бактерий *E. coli*, относящийся к группе белков Curli. N-терминальная последовательность белка CsgA является сигнальной и участвует в экспорте белков на поверхность клетки. Присоединение этой сигнальной последовательности к N-концу исследуемого белка приводит к тому, что данный белок экспортируется на поверхность клетки бактерии, где уже будет происходить сборка амилоидных фибрилл. Большое количество методов, которыми можно подтвердить амилоидную природу образующихся фибрилл (определение по фенотипу колоний связывание с красителем Конго красным, визуализирование фибрилл с использованием ТЭМ и анализ двойного лучепреломления), делает этот метод очень хорошим для проведения массовых скринингов потенциально амилоидогенных белков (рис. 1).

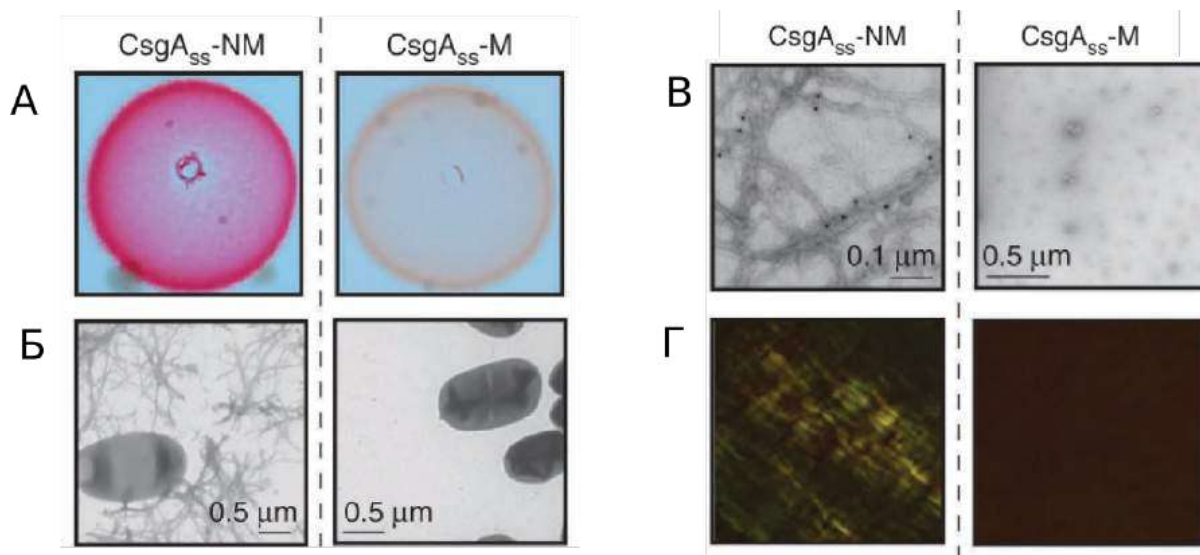


Рисунок 1 — Система C-DAG. **А.** При выращивании на среде с Конго красным колонии бактерий, которые продуцируют CsgAss-NM, окрашиваются в красный цвет. **Б.** Секреция CsgAss-NM приводит к появлению фибриллярных агрегатов, которые могут быть визуализированы с помощью электронной микроскопии. **В.** Фибриллярные агрегаты, образованные белком CsgAss-NM, могут быть выявлены при помощи ТЭМ после связывания с мечеными антителами к белку Sup35. **Г.** При сверхпродукции белка CsgAss-NM фибриллярные агрегаты и дают яблочно-зеленое свечение в результате двойного лучепреломления в поляризованном свете (по [146]).

4.1.3. Дрожжевые системы

Для изучения амилоидных свойств белков, которые описываются как потенциальные амилоиды в результате биоинформатических скринингов, можно использовать клетки дрожжей *S. cerevisiae*. Для таких проверок используются конструкции, которые позволяют сверхпродуцировать интересующие белки, сшитые с флуоресцентными белками в клетках дрожжей. Детекция агрегатов может осуществляться с использованием флуоресцентной микроскопии (наличие фокусов свечения может свидетельствовать о наличии амилоидных свойств). Другое свойство амилоидов, которое проверяется в таких системах, это устойчивость к детергентам, таким как SDS. Для этого проводится проверки с использованием методики SDD-AGE для выявления устойчивых агрегатов [25, 6, 124].

Способность белка Sup35 образовывать агрегаты в клетках дрожжей может быть использована для проверки белков, амилоидогенность которых предсказана при помощи различных алгоритмов. Ранее было показано, что сверхпродукция химерного белка, состоящего из амилоидогенного белка человека и прионного домена дрожжевого белка Sup35, приводит к агрегации мономерного белка Sup35 и появлению фактора $[PSI^+]$ в клетках дрожжей в отсутствие предсуществующих прионов, таких как $[PIN^+]$, которые могут служить матрицей для агрегации белка Sup35. В качестве положительного контроля в дрожжевой тест-системе используется конструкция, содержащая прионогенный домен

Sup35, слитый с пептидом A β [25]. В случае если белок интереса амилоидогенен, в дрожжевой клетке происходит появление приона [*PSI*⁺] (рис. 2). Предполагается, что в результате образования амилоидных агрегатов белка интереса происходит агрегация прионогенных доменов мономерного белка Sup35 в клетке. При индукции приона [*PSI*⁺] будет наблюдаться рост клеток на средах, не содержащих аденин, и они будут белыми на среде 1/4 YEPD, а после многократного пересевания на среде YEPD с ГГХ потеряют прионный фенотип. В данной системе используется преждевременный стоп-кодон в гене Ade1. В клетках, не несущих приона [*PSI*⁺], не происходит прочтение преждевременно возникшего стоп-кодона, и как следствие не происходит синтеза функционального фермента. Это приводит к накоплению красного пигмента в клетках в случае выращивания клеток на среде 1/4 YEPD и отсутствию роста клеток на среде без аденина. Эта система для проверки была предложена Юрием Олеговичем Черновым [25].

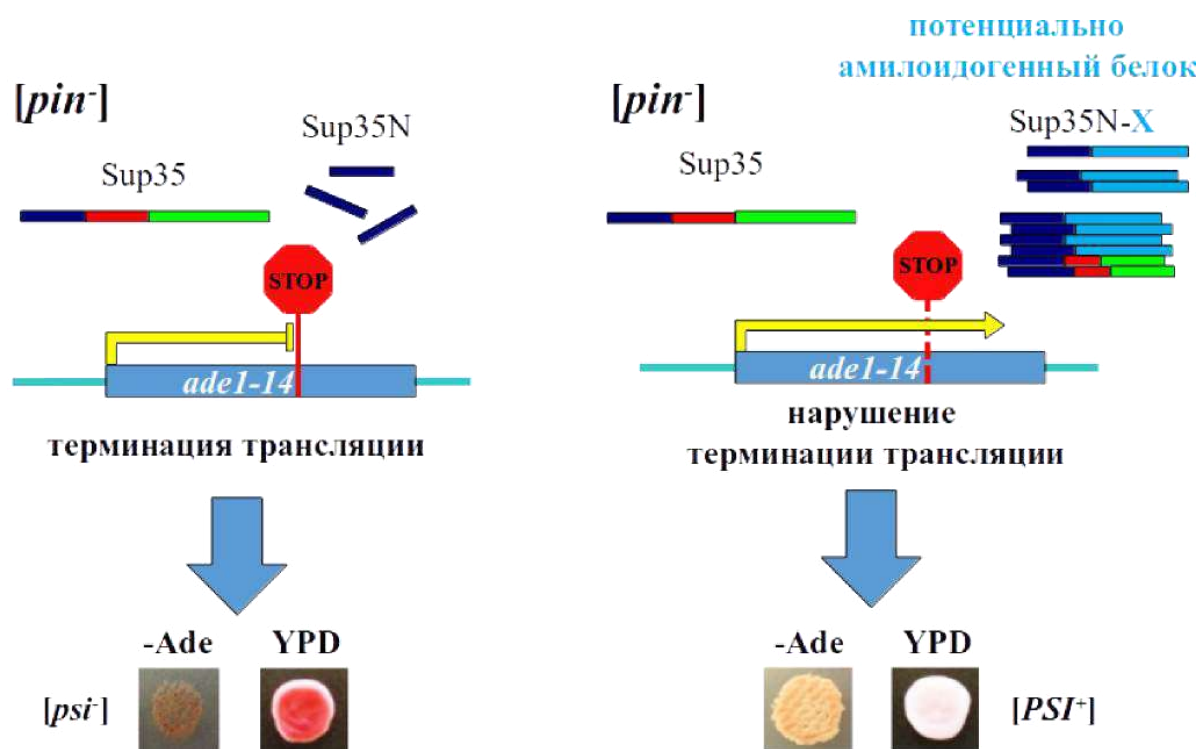


Рисунок 2 — Дрожжевая тест-система. В случае потенциально амилоидогенного белка слитым с N-доменом белка Sup35 происходит образование агрегатов белка, которое индуцирует агрегацию белка Sup35, что приводит к возникновению приона [*PSI*⁺]. Рисунок предоставлен А.А.Зелинским, личное сообщение.

Другой вариант системы, которая использует свойство дрожжевого белка Sup35 образовывать амилоидные агрегаты, была предложена Вон Дер Хааром в 2007 году. Метод основан на замене N-терминального домена белка Sup35, который необходим для образования приона [*PSI*⁺], на потенциальный амилоидный белок. Используя такую систему, можно детектировать образование приона с использованием

стандартных селективных сред для дрожжей *S. cerevisiae* [158]. Важным достоинством такой системы является то, что анализ амилоидных свойств проводится без белка Sup35 дикого типа, который может, хоть и с низкой частотой, спонтанно агрегировать и давать ложно положительный результат. Однако общим недостатком таких методов можно назвать то, что происходит сверхпродукция исследуемого белка, что повышает вероятность образования агрегатов. Стоит отметить, что мы сверхпродуцируем человеческие белки в клетках другого организма, и отсутствие каких-либо посттрансляционных модификаций и систем шаперонов может приводить как к ложноположительному, так и к ложноотрицательному результату.

5. Семейство белков нуклеопоринов

5.1. Характеристика белков нуклеопоринов

Нуклеопорины представляют собой обширное семейство белков, в котором известно более 3000 белков у млекопитающих [40]. Эти белки образуют структуру, которая называется ядерной порой (рис. 3). Данная пора представляет собой симметричную структуру, в которой содержится 8 одинаковых компонентов [9]. При исследовании ядерной поры с использованием криоэлектронной микроскопии исследователи выделяют 3 части: (i) ядерная корзинка, (ii) цитоплазматическое кольцо и (iii) центральный каркас поры (рис. 3, [41]). Стоит отметить, что каждая ядерная пора представляет собой уникальный набор различных белков нуклеопоринов и отвечает за транспорт определенных молекул внутри клетки. Белки в составе поры образуют различные субкомплексы, которые возникают на основе биохимического средства различных белков [78].

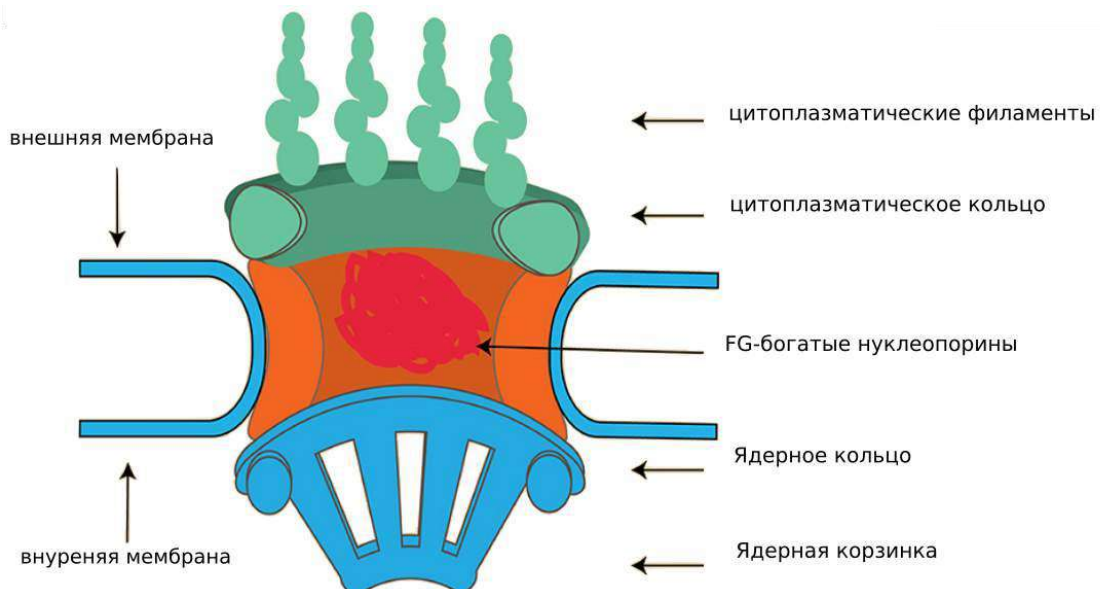


Рисунок 3 — Устройство ядерной поры эукариот. По [78]

В зависимости от расположения нуклеопоринов в ядерной поре белки могут содержать различные типы структурных доменов. У белков встречаются α -спирали, β -листы, а также особые структурные единицы – фенилаланин-глицин-повторы (FG-повторы) [63]. Около трети белков нуклеопоринов содержат такие FG-повторы. Такими структурными элементами обогащены последовательности нуклеопоринов, которые находятся в средней части ядерной корзинки. Предполагается, что данные нуклеопорины, имея неупорядоченную структуру, образуют в центре ядерной поры гель, который выступает в роли селективного фильтра. Более того, FG-повторы играют важную роль в распознавании молекул для транспортировки и связывания с ним [68, 78]. Структура ядерного порового комплекса является высоко консервативной. Исследование, проведенное на дрожжах в сравнении с остальными эукариотами, показало сходство в локализации и функции белков нуклеопоринов. Однако не было показано, что аминокислотная последовательность данных белков достаточно консервативна [78]. Из-за того, что различные нуклеопорины могут экспрессироваться в разных тканях, мутации в них могут приводить к различным нарушениям в развитии систем органов или даже целого организма [78]. К функциям нуклеопоринов также можно отнести регуляцию транскрипции, как опосредованную через регуляцию транспорта транскрипционных факторов в ядро, так и через взаимодействие с хроматином, прилегающим к внутренней мембране ядра возле ядерных пор [91, 164]. Сложная система взаимодействия между нуклеопоринами, сигнальными белками и мишенями для транспорта участвует в регулировке дифференцировки клеток и поддержание их функций [78, 165].

Белок NUP58

Белок человека NUP58 является белком средней части ядерной поры и содержит большое количество FG-повторов [78]. В ядерной поре данный белок функционирует в виде тетрамера за счет своего С-конца [80]. Через участки, обогащенные FG-повторами, происходит взаимодействие с другими белками, участвующими в транспорте через ядерную пору, в частности с партнерами по комплексу (белки NUP54 и NUP62), а также с импортином- β и Кариферин β -1 [94]. Белок NUP58 образует гомотетрамеры или гетеротетрамер с белком NUP54 в центральном канале поры. В самом белке NUP58 можно выделить участок с α -спиралями (239-415 а.к.), который фланкирован неструктурированными участками, обогащенными FG-повторами [80]. Комплекс из белков NUP54 и NUP58 взаимодействует с белком NUP62. Образовавшийся комплекс из трех белков, который заякоривается в клеточной мембране [141]. В цикле "открытия-

закрытия" ядерной поры белки NUP54 и NUP58 играют ключевую роль. А именно, димер состоящий из белка NUP58 сдвигается относительно другого такого же димера и происходит открывание канала ядерной поры [141]. Стоит отметить, что участки, обогащенные FG-повторами, также принимают участие в ядерно-цитоплазматическом транспорте. Было показано, что с этими участками происходит связывание белков импортинов и осуществление транспорта в ядро и из ядра молекул, которые несут импортины [80]. Другой функцией белка NUP58 является взаимодействие с веретеном деления и центросомами в процессе митоза. Было показано, что уменьшение количества белка NUP58 приводит к аномальному образованию центросом и нарушениям в анафазе митоза [61].

5.2 Амилоидные свойства нуклеопоринов

Важной функцией барьерных нуклеопоринов, как базовых составляющих комплекса ядерной поры, является обеспечение селективного обмена макромолекулами между ядром и цитоплазмой. Реализация данной комплексной задачи достигается ввиду особенностей аминокислотной последовательности этих белков. Первичная структура барьерных нуклеопоринов характеризуется наличием обширных внутренне неупорядоченных областей FG-повторов, сменяющихся сегментами, обогащенными глутамином и аспарагином (Q/N) [33]. Тем не менее, рассматриваемые особенности обнаружены в том числе и в структуре дрожжевых инфекционных амилоидов. В данном случае, наличие таких областей способствует внутренней реорганизации и формированию стабильного β -складчатого конформера, который в последствии образует амилоидную фибриллу [157]. Другими словами, одни и те же структурные особенности принимают участие в функционировании комплекса ядерной поры наряду с формированием амилоидных фибрилл.

В условиях *in vitro* многие FG-нуклеопорины в определенной концентрации образуют гидрогели, фактически воспроизводя структуру барьера проницаемости комплекса ядерной поры [49, 105]. Подобное фазовое разделение обусловлено амилоидоподобными взаимодействиями между нуклеопоринами. На основании этого можно делать предположения о том, что агрегация нуклеопоринов может участвовать в регуляции транспорта. Известно, что порядка 200 белков дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* в своей аминокислотной последовательности имеют схожие фрагменты с амилоидными белками [10, 103]. Для большинства нуклеопоринов дрожжей были показаны амилоидные свойства, такие как образование детергент устойчивых агрегатов [10]. Среди них встречаются барьерные нуклеопорины, обогащенные FG- и Q/N-

областями, а также белки, содержащие ароматические и гидрофобные аминокислотные остатки (рис. 4) [59]. Взаимодействия гидрофобного характера между мотивами FG крайне важны и необходимы для создания селективного по размеру барьера диффузии белков в комплексе ядерной поры [118].

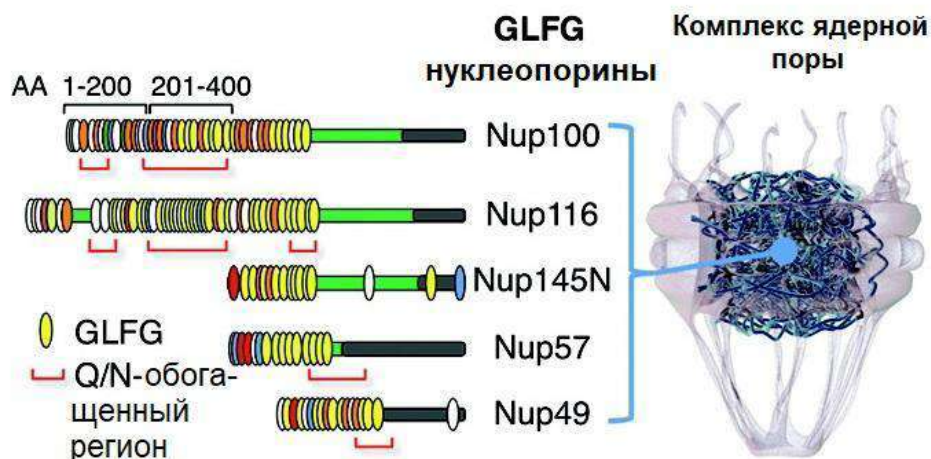


Рисунок 4 – Схема комплекса ядерной поры и внутренне неупорядоченных GLFG-нуклеопоринов, составляющих его центральную область.

В ходе экспериментальных проверок было показано, что слитая с флуоресцентным белком Q/N-обогащенная область FG-нуклеопорина Nup100 *S. cerevisiae*, а именно – аминокислоты (с 201-ой по 400-ую), при сверхэкспрессии в клетках дрожжей дикого типа образует фокусы свечения. Формирование подобных фокусов приводит к нарушению локализации прочих FG-нуклеопоринов, в результате чего они обнаруживаются в зоне точек свечения, а не в области ядерной поры [59].

В дополнение к этому, фрагмент Nup100, который имеет наибольшее сходство с дрожжевыми прионами, проверен на способность образовывать агрегаты в условиях *in vitro*. Установлено, что аминокислотная последовательность с 300-ой по 400-ую имеет семь FG-повторов и на 38% состоит из остатков Q и N. Было показано, что данный фрагмент может образовывать фибриллы *in vitro*. Даже в случае добавления агрегатов Nup100₃₀₀₋₄₀₀ к раствору фрагмента белка случае полного отсутствия предшествующих фибрилл обнаруживается значительная по продолжительности лаг-фаза. При добавлении Nup100₂₀₁₋₄₀₀ в условиях *in vivo* отмечается явная зависимость от наличия предшествующего фактора [*PIN*⁺]. Полученные агрегаты обнаруживали флуоресцентное свечение при взаимодействии с Тиофлавином Т, а также характерную для амилоидов морфологию при электронной микроскопии.

Необходимо отметить, что к агрегации способны не только отдельные участки нуклеопорина Nup100. Например, сверхэкспрессированный в дрожжевых клетках

полноразмерный белок, слитый с GFP, демонстрировал многочисленные фокusy флуоресценции. Выделенные агрегаты были устойчивыми к обработке SDS, а также индуцировали изменения структуры растворимого Nup100 на амилоидоподобную [59].

К дрожжевым амилоидам можно отнести большую часть нуклеопоринов дрожжей, в том числе и белок Nsp1 [10]. Для данного белка были проведены исследования, которые показали, что он может образовывать гидрогели [4]. Согласно данным двумерного ЯМР-спектра подвижные сегменты не имеют постоянной структуры [71]. В ходе проведенных исследований было показано, что в случае гидрогелей, образованных белком Nsp1, наблюдается взаимодействие между остатками фенилаланина. Вероятнее всего, подобные гидрофобные взаимодействия необходимы для гелеобразования, поскольку мутантные FG-домены без гидрофобных остатков не образуют гидрогелей [49]. Кроме того, для фрагментов, обогащенных NQTS аминокислотными остатками было показано преобладание β -складчатой структуры [161].

Согласно другим проведенным экспериментам для фрагмента нуклеопорина Nsp1₂₋₂₇₇ можно предполагать образование межмолекулярных β -листов, которые выступают основным структурным элементом гидрогеля [4]. В том числе известно, что FG/FxFG-домен белка Nsp1 образует гидрогель со свойствами проницаемости, которые по своей природе схожи с барьером комплекса ядерной поры [49]. Важно отметить, что межпочечные β -листы характерны также и для амилоидных фибрилл [27]. В более ранних исследованиях некоторые нуклеопорины были охарактеризованы в качестве Q/N-богатых [103] и связанных с такими амилоидными белками, как хантингтин и его варианты или фактор терминации трансляции Sup35 [34].

Примером амилоидообразующего Q/N-богатого домена являются остатки со 2-го по 41-ую дрожжевого белка Sup35 [83]. По данным двумерной ЯМР-спектроскопии белка Nsp1 установлено, что FG-повторы с Q/N-обогащенными вставками взаимодействуют через межмолекулярные β -листы аналогично тому, как это происходит в отдельных молекулах белка Sup35 [4]. На основании подобного сходства оказываются возможными взаимодействия доменов Nsp1 и Sup35. Данный факт получил подтверждение посредством изучения гидрогелей из N-концевого (FG_{2-175}^{Nsp1}) или полного FG/FxFG домена Nsp1 ($FG / FxFG_{2-601}^{Nsp1}$) и флуоресцентно меченого Sup35₂₋₁₄₀. В ходе эксперимента уровень флуоресценции внутри FG-гидрогеля увеличился в 100 раз. Такие результаты позволяют констатировать факт, что белки, обогащенные FG-повторами могут взаимодействовать с фрагментами белка Sup35₂₋₁₄₀. На основании этого можно выдвинуть предположение, что белки богатые FG-повторами могут входить в состав комплексных агрегатов известных амилоидов.

5.3 Влияние агрегации белков на ядерно-цитоплазматический транспорт

Одной из характерных черт нейродегенеративных заболеваний является накопление агрегатов белков. Вследствие образования подобных агрегатов в том числе происходят каскадные нарушения функционирования высоко консервативного механизма ядерно-цитоплазматического транспорта в клетке. [19]. Как известно, процесс обмена молекулами между ядром и цитоплазмой является необходимым для нормального функционирования клетки. Для долгоживущих клеток, например, нейронов, данный процесс представляет особую важность. Это обусловлено тем, что белки, ассоциированные с поддержкой и репарацией ДНК, попадают в ядерные структуры постмитотических неделящихся клеткок именно посредством механизма ядерно-цитоплазматического транспорта [110]. В случае развития нейродегенеративных процессов происходит повреждение комплекса ядерной поры накапливающимися белковыми агрегатами, что может приводит к гибели клетки [28]. Помимо этого, белковые и РНК-агрегаты могут оказывать влияние на работу некоторых нуклеопоринов [57]. В медицинской диагностике фибриллы белков являются характерными биомаркерами прогрессирования различных нейродегенеративных патологий: бокового амиотрофического склероза, фронтотемпоральной деменции, болезни Альцгеймера, болезни Хантингтона, а также болезни Паркинсона [154]. Например, в современной медицинской практике боковой амиотрофический склероз принято рассматривать как нейродегенеративное заболевание с летальным исходом. Патогенез заболевания характеризуется потерей двигательных нейронов в головном и спинном мозге [153]. У пациентов с прогрессирующим боковым амиотрофическим склерозом наблюдаются поведенческие и когнитивные нарушения, обусловленные атрофией фронтотемпоральной коры [151]. Подобную симптоматику зачастую диагностируют как фронтотемпоральную деменцию. Сложность в постановке точного диагноза провоцирует необходимость рассмотрения симптомов, характерных для перечисленных выше заболеваний, в совокупности для определения общей клинической картины.

Согласно данным ряда исследований, у большинства пациентов с боковым амиотрофическим склерозом обнаруживается амилоидогенный белок TDP-43, который характеризуется измененной субклеточной локализацией и частично исчезает из ядра в нейронах и глиальных клетках [95]. Известно, что ядерный РНК-связывающий белок TDP-43 кодируется геном *TARDBP*. Кроме ядерных функций, TDP-43 принимает участие в процессах, протекающих в цитоплазме: например, поддерживает стабильность, обеспечивает транспорт и трансляцию мРНК [18]. Иначе говоря, наличие этого белка,

свободно перемещающегося через комплекс ядерной поры, является необходимым для нормального функционирования нейронов. С другой стороны, данный белок подвергается фазовому разделению в клеточном цитозоле на моделях *in vivo* после сверхэкспрессии или воздействия амилоидоподобных фибрилл TDP-43 [51]. Капли цитозольного TDP-43 рекрутируют импортин- α и Nup62, провоцируют неверную локализацию белков RanGAP1, Ran и Nup107, что способствует ингибированию процесса ядерно-цитоплазматического транспорта.

Другим примером нарушения ядерно-цитоплазматического транспорта является болезнь Хантингтона. Развитие заболевания вызвано экспансией тринуклеотидного повтора CAG в гене *HTT*, который кодирует белок хантингтин. Для пациентов-носителей мутации характерно образование аномально длинных полиглутаминовых последовательностей в структуре хантингтина, что в совокупности влияет на токсическое усиление функции и агрегацию белка и в конечном итоге приводит к гибели нейронов [15]. Косвенный механизм вмешательства *HTT* в работу комплекса ядерной поры подтверждается наличием белка нуклеопорина GLE1 среди прочих белков, секвестрированных полиглутаминовыми образованиями при болезни Хантингтона [52]. При моделировании заболевания в условиях *in vivo* несколько важных для ядерно-цитоплазматического транспорта белков, в том числе RanGAP1, Nup62 и Nup88, образуют внутриядерные включения, которые колокализуются с агрегатами *HTT* в нейронах полосатого тела и коры головного мозга [57].

Таким образом, на сегодняшний день данные медицинской диагностики указывают на взаимосвязь образования агрегатов в клетках нервной ткани и наличия структурно-функциональных повреждений комплекса ядерной поры. Тем не менее, по-прежнему остается неясной функциональная роль нарушения ядерно-цитоплазматического транспорта в возникновении и прогрессировании нейродегенеративных заболеваний. С одной стороны, дисфункция ядерно-цитоплазматического транспорта может лежать в основе общего патогенетического механизма, который предшествует прогрессированию нейродегенеративных заболеваний. С другой, данное нарушение может возникать уже вследствие функционирования специфических патологических агрегатов при неврологических расстройствах различной этиологии. По этой причине, открывается широкое поле для более детального изучения механизма взаимосвязи дисфункции ядерно-цитоплазматического транспорта и образования белковых агрегатов на различных моделях патологических состояний.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Штаммы и плазмиды

Штаммы *S. cerevisiae*, использованные в работе, перечислены в Таблице 2.

Таблица 2* — Штаммы дрожжей *S. cerevisiae*, использованные в работе

Штамм	Генотип штамма	Источник
2-74-D694	<i>MAT a ade1-14(UGA) trp1-289(UAG) ura3-52 his3-200</i> <i>leu2-3, 122 [psi⁻] [pin⁻]</i>	[35]
74-D694	<i>MAT a ade1-14(UGA) trp1-289(UAG) ura3-52 his3-200</i> <i>leu2-3, 122 [psi⁻] [PIN⁺]</i>	[35]
OT56	<i>MAT a ade1-14(UGA) trp1-289(UAG) ura3-52 his3-200</i> <i>leu2-3,112 [PSI⁺]^S [PIN⁺]</i>	[35]
1-OT56	<i>MATa ade1-14(UGA) trp1-289(UAG) ura3-52 his3-200</i> <i>leu2-3,112 [psi⁻] [PIN⁺]</i>	[98]
2-OT56	<i>MATa ade1-14 trp1-289 his3-Δ200 leu2-3,112 ura3-52</i> <i>[psi⁻] [pin⁻]</i>	[98]
OT56-NLS-GFP	<i>MAT a ade1-14(UGA) trp1-289(UAG) ura3-52 his3-200</i> <i>leu2-3,112 [psi⁻] [PIN⁺]</i>	предоставле н А.Г. Матвеевко
1-OT56-NLS-GFP	<i>MAT a ade1-14(UGA) trp1-289(UAG) ura3-52 his3-200</i> <i>leu2-3,112 [psi⁻] [pin⁻]</i>	Получен в этой работе

*Для обозначения локусов спаривания и мутаций использованы стандартные обозначения. Аллели локуса спаривания обозначаются *MAT a* и *MAT α*. Мутантные аллели *ade1-14* и *lys2-87* содержат преждевременный стоп-кодон *UGA* [2], а аллель *trp1-289* — *UAG* [24]. Данные мутации приводят к ауксотрофности штаммов (отсутствию роста) на средах, не содержащих аденин, триптофан и лизин, соответственно.

Таблица 3 — Штаммы бактерий *E. coli*, использованные в работе

Штамм	Генотип штамма	Применение в работе	Источник
DH5 α	<i>supE44</i> Δ <i>lacU169</i> (ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i>) <i>hsdR17</i> <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>gyrA96</i> <i>thi-1</i> <i>relA1</i>	Наработка плазмид и рутинная бактериальная трансформация	[131]
DB3.1	F- <i>gyrA462</i> <i>endA1</i> <i>glnV44</i> Δ (<i>sr1- recA</i>) <i>mcrB</i> <i>mrr</i> <i>hsdS20</i> (<i>rB-</i> , <i>mB-</i>) <i>ara14</i> <i>galK2</i> <i>lacY1</i> <i>proA2</i> <i>rpsL20</i> (<i>Smr</i>) <i>xyl5</i> Δ <i>leu</i> <i>mtl1</i>	Наработка плазмид с сcdB кассетой	Thermo Scientific
BL21(DE3)	F- <i>ompT</i> <i>gal</i> <i>dcm</i> <i>lon</i> <i>hsdSB</i> (<i>rB-</i> <i>mB-</i>) λ (DE3 [<i>lacI</i> <i>lacUV5-T7</i> <i>gene1</i> <i>ind1</i> <i>sam7</i> <i>nin5</i>])	Наработка рекомбинантных белков	[149]
VS39	F- [<i>araD139</i>]B/ <i>r</i> Δ (<i>argF-lac</i>)169 λ - <i>e14-</i> <i>flhD5301</i> Δ (<i>fruK- yeiR</i>)725(<i>fruA25</i>) <i>relA1</i> <i>rpsL150</i> (<i>strR</i>) <i>rbsR22</i> Δ (<i>fimB- fimE</i>)632(<i>::IS1</i>) <i>deoC1</i> Δ (<i>csgBAC</i>)(<i>::kanR</i>)	Проведение экспериментов в системе C-DAG	[146]

Плазмиды, использованные в работе, перечислены в Таблице 4.

Таблица 4 — Плазмиды, использованные в работе.

Название плазмиды	Маркеры	Источник
pDONR221-NUP58	<i>KanR</i>	ThermoFisher(Scientific) Ultimate ORF Clone
pDONR221-ccdB	<i>KanR</i>	ThermoFisher(Scientific) #12536017

pDONR221-NUP58-1-213	<i>KanR</i>	[30]
pVS105	<i>AmpR</i>	[146]
pVS72	<i>AmpR</i>	[146]
pVS-GW-Sup35M	<i>AmpR</i>	[30]
pVS-GW-Sup35NM	<i>AmpR</i>	[30]
pVS-GW-ccdB	<i>AmpR</i>	[30]
pVS-GW-NUP58	<i>AmpR</i>	[30]
pVS-GW-NUP58-1-213	<i>AmpR</i>	[30]
pDONR221-NUP58-1-95	<i>KanR</i>	Получена в этой работе
pDONR221-NUP58-215-599	<i>KanR</i>	Получена в этой работе
pVS-GW-NUP58-215-599	<i>AmpR</i>	Получена в этой работе
pVS-GW-NUP58-1-95	<i>AmpR</i>	Получена в этой работе
pAG416GPD-EGFP-NUP58-1-95	<i>AmpR, URA3</i>	Получена в этой работе
pAG416GPD-EGFP-NUP58-215-599	<i>AmpR, URA3</i>	Получена в этой работе
pAG416GPD-EGFP-ccdB	<i>AmpR, CmR, URA3</i>	Предоставлена С. Линдквист (Addgene plasmid # 14316)
pAG416GPD-EGFP-NUP58	<i>AmpR, URA3</i>	Получена в этой работе
pDEST527-ccdB	<i>AmpR</i>	Предоставлена Д. Эспосито (Addgene plasmid # 11518)
pDEST527-His ₆ -NUP58	<i>AmpR</i>	[30]
pVSGW-NSP1-1-136	<i>AmpR</i>	[31]
pVSGW-Nup145-1-152	<i>AmpR</i>	[31]

pVSGW-hs-Nup62-1-175	<i>AmpR</i>	[31]
pVSGW-dm-Nup62-1-175	<i>AmpR</i>	[31]
pVSGW-tg-Nup58-60-320	<i>AmpR</i>	[31]
pVSGW-sp-Nup45-1-220	<i>AmpR</i>	[31]
pVSGW-Nup100-1-400	<i>AmpR</i>	[31]
pVSGW-dm-Nup98-250-500	<i>AmpR</i>	[31]
pVSGW-sp-Nup98-250-500	<i>AmpR</i>	[31]
pVSGW-hs-Nup98-250-500	<i>AmpR</i>	[31]
pDONR221-NSP1-1-136	<i>KanR</i>	[31]
pDONR221-Nup145-1-152	<i>KanR</i>	[31]
pDONR221-hs-Nup62-1-175	<i>KanR</i>	[31]
pDONR221-dm-Nup62-1-175	<i>KanR</i>	[31]
pDONR221-tg-Nup58-60-320	<i>KanR</i>	[31]
pDONR221-sp-Nup45-1-220	<i>KanR</i>	[31]
pDONR221-Nup100-1-400	<i>KanR</i>	[31]
pDONR221-dm-Nup98-250-500	<i>KanR</i>	[31]
pDONR221-sp-Nup98-250-500	<i>KanR</i>	[31]
pDONR221-hs-Nup98-250-500	<i>KanR</i>	[31]
pAG416GPD-EGFP-NSP1-1-136	<i>AmpR, URA3</i>	Получена в этой работе
pAG416GPD-EGFP-Nup145-1-152	<i>AmpR, URA3</i>	Получена в этой работе
pAG416GPD-EGFP-hs-Nup62-1-175	<i>AmpR, URA3</i>	Получена в этой работе

pAG416GPD-EGFP-dm-Nup62-1-175	<i>AmpR, URA3</i>	Получена в этой работе
pAG416GPD-EGFP-tg-Nup58-60-320	<i>AmpR, URA3</i>	Получена в этой работе
pAG416GPD-EGFP-sp-Nup45-1-220	<i>AmpR, URA3</i>	Получена в этой работе
pAG416GPD-EGFP-Nup100-1-400	<i>AmpR, URA3</i>	Получена в этой работе
pAG416GPD-EGFP-dm-Nup98-250-500	<i>AmpR, URA3</i>	Получена в этой работе
pAG416GPD-EGFP-sp-Nup98-250-500	<i>AmpR, URA3</i>	Получена в этой работе
pAG416GPD-EGFP-hs-Nup98-250-500	<i>AmpR, URA3</i>	Получена в этой работе
pAG415GPD-ccdB-Cerulean	<i>AmpR, LEU2</i>	Предоставлена С. Линдквист (Addgene plasmid # 14386)
pAG415GPD-Cerulean-dm-Nup62-1-175	<i>AmpR, LEU2</i>	Получена в этой работе
pAG415GPD-Cerulean-NSP1-1-136	<i>AmpR, LEU2</i>	Получена в этой работе
pAG415GPD-Cerulean-Nup145-1-152	<i>AmpR, LEU2</i>	Получена в этой работе
pAG415GPD-Cerulean-tg-Nup58-60-320	<i>AmpR, LEU2</i>	Получена в этой работе
pAG415GPD-Cerulean-dm-Nup98-250-500	<i>AmpR, LEU2</i>	Получена в этой работе
pAG415GPD-Cerulean-sp-Nup98-250-500	<i>AmpR, LEU2</i>	Получена в этой работе

Плазмиды серии pDONR221 (за исключением плазмиды с геном NUP58) были сконструированы следующим образом. Продукт, полученный в ходе ПЦР реакций, клонировали в вектор pDONR221-ccdB (праймеры указаны в Таблице 5) в ходе реакции BP клонирования. Плазмиды серий pVS-GW, pAG416GPD-EGFP и pAG415GPD-Cerulean были получены в результате проведения LR реакции и рекомбинации с плазмидами серии pDONR221.

2.2 Среда и условия культивирования

Для выращивания клеток дрожжей в неселективных условиях мы использовали полную среду YEPD [72]. Для проведения экспериментов по выращиванию культур и трансформантов, а также проверки фенотипа с использованием селективных маркеров использовали синтетическую среду SC на основе YNB [72]. Полная среда SC содержала добавки в следующих концентрациях: 20 мг/л сульфата аденина (для твёрдой) или 40 мг/л мг/л (для жидкой), 20 мг/л L-гистидина, 20 мг/л L-лизина, 60 мг/л L-лейцина, 20 мг/л L-метионина, 150 мг/л L-треонина, 20 мг/л L-триптофана, 20 мг/л урацила.

Все клетки *S. cerevisiae* мы выращивали при температуре 30°C и в случае выращивания в жидкой среде перемешивание осуществляли со скоростью 200 об/мин [72].

При проведении экспериментов, в которых была необходима оценка оптической плотности культуры, мы использовали планшетный фотометр iMark (BioRad) со светофильтром. Оптическую плотность дрожжевой культуры фиксировали при аналитической длине волны 595 нм. Измерения проводили в объёме 200 мкл, в качестве контрольной жидкости мы брали среду, аналогичную той, в которой выращивали клетки.

Для выращивания клеток *E. coli* мы использовали среду LB: жидкую – для наработки плазмид, твёрдую – для посева трансформантов и поддержания бактериальных штаммов, соответственно [131]. Для выращивания клеток *E. coli*, содержащих плазмиды, или отбора трансформантов мы добавляли антибиотики в среду LB: 100 мг/л ампициллина или 50 мг/л канамицина. Все клетки *E. coli* мы выращивали при температуре 37°C, при постоянном перемешивании со скоростью 250-300 об/мин (в случае выращивания клеток в жидкой среде). Для проведения экспериментов в системе C-DAG использовали твёрдую среду LB со следующими добавками: L-арабиноза (0,2% (w/v)), IPTG (0,1 мМ), краситель Конго красный (10 мкг/мл), а также ампициллин (200 мг/л) и хлорамфеникол (50 мг/л).

Для проведения экспериментов в системе C-DAG (Curli-dependent amyloid generator) мы трансформировали клетки *E. coli* штамма VS39 целевыми плазмидами и выращивали ночную культуру в среде LB с добавлением ампициллина и хлорамфеникола при температуре 37°C. Полученные культуры мы высевали на серию чашек:

- экспериментальную чашку (L-арабиноза (0,2% (w/v)), IPTG (0,1 мМ), краситель Конго красный (10 мкг/мл), ампициллин (200 мг/л) и хлорамфеникол (50 мг/л)),
- чашку с индукторами (L-арабиноза (0,2% (v/w)), IPTG (0.1 М), ампициллин (200 мг/л) и хлорамфеникол (50 мг/л)),
- контрольную чашку, которая содержит только антибиотики.

Полученные чашки мы инкубировали при разных температурах, а именно - 22°C,

26°C и 30°C (по [146]). В ходе работы были экспериментально проверены варианты с 0.5x, 1x и 2x концентрации для красителя Конго красного, L-арабинозы и IPTG в различных сочетаниях. Для проведения заключительных экспериментов в системе C-DAG использовали модифицированные протоколы с двухкратным количеством арабинозы. В качестве контроля использовали модифицированные плазмиды pVS-GW Sup35M и pVS-GW-Sup35NM и классические плазмиды pVS72 и pVS105 из оригинальной статьи [146].

2.3 Бактериальная трансформация

Для наработки плазмид в штамме *E. coli* мы проводили бактериальную трансформацию химически компетентных клеток [131]. Для этого мы добавляли к компетентным клеткам плазмидную ДНК в количестве от 50 до 100 нг. на реакцию в зависимости от эксперимента. После инкубировали клетки во льду в течение 30 минут. Затем подвергали клетки термическому шоку в водяной бане при 42°C в течение 1 минуты. После к суспензии клеток мы добавляли среду LB, не содержащую антибиотиков, доводя общий объем до 1 мл. Затем полученную смесь инкубировали при перемешивании в термостате при 37°C. В конце мы высевали клетки на селективную среду и выращивали трансформантов в течение 12-16 часов при 37°C.

Для наработки рекомбинантного белка мы проводили химическую трансформацию клеток штамма BL21(DE3) *E. coli*. Для этого мы выращивали клетки в течение ночи в неселективной среде LB. Стационарную культуру клеток разводили в 100 раз и выращивали до логарифмической стадии. После мы осаждали клетки, промывали 0,1 М CaCl₂ и оставляли инкубироваться во льду в течение часа. После добавляли к клеткам плазмидную ДНК в количестве от 100 до 200 нг на реакцию. Затем инкубировали клетки во льду в течение 30 минут. Далее подвергали клетки термическому шоку в водяной бане при 42°C в течение 1 минуты. После к суспензии клеток мы добавляли среду LB, не содержащую антибиотиков, доводя общий объем до 1 мл. Затем полученную смесь инкубировали при перемешивании в термостате при 37°C. В конце мы высевали клетки на селективную среду и выращивали трансформантов в продолжение 12-16 часов при 37°C.

2.4 Дрожжевая трансформация

В данной работе мы использовали стандартные методы работы с дрожжевыми штаммами [72]. При проведении дрожжевой трансформации клеток следовали протоколу с использованием ацетата лития (далее LiAc) [72]. К началу трансформации концентрация клеток в культуре должна составлять приблизительно 10⁷ клеток/мл. Необходимое количество клеток осаждали из культуры в 1,5 мл пробирки (центрифугирование в течение

1,5 мин, 3000-5000 об/мин, 3 раза), среду после каждого раунда осаждения сливали. Осадок клеток ресуспендировали в 1 мл воды. Затем клетки снова осаждали и сливали воду. К осадку клеток добавляли 0,5 мл 100 мМ LiAc. Клетки ресуспендировали в LiAc и центрифугировали в течение 1,5 минут на скорости 5000 об/мин, остатки LiAc сливали. К осадку клеток добавляли 0,5 мл 100 мМ LiAc, ресуспендировали и оставляли на 20-30 минут при 30°C. Затем сливали большую часть LiAc, оставляя примерно 50-100 мкл. В этом объеме ресуспендировали клетки. Получившуюся суспензию делили на необходимое количество эпепендорфов и добавляли в них компоненты трансформационной смеси в следующих количествах:

- вода (до конечного объема в 360 мкл) – 40 мкл
- PEG 50% (w/v) - 240 мкл
- плазида (исходя из того, что на реакцию нужно 1,5 мкг плазмидной ДНК) – 5 мкл
- ssDNA (5 мкг/мл) - 24 мкл
- 1M LiAc - 36 мкл

После добавления всех компонентов перемешивали смесь до гомогенного состояния и инкубировали в течение 20-30 минут при комнатной температуре. Затем мы подвергали клетки термическому шоку, инкубируя их в водяной бане при температуре 42°C в течение 12 минут (время указано для штамма 74-D694). После осаждали клетки центрифугированием в течение 5 минут на скорости 5000 об/мин и сливали остатки трансформационной смеси. Далее разводили клетки в 100 мкл воды и высевали на селективную среду. Чашки инкубировали в термостате при температуре 30°C 4-10 дней до появления колоний [131].

2.5. Потеря приона [*PIN*⁺]

Для потери приона клетки выращивали на среде, содержащей гидрохлорид гуанидина в конечной концентрации 4 мМ. Данный химический агент приводит к нарушению работы шаперона Hsp104, который отвечает за фрагментацию агрегатов и, как следствие, возможность их передачи в дочерние клетки. Штамм выращивался 5 дней на среде с гидрохлоридом гуанидина и четыре раза пересевался для того, чтобы увеличить вероятность потери приона [*PIN*⁺]. Для проверки элиминации приона мы проанализировали наличие агрегатов Rnq1 в клетках с помощью метода SDD-AGE [81].

2.6. Микроскопия

2.6.1 Флуоресцентная микроскопия

Временные препараты для конфокальной и флуоресцентной микроскопии получали путем осаждения 500 мкл жидкой культуры дрожжевых клеток в селективной среде на логарифмической стадии роста (при оптической плотности культуры 0,3-0,4 по iMark (BioRad)). Далее полученный осадок ресуспендировали в 100 мкл воды. Затем мы смешивали 5 мкл полученной суспензии с 50% (v/v) глицерином в соотношении 1:1.

В работе использован микроскоп Zeiss AxioScope.A1. Для визуализации последовательностей белков, сшитых с EGFP, использовали фильтр 46 (максимум возбуждения — 500 нм, максимум испускания — 535 нм), для отделения автофлуоресценции от флуоресценции — фильтр 74HE (максимумы возбуждения — 483 нм и 569 нм; максимумы испускания — 526 нм и 636 нм). Фотографии получали с помощью камеры Zeiss AxioCam ERc s5 для микроскопа Zeiss Primostar. Для обработки изображений была использована программа ImageJ [136].

2.6.2 Просвечивающая электронная микроскопия

Для изучения белковых фибрилл, полученных *in vitro* и в системе C-DAG *in vivo*, мы использовали методику просвечивающей электронной микроскопии. Для приготовления препаратов были использованы медные сеточки для электронной микроскопии (EMS G200-Cu), покрытые формваровой пленкой. На сеточку наносили 5 мкл раствора с раствором фибрилл или суспензией клеток бактерий штамма VS39 с чашки с красителем Конго красный, через 30 секунд убирали излишки фильтровальной бумагой. После этого сеточку инкубировали с раствором 1% (w/v) уранил-ацетата в течение 30 секунд, затем промывали препарат водой [146]. Полученные препараты анализировали в Ресурсном Центре «Развитие молекулярных и клеточных технологий» СПбГУ с помощью микроскопа JEM-1400 (Jeol).

2.6.3 Поляризационная микроскопия

Для доказательства связывания красителя Конго красного с фибриллами исследуемого белка в системах *in vivo* и *in vitro* мы использовали поляризационную микроскопию. В случае с препаратами, полученными *in vivo*, бактериальные клетки снимали с твердой среды, содержащей индукторы (L-арабинозу и IPTG), а также краситель Конго красный, и наносили на предметное стекло. Далее полученный препарат накрывают покровным стеклом. В случае изучения фибрилл, полученных *in vitro*, образец

наносили на чистое предметное стекло (примерно 20 мкл раствора), после чего давали образцу полностью высохнуть. Затем на высохшую пленку наносили раствор красителя Конго красного (2,5 мг/мл в воде, для удаления кристаллов раствор предварительно был профильтрован через антибактериальный фильтр) так, чтобы он покрывал всю пленку. После чего, мы ожидали от 5 до 15 минут в зависимости от белка. Для белков Sup35NM и BSA время инкубации с Конго красным составляет 5-10 минут (личное сообщение Ю.В. Соповой, для белка NUP58 время инкубации было подобрано экспериментально и составило 10-15 минут). Затем мы отбирали раствор Конго красного и смывали остатки 70% спиртом. После чего мы наносили 5 мкл глицерина и накрывали покровным стеклом. Полученные препараты в обоих случаях анализировали в РЦ «Развитие молекулярных и клеточных технологий» СПбГУ с помощью микроскопа DMI6000 (Leica).

2.7 Методы работы с нуклеиновыми кислотами

2.7.1 Выделение и очистка ДНК

Выделение плазмидной ДНК мы проводили с использованием набора реактивов GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Fermentas или Thermo Scientific). Для очистки ПЦР продуктов использовали набор реактивов GeneJET PCR purification kit (Thermo Scientific). Все манипуляции проводили согласно протоколу производителя.

2.7.2 ПЦР (полимеразная цепная реакция)

Для проведения ПЦР мы использовали в качестве матрицы плазмиду рDONR221-NUP58 и праймеры: NUPL1-F-1-213 и NUPL1-R-1-213 для амплификации амилоидогенного участка белка NUP58 (таблица 4). Для проведения ПЦР мы использовали Taq-полимеразу (Sibenzyme) в количестве 0,5-1 единиц активности на 10 мкл реакции, смесь из дезоксинуклеотидтрифосфатов в конечной концентрации 2 мМ, 10^x буфер для ПЦР (Sibenzyme) и праймеры в конечной концентрации 2-4 пмоль/мкл.

Программа реакции амплификации:

1. Денатурация ДНК – 30 секунд, 95°C.
2. Амплификация фрагментов – 25 циклов: Денатурация ДНК – 30 секунд, 95°C. Отжиг праймеров – 1 минута 57°C. Синтез ДНК – 1 минута, 72°C.
3. Завершение синтеза ДНК – 10 минут, 72°C.

Таблица 5 — Праймеры, использованные в работе.

Жирным шрифтом обозначены attB-сайты рекомбинации. Температура отжига праймеров подбиралась экспериментально с помощью градиентной ПЦР.

Название праймера	Последовательность праймера	Применение в работе	Т _{отжига}
NUPL1-F-1-213	ggggACAAGTTTGTACAAA AAAGCAGGCT ccatgtccacagg g	Клонирование участка гена <i>NUP58</i>	58°C
NUPL1-R-1-213	ggggACCACTTTGTACAA GAAAGCTGGGT ctaattgcctgc agttg	Клонирование участка гена <i>NUP58</i> ₁₋₂₁₃	58°C
M13rev_20-mer	TCACACAGGAAACAGCT ATGAC	ПЦР с колоний	54°C
M13F_(-20)18-mer	GTA AACGACGGCCAGTG	ПЦР с колоний	54°C
pBAD_f	ATGCCATAGCATTTTTATC C	ПЦР с колоний	54°C
HS_Nup58-215-end-F	GGGGACAAGTTTGTACAA AAAAGCAGGCT caatgCTTGG TGGTATAGATTTTCAGTAGCT CC	Амплификация фрагмента 215-599 с матрицы pDONR221-Nup58	62,9°C
HS_Nup58-215-end-R	GGGGACCACTTTGTACAA GAAAGCTGGGT cgTTACTAT CTTTTTCCTCTTTTGTTC	Амплификация фрагментов 215-599 и 468-599 с матрицы pDONR221-Nup58	61,7°C
HS_Nup58-468-end-F	GGGGACAAGTTTGTACAA AAAAGCAGGCT caatgACACT TACACAGCAGCAACAGCCT GCTACAGGG	Амплификация фрагмента 468-599 с матрицы pDONR221-Nup58	65,4°C
HS_Nup58-1-95-R	GGGGACCACTTTGTACAA GAAAGCTGGGT cgTTACAG AGTTAATCCTGTAGTTATAG	Амплификация фрагмента 1-95 с матрицы pDONR221-	59,6°C

		Nup58	
HS_Nup58-175-F	GGGGACAAGTTTGTACAA AAAAGCAGGCTccatgGCTGG TTTGGGAGGTTCACTTTTCC	Амплификация фрагмента 175-213 с матрицы pDONR221- Nup58	61,1°C
HS_Nup58-1-213-F	GGGACAAGTTTGTACAAAA AAGCAGGCTccATGTCCACA GGG	Амплификация фрагмента 1-95 с матрицы pDONR221- Nup58	61,1°C
HS_Nup58-213-R	GGGACCACTTTGTACAAGA AAGCTGGGTctAATTGCCTG CAGTTG	Амплификация фрагмента 175-213 с матрицы pDONR221- Nup58	62,9°C
attb1-Nup100-1-400-F	GGGGACAAGTTTGTACAA AAAAGCAGGCTсаасаATGTT TGGCAACAATAGACCAATGT TTGG	Амплификация фрагмента Nup100 ₁₋₄₀₀ с геномной ДНК <i>S.cerevisiae</i> штамма 1B-D1606	61°C
attb2-Nup100-1-400- R(stop)	GGGGACCACTTTGTACAA GAAAGCTGGGTcgTTATGCT GGTTTGGCTCCAAACAAACC TGTAG	Амплификация фрагмента Nup100 ₁₋₄₀₀ с геномной ДНК <i>S.cerevisiae</i> штамма 1B-D1606	61°C
attb1-Nup145-1-152-F	GGGGACAAGTTTGTACAA AAAAGCAGGCTсаасаATGTT ТААТАААAGTGТАААТАGТG G	Амплификация фрагмента Nup145 ₁₋₁₅₂ с геномной ДНК <i>S.cerevisiae</i> штамма 1B-D1606	59°C
attb2-Nup145-1-152- R(stop)	GGGGACCACTTTGTACAA GAAAGCTGGGTcgТТААТТТ TGCGTGGTAGAAGTTATATT	Амплификация фрагмента Nup145 ₁₋₁₅₂ с геномной ДНК	59°C

	G	<i>S.cerevisiae</i> штамма 1B-D1606	
attb1-Nsp1-1-136-F	GGGGACAAGTTTGTACAA AAAAGCAGGCT caacaatgaactt caatacacctcaacaaaacgccc	Амплификация фрагмента Nsp1 ₁₋₁₃₆ с геномной ДНК <i>S.cerevisiae</i> штамма 1B-D1606	63°C
attb2-Nsp1-1-136-R(stop)	GGGGACCACTTTGTACAA GAAAGCTGGGT cgTTAattgcta ttagtactgtattgaataaggatg	Амплификация фрагмента Nsp1 ₁₋₁₃₆ с геномной ДНК <i>S.cerevisiae</i> штамма 1B-D1606	63°C
attB1-hsNup98-1-F	GGGGACAAGTTTGTACAA AAAAGCAGGCT caATGTTTA ACAAATCATTGGAACACCC	Амплификация фрагмента Nup98 ₁₋₂₅₀ с кДНК клеточной линии <i>H. sapiens</i> IMR-32	60°C
attB2-hsNup98-stop-250-R	GGGGACCACTTTGTACAA GAAAGCTGGGT cgTTAAAA GCCTGAATTAGTGGTGGAGG	Амплификация фрагмента Nup98 ₁₋₂₅₀ с кДНК клеточной линии <i>H. sapiens</i> IMR-32	60°C
attB1-spNup98-250-F	GGGGACAAGTTTGTACAA AAAAGCAGGCT caAATCAA GGACGACGTTTTGGC	Амплификация фрагмента Nup98 ₂₅₀₋₄₉₉ с кДНК <i>Sh. pombe</i>	61°C
attB2-spNup98-stop-499-R	GGGGACCACTTTGTACAA GAAAGCTGGGT cgTTAATTA GCATTTTGCCCAAAGAAAA ACCTCC	Амплификация фрагмента Nup98 ₂₅₀₋₄₉₉ с кДНК <i>Sh. pombe</i>	61°C
attB1-spNup45-1-F	GGGGACAAGTTTGTACAA AAAAGCAGGCT caATGTTTCG	Амплификация фрагмента Nup45 ₁₋₂₂₀	60°C

	GGTTAAATAAAACACCC	с кДНК <i>Sh. pombe</i>	
attB2-spNup45-220-R	GGGGACCACTTTGTACAA GAAAGCTGGGT _{cg} TTACTTC CCAAACAAAGAACCAGTAC	Амплификация фрагмента Nup45 ₁₋₂₂₀ с кДНК <i>Sh. pombe</i>	60°C
attB1-dmNup62-1-F	GGGGACAAGTTTGTACAA AAAAGCAGGCT _{ca} ATGGTAT TCCAGTTGCCAACAAC	Амплификация фрагмента Nup62 ₁₋₁₇₅ с кДНК <i>D. melanogaster</i>	61°C
attB2-dmNup62-175-R	GGGGACCACTTTGTACAA GAAAGCTGGGT _{cg} TTACTGC GTGGAGGCTATGGC	Амплификация фрагмента Nup62 ₁₋₁₇₅ с кДНК <i>D. melanogaster</i>	61°C
attB1-hsNUP62-1-F	GGGGACAAGTTTGTACAA AAAAGCAGGCT _{ca} ATGAGTG GATTTAACTTTGGAGGC	Амплификация фрагмента NUP62 ₁₋₁₇₅ с кДНК клеточной линии <i>H. sapiens</i> IMR-32	61°C
attB2-hsNUP62-175-R	GGGGACCACTTTGTACAA GAAAGCTGGGT _{cg} TTATGAG CCAATGTTGAAACCGG	Амплификация фрагмента NUP62 ₁₋₁₇₅ с кДНК клеточной линии <i>H. sapiens</i> IMR-32	61°C
attB1-dmNup98-250-F	GGGGACAAGTTTGTACAA AAAAGCAGGCT _{ca} GCGGGC GCAAGGGTCCAC	Амплификация фрагмента Nup98 ₁₋₂₅₀ с кДНК <i>D. melanogaster</i>	61°C
attB2-dmNup98-500-R	GGGGACCACTTTGTACAA GAAAGCTGGGT _{cg} TTAGCAC ATATAGTCTTCCAGGCGG	Амплификация фрагмента Nup98 ₁₋₂₅₀ с кДНК <i>D. melanogaster</i>	61°C

attB1-tgNup58-60-320-F	GGGGACAAGTTTGTACAA AAAAGCAGGCT caATGGGA CTTAATTTGGAGCTCTGGG CTCTTCC	Амплификация фрагмента Nup58 ₆₀₋₃₂₀ с кДНК <i>T. guttata</i>	61°C
attB2-tgNup58-60-320-R	GGGGACCACTTTGTACAA GAAAGCTGGGT cgTTATAGC TCCTGTGCAGTTTCCAATTTC AGCTTGTC	Амплификация фрагмента Nup58 ₆₀₋₃₂₀ с кДНК <i>T. guttata</i>	61°C

2.7.3 ПЦР с колоний

Для проведения ПЦР мы отбирали колонии бактерий с селективной среды, ресуспендировали в 20 мкл воды и инкубировали при 100°C в течение 5 минут. После полученную смесь центрифугировали в течение 10 минут на скорости 14000 об/мин при 4°C и для ПЦР использовали 2 мкл. В ПЦР мы использовали Taq-полимеразу (Sibenzyme) в количестве 0,5-1 единиц активности на 10 мкл реакции, смесь из дезоксинуклеотидтрифосфатов в конечной концентрации 2 мМ, 10x буфер для ПЦР (Sibenzyme) и праймеры в конечной концентрации 2-4 пмоль/мкл. Праймеры, использовавшиеся в работе – NUPL1-F-1-213, NUPL1-R-1-213, M13rev_20-mer, M13F_(-20)18-mer, pBAD_f, и PROEX_R (таблица 5).

Программа реакции амплификации:

1. Денатурация ДНК – 30 секунд, 95°C.
2. Амплификация фрагментов – 30 циклов: Денатурация ДНК – 30 секунд, 95°C. Отжиг праймеров – 1 минута 58°C. Синтез ДНК – 1 минута, 72°C.
3. Завершение синтеза ДНК – 10 минут, 72°C.

2.7.4 Электрофорез нуклеиновых кислот

Для оценки размеров ДНК в пробе мы проводили электрофорез в 0,5^x кратном буфере TBE (10,8 г – Трис, 5,5 г – Борной кислоты, 4 мл – 0,5 М ЭДТА pH 8,0, mQ – до 100 мл, состав приведен для 1^x буфера) в агарозном геле (1% (w/v) агарозы для фрагментов размером более 500 пар оснований и 1,5% (w/v) для фрагментов меньшего размера) в течение 40 минут при 80 В. Буфер для нанесения – 5^x Sample buffer DNA (0,25% (w/v) бромфеноловый синий, 0,25% (w/v) ксиленцианол, 30% (v/v) глицерин) [131]. После окончания электрофореза для визуализации мы окрашивали гель в растворе бромистого

этидия в течение 5-10 минут и визуализировали фрагменты ДНК с использованием трансиллюминатора. Фотографировали при помощи цифровой видеокамеры Canon PowerShot G12.

2.7.5 Получение кДНК

Тотальную РНК выделяли с использованием реагента TRIzol (Fermentas) согласно протоколу производителя. Для выделения РНК из клеток *S.pombe* использовался штамм 972. Для выделения РНК человека использовали культуру клеток IMR-32 (предоставлена Д.В. Качкиным). Синтез кДНК проводили с помощью набора RevertAid RT Kit (Thermo Scientific, K1691), согласно рекомендациям производителя.

2.7.6 Рестрикция и лигирование фрагментов

Во время проведения реакции рестрикции для проверки плазмид, где ген интереса сшит с EGFP, мы использовали рестриктазу *PstI* в буфере Orange. Лигирование фрагментов осуществляли с использованием фермента T4 ДНК-лигазы в буфере для данного фермента (Fermentas).

2.7.7 Рекомбинационное клонирование (Gateway reaction)

Для проведения реакции рекомбинационного клонирования мы смешивали 100 нг плазмиды, содержащей последовательность гена интереса, и 150 нг вектора для вставки в 10^x TE буфере (на 100 мл буфера – 1 мл 1 М Tris-HCl pH 8,0, 200 мкл 0,5 М ЭДТА) в конечном объеме 7 мкл. К полученной смеси мы добавляли 1 мкл LR clonase mix (Thermo Scientific) и инкубировали от 3 до 12 часов при 26°C. После для прекращения реакции мы добавляли 0,5 мкл раствора протеиназы К и инкубировали 10 минут при 37°C согласно протоколу производителя (Thermo Scientific). Затем полученной смесью мы трансформировали компетентные клетки штамма TOP10 согласно стандартному протоколу бактериальной трансформации.

2.7.8 Секвенирование ДНК

Секвенирование ПЦР-продуктов и полученных плазмид проводили А.С. Машарский и А.С. Самарина на базе Ресурсного центра СПбГУ "Развитие молекулярных и клеточных технологий" на капиллярном секвенаторе ABI Prism 310 с использованием стандартного праймера M13, а также праймеров, специфичных к последовательностям исследуемых генов и плазмидам. Полученные хроматограммы анализировали при помощи программы UGENE с использованием функции "Анализ секвенирования по Сэнгеру" для проверки правильности полученных последовательностей плазмид [112].

2.8 Методы работы с белками

2.8.1 Денатурирующий электрофорез белков в полиакриламидном геле (SDS-PAGE)

Для доказательства агрегации белка в системах *in vivo* и *in vitro*, а также для проверки наличия белка в пробах мы использовали методику белкового электрофореза в полиакриламидном геле [131]. Мы наносили на гель пробы, смешанные с буфером для нанесения (состав буфера в конечных концентрациях: 0,6 М Трис-НСl pH 6,8, 2% (w/v) SDS, 0,002% (w/v) бромфеноловый синий, 2% (v/v) β -меркаптоэтанол, 5%(v/v) глицерин) после чего подавали ток до 60 В до входа проб в разделяющий гель. После мы проводили электрофорез при 180 В до выхода краски из геля. Для электрофореза мы использовали полиакриламидные гели 10% - разделяющий и 5% - концентрирующий [131]. Для проверки SDS-устойчивости получаемых агрегатов мы также использовали методику SDS-PAGE с кипячением геля. В ходе этой методики проводился стандартный SDS-PAGE, однако после 40-50 минут от начала фореа он останавливался, и в лунки наносился 1-х Sample-buffer, после чего мы заливали в лунки 10% полиакриламидный гель для того, чтобы содержимое лунок не выкипало. После данный гель запаивали в пленку и кипятили в течение 5 минут. Далее фореа продолжали до выхода краски из геля [84].

2.8.2 Окраска белков красителем Кумасси

Для окраски всех белков в полиакриламидном геле его кипятили в красителе Кумасси (0,25% (w/v) Coomassie R-250 (в оригинальном протоколе использовался Coomassie R-350), 10% (v/v) уксусная кислота, 50% (v/v) этанол) в течение 1,5 мин. Далее мы удаляли излишки красителя при помощи кипячения в воде [131].

2.8.3 Полуденатурирующий электрофорез белковых агрегатов в агарозном геле (SDD-AGE)

Мы проводили электрофорез в геле с содержанием агарозы 1,5%, которую растворяли в однократном буфере TAE при нагревании (состав на 1 литр буфера: Трис – 242 г, ледяная уксусная кислота – 57 мл, 0,5 М ЭДТА – 18,6 мл, pH 8,0). После растворения агарозы мы добавляли SDS до 0,1%(v/v) и быстро перемешивали, так как агароза может выпасть в осадок. Для проведения электрофореза мы использовали 1х буфер TAE с добавлением SDS. На 300 мл буфера мы добавляли 300 мкл 10%(w/v) SDS. Затем мы смешивали лизаты с буфером для нанесения (состав буфера: 2х TAE, SDS – 8%(w/v) по массе, глицерол – 20% по массе, бромфеноловый синий) и инкубировали в течение 5 минут при комнатной температуре. Пробы мы наносили в гель и осуществляли электрофорез при удельном напряжении поля 3 В/см геля (21 В в течении 4 часов) [81].

2.8.4 Полусухой перенос белков на мембрану

Для переноса белков из геля на поливинилиденфторидную мембрану после SDS-PAGE мы использовали методику полусухого переноса (по [131] с изменениями). Для переноса мы собирали конструкцию (снизу-вверх):

- губка для переноса;
- лист ватмана (Whatman);
- поливинилиденфторидная мембрана (предварительно активированная в метаноле в течение 1-2 минут);
- полиакриламидный гель;
- лист ватмана (Whatman);
- губка для переноса.

Все составляющие пропитывали буфером для переноса (состав на 1 литр буфера: Трис – 6,06 г, глицин – 28,8 г, метанол – 400 мл). Перенос осуществляли при условиях 10-15 В в течение 90 минут с использованием прибора для полусухого переноса Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell (BioRad).

2.8.5 Капиллярный перенос

Для переноса белков после SDD-AGE мы использовали методику капиллярного переноса [58]. Мы подготавливали стопку фильтровальной бумаги и несколько листов ватмана, нарезанных под размер геля, а также «фитиль» (полоска ватмана, ширина которой соответствует размеру геля, а длина в несколько раз его превосходит). Затем мы активировали поливинилиденфторидную мембрану в метаноле в течение нескольких минут. Далее мы промывали мембрану в буфере TBS (состав на 1 литр: 1 М Трис – 15 мл, NaCl – 9 г) в течение нескольких минут. После чего собирали систему для капиллярного переноса (порядок сборки снизу-вверх):

- стопка сухой фильтровальной бумаги;
- три или больше сухих листа ватмана (Whatman);
- два смоченных листа ватмана;
- поливинилиденфторидная мембрана;
- агарозный гель с исследуемыми белками;
- два смоченных листка ватмана;
- смоченный фитиль, концы которого помещаются в контейнеры с буфером TBS, располагающиеся выше уровня геля;
- груз из расчета 10 грамм на 1 см² геля.

После сборки мы помещали данную конструкцию в 4°C на ночь.

2.8.6 Вестерн-блот гибридизация

Вестерн-блот гибридизацию проводили согласно описанной методике [131]. Для идентификации белков, слитых с EGFP, мы использовали коммерческие антитела G(CY)FP (Evrogen AB121). Для идентификации белков, слитых с His6, мы использовали коммерческие антитела His6 (GE27-4710-01 Sigma). Для осуществления гибридизации мы использовали раствор первичных антител 1:3000 в 1%(w/v) Blocking agent (ECL Plus Western Blotting Detection System (Amersham)) (для антител G(CY)FP и His6) на основе буфера TTBS (9 гр – NaCl, 15 мл – 1 М Трис-HCl pH 7,6, 0,5 мл – Tween 20 на 1 литр воды). Затем мембрану отмывали в буфере TTBS 3 раза по 10 минут. После осуществляли гибридизацию со вторичными антителами anti-rabbit (ECL Plus Western Blotting Detection System (Amersham)) для детекции G(CY)FP и anti-mouse (ECL Plus Western Blotting Detection System (Amersham)) для детекции His6 при разведении антител 1:20000 в 1%(w/v) Blocking agent на основе буфера TTBS и отмывали мембрану, как это делали ранее. При проведении экспериментов по получению антител на исследуемый белок мы использовали раствор 5% молока на основе буфера TTBS в различных разведениях с сывороткой кролика. Для проявления комплексов антиген-антитело мы использовали фирменные наборы вторичных антител ECL Plus Western Blotting Detection System (Amersham) и реагентов ECL Plus Western Blotting Reagent Pack (Amersham). Сигнал детектировали с помощью прибора GeneGnome (Syngene).

2.8.7 Очистка рекомбинантных белков

Для очистки и наработки рекомбинантного белка NUP58 из бактерий нами был выбран штамм бактерий штамм *E. coli* BL21(DE3). Данный штамм был трансформирован конструкцией pDEST527-His₆-NUP58. Затем трансформантов выращивали в течение ночи в среде LB с добавлением ампициллина. Ночную культуру разводили в 100 раз до определенного конечного объема (до 200 мл в отдельной 2-х литровой колбе) и инкубировали на протяжении трех часов при температуре 37°C. Затем в культуру клеток добавляли индуктор ИПТГ (Изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид) до конечной концентрации 1 mM и инкубировали клетки в течение 4 часов. Для пробной индукции клетки выращивали в объеме 10 мл при тех же условиях. По истечении данного времени клетки осаждали центрифугированием при скорости 5000 об/мин в течение 10 минут, отбирали остатки среды и замораживали. Для очистки белка NUP58 в денатурирующих условиях к клеткам добавляли лизирующий буфер, содержащий 20 mM Трис-HCl (pH 8,0) и 8 М мочевины из расчета 3 мл буфера на 1 г клеток, и инкубировали при комнатной температуре в течение 1-1,5 часов при постоянном перемешивании. После этого

полученный лизат центрифугировали с ускорением 30 000 g в течение 20 минут при 4°C и отбирали надосадочную фракцию в отдельные микропробирки [139]. Эффективность выделения белка проверяли сравнением тотального клеточного лизата, осадочной и надосадочной фракций при помощи SDS-PAGE. Для препаративной очистки белка NUP58 использовали стационарную колонку с Ni-NTA агарозой (Invitrogene) и перистальтический насос (Bio-Rad). В начале мы промывали колонку 50 мл mQ, а затем 50 мл промывочным буфером (состав буфера - 20 mM Трис-HCl (pH 8,0), 8 M мочевины) со скоростью 1 мл/мин. Надосадочную фракцию клеточного лизата затем пропускали через колонку со скоростью 1,5 мл/мин, после чего промывали колонку промывочным буфером со скоростью 1,5 мл/мин (объем промывочного буфера 50 мл, при промывке использовался градиент имидазола от 0 до 8 mM). Затем элюировали белок линейным градиентом концентрации имидазола (от 8 mM до 400 mM имидазола, объем элюции 50 мл) на скорости 1,5 мл/мин. Сбор фракций осуществляли при помощи автоматизированного коллектора фракций (Econo Pump, Bio-Rad). Каждая фракция содержала 2 мл буфера с растворенным в нем белком. В дальнейшем полученные фракции анализировали с использованием SDS-PAGE и в отдельные микропробирки отбирали фракции, содержащие максимальное количество целевого белка. К данным фракциям элюата мы добавляли 5 объемов 100% метанола. После этого раствор инкубировали в течение ночи при 4°C. Осажденный белок собирали в микропробирки. В дальнейшем препарат белка хранили при температуре -80°C.

2.8.8 Обработка протеиназой К

Протеиназу К (Хеликон) добавляли к мономерному и агрегированному белку в концентрации 0,5 мкг/мл. Полученные растворы инкубировали в течение 60 мин при 26 °С. Реакцию останавливали добавлением PMSF до конечной концентрации 8,3 mM.

2.9 Статистическая обработка

В ходе данной работы проведение дисперсионного анализа и анализ критерия Вилкоксона с поправкой на множественные сравнения были рассчитаны с использованием среды статистической обработки R [123].

2.10 Анализ ядерно-цитоплазматического транспорта

Оценку эффективности ядерного транспорта проводили по одной из методик, предложенных в статье [77]. Используемый метод N/C включает получение изображений клеток, несущих изучаемые конструкции, при помощи флуоресцентной микроскопии и

обработку их в программе ImageJ с использованием инструмента ROI Manager. Согласно методике, интенсивность транспорта мы оценивали путем подсчета соотношения среднего значения интенсивности флуоресценции в области ядра клетки (N) к среднему значению интенсивности флуоресценции ее цитоплазмы (C):

$$N/C = \frac{\text{Средняя ядерная интенсивность флуоресценции}}{\text{Средняя цитоплазматическая интенсивность флуоресценции}}$$

Перед измерением отношений N/C клеток в программе ImageJ мы вычитали из изображения интенсивность фоновой флуоресценции, поскольку фон может резко изменять расчетное значение N/C. Мы применяли метод коррекции псевдоплоского поля (pseudo-flat-field correction) (Process -> Filters -> Gaussian Blur). Этот метод включает создание дубликата изображения (Image -> Duplicate), которое размыто до такой степени, что теряет детализацию клеток и поддерживает только общую интенсивность фоновой флуоресценции. Это размытое изображение вычитается из первого (Process -> Image Calculator). Полученное изображение имеет более равномерное освещение и меньшую фоновую флуоресценцию. На изображении у выбранной клетки с помощью инструмента Rectangle (Выделение прямоугольной области) вручную выделяли область (ROI) ядра и цитоплазмы в виде квадрата со стороной от 10 до 13 пикселей. Затем использовали инструмент ROI Manager (Analyze -> Tools -> ROI Manager). В появившемся окне нажимали кнопку Add (или “t” на клавиатуре), после чего в окне ROI Manager появлялись координаты выбранной области. После того, как были выбраны все области, нажимали Measure и получали таблицу со средними значениями интенсивности флуоресценции ядра и цитоплазмы для каждой клетки. Полученные значения переносили в программу Microsoft Excel, где рассчитывали соотношение N/C. Для каждой исследуемой конструкции брали от трех фотографий и более, на которых проводили измерения до 100 клеток. Статистическую обработку проводили в среде R [123].

2.11 Биоинформатические методы

Для оценки амилоидогенности белка мы использовали программу ArchCandy, которая предсказывает всевозможные β -арки, которые могут образоваться в белке [6]. Для оценки границ неструктурированных участков мы использовали программу IUPred [38]. В конечный анализ мы брали арки, которые полностью находились в неструктурированных участках белка. Далее расчёт кумулятивного сора для каждой позиции осуществлялся посредством суммирования сора всех β -арок, в которых присутствовала данная аминокислота. Для оценки консервативности последовательности мы использовали

алгоритм выравнивания MUSCLE для построения белкового выравнивания [42]. Далее доля совпадающих аминокислот для каждой позиции рассчитывается при помощи скриптов, написанного на языке R доступных по ссылке (https://github.com/sukhanovaxenia/Evolutionary_conservation_of_amyloidogenic_properties_of_nucleoporins_with_FG_repeats).

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1. Белок человека NUP58 демонстрирует амилоидные свойства в различных системах

Ранее в ходе проведенных исследований было показано, что существует большое количество белков, которые потенциально могут включаться в состав амилоидных агрегатов [21]. В нашей лаборатории был проведен анализ белков, взаимодействующих с человеческим белком Htt (агрегация данного белка приводит к развитию болезни Хантингтона) согласно базе данных BioGRID [117]. В ходе этого анализа был выявлен новый потенциальный амилоид человека – белок NUP58. Согласно предсказаниям программы ArchCandy в человеческом белке NUP58 обнаруживаются несколько участков, которые склонны к образованию агрегатов. Один из таких участков – это фрагмент белка с 1 по 213 аминокислотный остаток (рис. 5). Выбор программы связан с ее высокой точностью [6]. В качестве критерия амилоидных свойств в данной программе используется наличие хотя бы одной бета-арки. Поскольку известно, что участки белка, способные формировать амилоиды, обычно не структурированы, полученные предсказания были дополнены моделированием неструктурированных участков белка в программе IUPred [38].

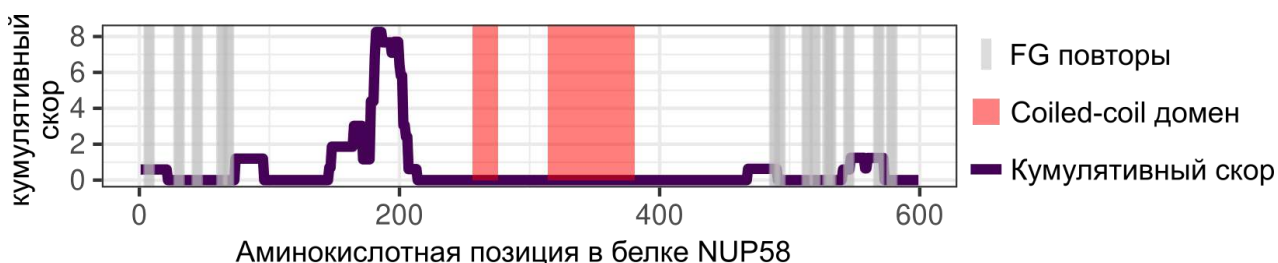


Рисунок 5 — Амилоидогенные регионы в NUP58. Кумулятивный скор ArchCandy отражает способность белка образовывать β -арки, которые являются характерной чертой амилоидов. FG повторы – повторы фенилаланина и глицина, Coiled-coil домен – домен спиральная катушка.

Проведенная оценка консервативности амилоидных свойств ортологов белка человека NUP58 (для анализа была взята 101 последовательность белка, принадлежащая организмам из группы Chordata). Все проанализированные белки обладали амилоидогенными свойствами. Важным результатом также является то, что консервативность амилоидных свойств была выше, чем консервативность белковой последовательности (рис. 6).

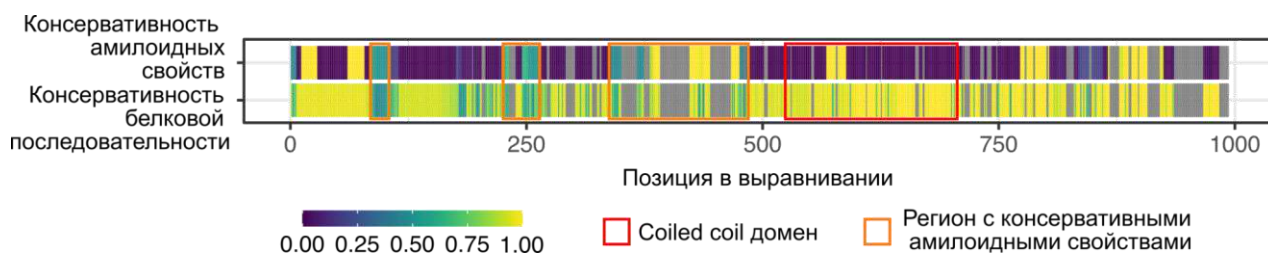


Рисунок 6 – Консервативность амилоидных свойств ортологов белка NUP58. Тепловая карта демонстрирует консервативность последовательности ортологов NUP58 (серым цветом обозначены столбцы выравнивания, содержащие большое количество пропусков) и долю амилоидогенных последовательностей в определенной позиции выравнивания. Оранжевыми прямоугольниками отмечены регионы с консервативными амилоидогенными свойствами.

3.1.1 Амилоидные свойства белка NUP58 *in vitro*

Для анализа амилоидогенных свойств белка NUP58 *in vitro* мы очистили его из клеток бактерий *E. coli*. Для этого нами был взят штамм BL21(DE3) (см. Материалы и методы), который был трансформирован плазмидой pDEST527-His₆-NUP58. На данной плазмиде перед последовательностью гена, которая кодирует белок NUP58, закодирована последовательность из 6 гистидинов. Полученные трансформанты были отобраны на селективной среде с ампициллином. Затем для полученных трансформантов мы провели пробную индукцию в небольшом объеме (10 мл среды LBa) при 37°C. С использованием SDS-PAGE мы могли детектировать увеличение количества белка в клеточном лизате бактерий в районе 60 кДа, что соответствует ожидаемому размеру белка. После предварительной проверки ночную культуру трансформантов, выращенную в жидкой LB с добавлением ампициллина, мы разводили в 100 раз и наращивали в больших объемах (200 мл в 2-х литровых колбах) для проведения индукции (см. Материалы и методы). Элюирование белка с колонки проводили с использованием градиента имидазола от 8 до 400 мМ (пробы были отобраны с шагом в 4 мМ) и последующим элюированием при 400 мМ имидазола (рис. 7). В результате мы получили препарат белка NUP58, который в дальнейшем можно использовать для постановки агрегации белка для получения амилоидных фибрилл *in vitro*. Проведенные эксперименты выполнены вместе с Светланой Евгеньевной Москаленко.

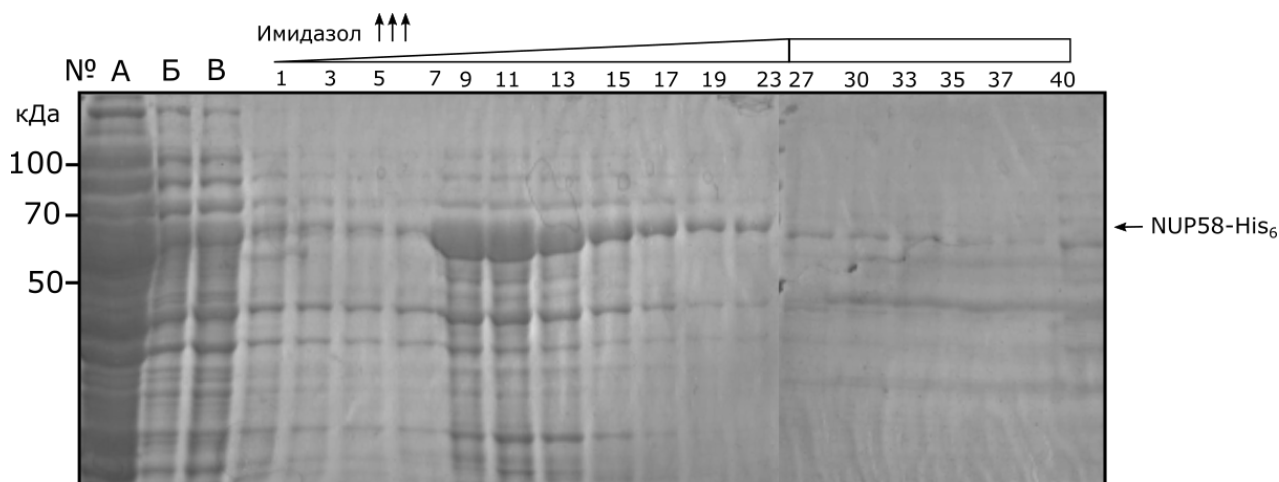


Рисунок 7 — Очистка белка NUP58 с His₆-тэгом из клеточных лизатов бактерий.

На рисунке показан полиакриламидный гель после SDS-PAGE, окрашенный красителем Кумасси. Представлены результаты анализа различных фракций после аффинной хроматографии с использованием Ni-NTA агарозы и градиента концентрации имидазола. А – исходный лизат, Б – надосадочная фракция после центрифугирования, В – осадок после центрифугирования. Номера от 1 до 40 – последовательно собранные фракции элюции при градиенте имидазола 8 до 400 мМ (шаг в 4 мМ был с 1 по 23 пробу, далее концентрация имидазола составляла 400 мМ).

Для проверки амилоидных свойств белка нам было необходимо проверить его способность к агрегации. Для этого нами были проанализированы различные условия агрегации. Изначально мы инкубировали пробы в следующем буфере (150 мМ NaCl, 5 мМ калий-фосфатного буфера, рН 7,0) в 37°C. Для проверки наличия агрегатов мы проверяли образцы с использованием SDS-PAGE. Однако по результатам проверки мы не наблюдали отличий в уровне белка в кипяченой и некипяченой пробах. Из-за этого мы произвели подбор значений рН раствора. В качестве исходной точки нами был использован буфер с рН 6,6, так как для дрожжевого нуклеопорина использовался буфер таким значением рН [59]. Кроме того, нами были проанализированы три буфера с различными значениями рН, а именно 5,8; 7,0; 8,0. Все пробы инкубировали в течении 96 часов и далее проверяли с использованием SDS-PAGE (рис. 8). В некипяченной пробе количество мономерного белка меньше, чем в кипяченой, так как фибриллы не входят в полиакриламидный гель.

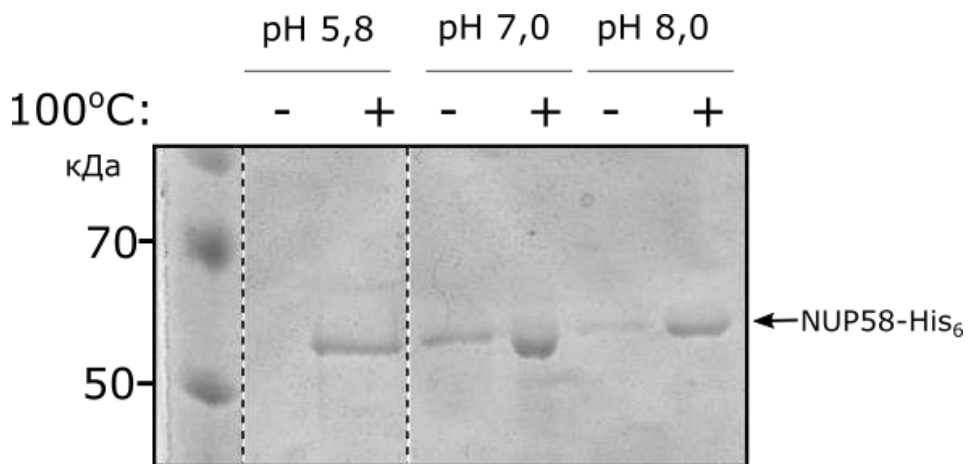


Рисунок 8 — Оптимизация условий агрегации белка NUP58. На рисунке представлен полиакриламидный гель после SDS-PAGE, окрашенный красителем Кумасси. Можно наблюдать разницу в эффективности агрегации по различию в уровне белка между кипяченой и некипяченой пробой в зависимости от pH используемого буфера. Цифры слева обозначают молекулярные веса маркера в килодальтонах. Стрелкой обозначены молекулы белка NUP58.

Наибольшее количество устойчивых к SDS белковых агрегатов мы получили при 37°C в следующем буфере (150 mM NaCl, 5 mM калий-фосфатного буфера, pH 5,8) при концентрации белка 1 мг/мл по прошествии 96 часов (рис. 8). Для получения препаративного количества агрегатов белка NUP58 мы использовали эти условия. Наличие этих агрегатов мы проверили с использованием метода SDS-PAGE, где сравнивали количество белка в кипяченых и некипяченых пробах на геле, окрашенном Кумасси (рис. 9). В некипяченой пробе количество мономерного белка меньше, чем в кипяченой, что свидетельствует об устойчивости полученных агрегатов к детергентам (SDS).

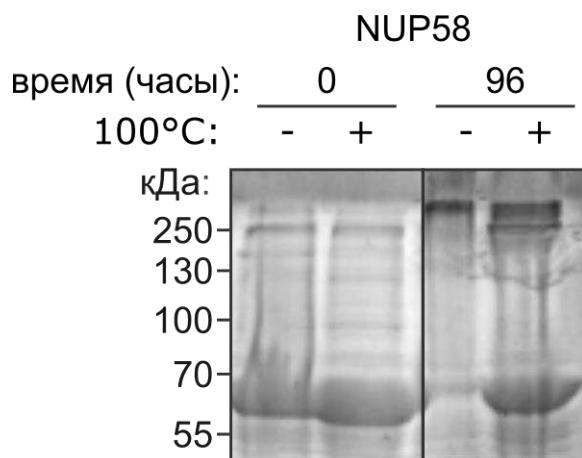


Рисунок 9 — Белок NUP58 образует SDS-устойчивые агрегаты. На рисунке представлен полиакриламидный гель после SDS-PAGE, окрашенный красителем Кумасси. После 96 часов инкубации можно наблюдать разницу в уровне белка между кипяченой и некипяченой пробой в сравнении с нулевой точкой. Цифры слева обозначают молекулярные веса маркера.

Для доказательства того, что полученный раствор агрегатов содержит фибриллы, он был проанализирован с использованием просвечивающей электронной микроскопии. Для этого нами были изготовлены препараты (см. Материалы и методы) и на них мы детектировали наличие небольших фибрилл (рис. 10). Это позволяет нам говорить о том, что полученные SDS-устойчивые агрегаты имеют морфологию характерную для амилоидных фибрилл. Полученные фотографии любезно предоставлены Белоусовым Михаилом Владимировичем.

NUP58 (96 часов)

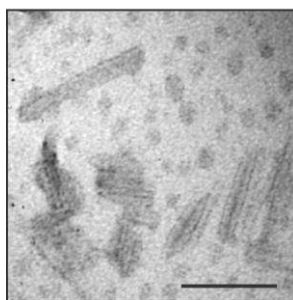


Рисунок 10 — Белок NUP58 образует фибриллы *in vitro*. Микрофотографии препаратов фибрилл белка NUP58, выполненные с использованием просвечивающей электронной микроскопии. Масштабная линейка равна 50 нм.

Мы использовали модификацию SDS-PAGE с докипячиваем геля [84] для дополнительного подтверждения детергент-устойчивости полученных фибрилл. Наличие белка мы детектировали с использованием первичных антител к His₆ (см. Материалы и методы). На первом этапе SDS-PAGE с докипячиванием в гель входят мономерные белки. После дополнительного кипячения геля, агрегаты, оставшиеся в лунках, разваливаются, и мы можем детектировать белок, из которого они состоят. В пробе без изначального нагревания мы можем наблюдать полоску белка в верхней части геля, что свидетельствует о наличии SDS устойчивых агрегатов. В результате использования данного метода мы показали наличие SDS-устойчивых агрегатов белка NUP58 (рис. 11).

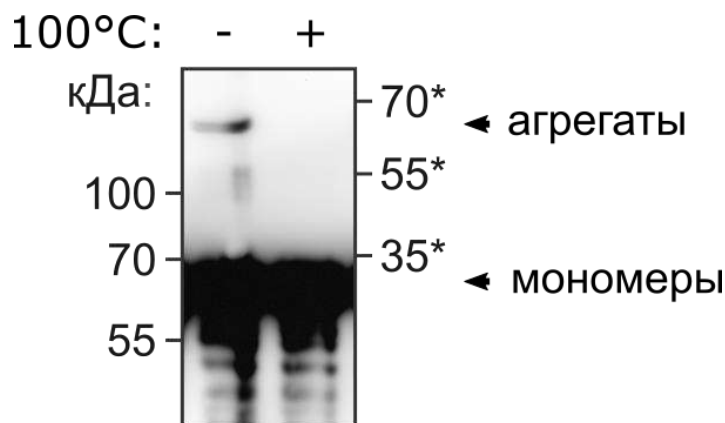


Рисунок 11 — Фибриллы белка NUP58 устойчивы к SDS. При использовании метода SDS-PAGE с докипячиванием геля мы можем детектировать небольшую фракцию белка, входящую в состав SDS-устойчивых агрегатов. Для детекции использовали первичные антитела к His₆ метке в обоих случаях. Цифры слева обозначают молекулярные веса маркера в килодальтонах. Цифры отмеченные * – маркер, добавленный после кипячения геля.

Финальным этапом стала визуализация амилоидных фибрилл с использованием метода SDD-AGE. Данный метод позволяет разделять мономерные белки и крупные белковые агрегаты. Детальный анализ раствора NUP58 выявил две формы агрегатов, которые отличаются по размеру и устойчивости к ВМЕ. Мы проверили устойчивость фибрилл NUP58 к "холодному" SDS в отсутствие ВМЕ в загрузочном буфере для SDD-AGE (рис. 12). Удивительно, но мы обнаружили крупные агрегаты, устойчивые к кипячению в SDS, однако после нагревания наблюдали накопление агрегатов меньшего размера в пробе с ВМЕ без кипячения (рис. 12). Поскольку ВМЕ приводит к разрушению дисульфидных связей, мы пришли к выводу, что эти агрегаты скорее являются полимерами, стабилизированными дисульфидными связями. Аналогичная ситуация была ранее описана для белка β 2-микроглобулина, амилоидные агрегаты которого также стабилизированы дисульфидными связями [120]. Эти исследования были выполнены совместно Бондаревым С.А.

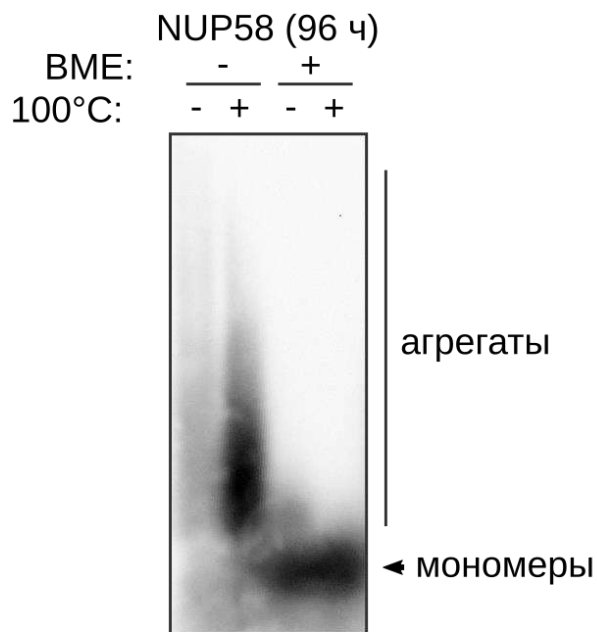


Рисунок 12 – Агрегаты белка NUP58 разрушаются в присутствии ВМЕ. Добавление ВМЕ необходимо для разрушения внутримолекулярных и межмолекулярных дисульфидных связей. В случае кипячения в присутствии ВМЕ мы наблюдаем разрушение агрегатов. Для детекции использовали первичные антитела к His₆.

Ещё одним из свойств амилоидных агрегатов является устойчивость к различным протеазам. В ходе работы мы проанализировали полученные фибриллы белка NUP58 на их устойчивость к протеиназе К. Ранее была показана устойчивость агрегатов белка PrP к этой протеиназе [121]. Мы обработали фибриллы белка NUP58 протеиназой К. Мономерный белок NUP58 был взят в качестве контроля того, что устойчивость к протеиназе К возникает в результате образования агрегатов, а не из-за аминокислотной последовательности белка NUP58. В результате после инкубации с протеиназой К в течение 90 минут мы наблюдали отсутствие протеолиза фибрилл белка NUP58, в то время как мономерный белок полностью деградировал (Рис. 13). На данном рисунке представлена одна повторность (из 4-х), и мы можем наблюдать повышенную концентрацию белка в 4 дорожке, что позволяет говорить о том, что фибриллы белка устойчивы к обработке протеиназой. Это служит еще одним подтверждением того, что белок NUP58 формирует амилоидные агрегаты.

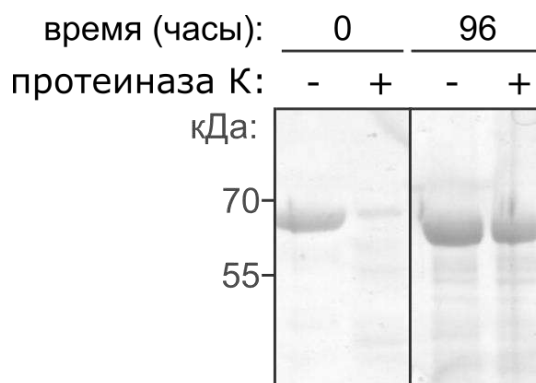


Рисунок 13 — Фибриллы белка NUP58 устойчивы к обработке протеиназой К. Представлены результаты SDS-PAGE. При добавлении протеиназы К к фибриллам белка NUP58 не происходит их деградации в отличие от мономерного белка NUP58. Размер белка NUP58 60 кДа. Цифры обозначают молекулярные веса маркера в килодальтонах.

Параллельно с этим для полученных фибрилл была проанализирована их способность связываться со специфическими амилоидными красителями. Одним из таких красителей является Конго красный. Окраску препаратов Конго красным проводили согласно протоколу, полученному от Ю.В. Соповой (подробнее см. Материалы и методы). В качестве положительного контроля использовали фибриллы белка Sup35NM, предоставленные С.А. Бондаревым, а в качестве отрицательного контроля – BSA (Fermentas). В результате мы наблюдали яблочно-зеленое свечение на препаратах при связывании красителя Конго красного с фибриллами белка NUP58 (рис. 14). Для положительного контроля фибрилл белка Sup35NM мы также наблюдали яблочно-зеленое свечение в поляризованном свете, а в случае BSA, где мы ожидали отсутствие амилоидных фибрилл, такого свечения мы не наблюдали.

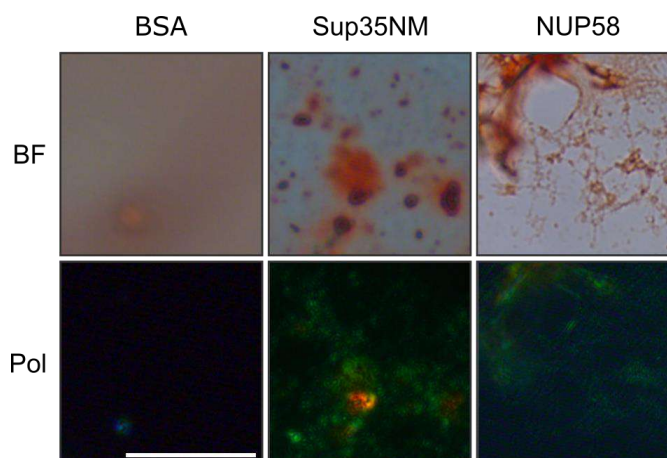


Рисунок 14 — Фибриллы белка NUP58 связываются с красителем Конго красным. На рисунке представлены микропрепараты раствора белка, окрашенного красителем Конго красным. При связывании красителя Конго красного с фибриллами белка NUP58 можно наблюдать яблочно-зеленое свечение в поляризованном свете.

Белок Sup35NM использовался в качестве положительного контроля, BSA – в качестве отрицательного. На рисунке представлены фотографии в проходящем свете (BF) и в поляризованном свете (Pol). Масштабная линейка 20 мкм.

Другим амилоид-специфическим красителем является краситель Тиофлавин Т. При связывании данного красителя с фибриллами мы можем наблюдать флуоресценцию. В ходе проведенного анализа нами было выявлено, что в присутствии BME полученные фибриллы белка NUP58 не демонстрируют флуоресценцию. В то же самое время препарат фибрилл без добавления BME демонстрировал флуоресценцию при связывании с красителем Тиофлавин Т, также, как и положительный контроль – фибриллы белка Sup35NM (рис. 15). Полученные результаты свидетельствуют в пользу того, что белок NUP58 является амилоидом.

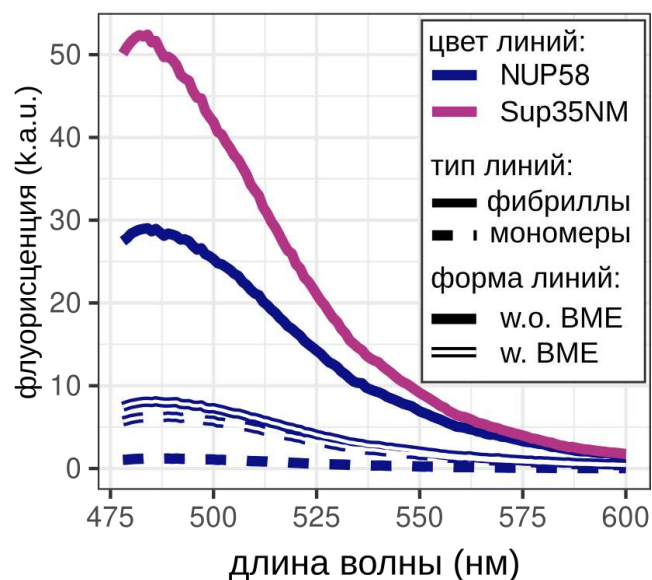


Рисунок 15 – Фибриллы белка NUP58 связываются с красителем Тиофлавин Т. На рисунке представлен график интенсивности флуоресценции Тиофлавина Т, связанного с фибриллами белка NUP58. Фибриллы белка Sup35NM использовали в качестве положительного контроля.

3.1.2 Амилоидогенные свойства белка NUP58 в модельных системах

Для проверки амилоидных свойств используется большое количество различных систем, в том числе дрожжевые и бактериальные клетки (подробнее см. Обзор литературы). Для проверки амилоидогенных свойств белка NUP58 нами были сконструированы плазмиды pAG416GPD-EGFP-NUP58 и pVS-GW-NUP58 несущие полноразмерный белок человека NUP58. Для проведения экспериментов в системе C-DAG бактериальный штамм VS39 был трансформирован плазмидой pVS-GW-NUP58. Отобранные после трансформации бактерии были высеяны на три среды на основе LB, одна из которых была содержала только антибиотики, вторая содержала краситель Конго

красный, а третья содержала амилоид-специфичный краситель Конго красный и индукторы (Арабинозу и IPTG). В результате после 5 дней выращивания бактерий на специальных средах, содержащих плазмиды с последовательностью гена *NUP58* при 26°C, мы наблюдали отдельные красные колонии (рис. 16). Это могло происходить из-за того, что экспрессия чужеродных белков большого размера в системе C-DAG может быть токсична для клеток. Для получения более явного результата нами была получена конструкция *pVS-GW-NUP58-1-213*, которая содержала в себе первый амилоидогенный участок белка с 1 по 213 а.к. Клетки бактерий, несущие данную конструкцию, также демонстрировали красный цвет колоний. В качестве положительного и отрицательного контроля мы использовали белки *Sup35NM* и *Sup35M* соответственно.



Рисунок 16 — Бактерии с плазмидой *pVS-GW-NUP58* и *pVS-GW-NUP58-1-213* красные на среде с Конго красным и индукторами. Стрелками на вынесенных участках обозначены красные колонии с продукцией белка *NUP58*. Белки *Sup35NM* и *Sup35M* использовали в качестве положительного и отрицательного контроля соответственно. Обозначения: контроль – селективная среда с антибиотиками, Конго красный – среда с антибиотиками, красителем Конго красный и индукторами. Фотографии чашек представлены на 5-ый день.

Затем бактерии, которые были выращены на чашках, содержащих индуктор и краситель Конго красный, мы проанализировали с использованием просвечивающей электронной микроскопии. В результате мы наблюдали наличие фибрилл на поверхности клеток, в которых сверхпродуцировались белок *NUP58* и его фрагмент *NUP58*₁₋₂₁₃ (рис. 17). В качестве положительного и отрицательного контроля мы также использовали белки *Sup35NM* и *Sup35M* соответственно, в которых мы наблюдали образование фибрилл или же наблюдали гладкие бактериальные клетки.

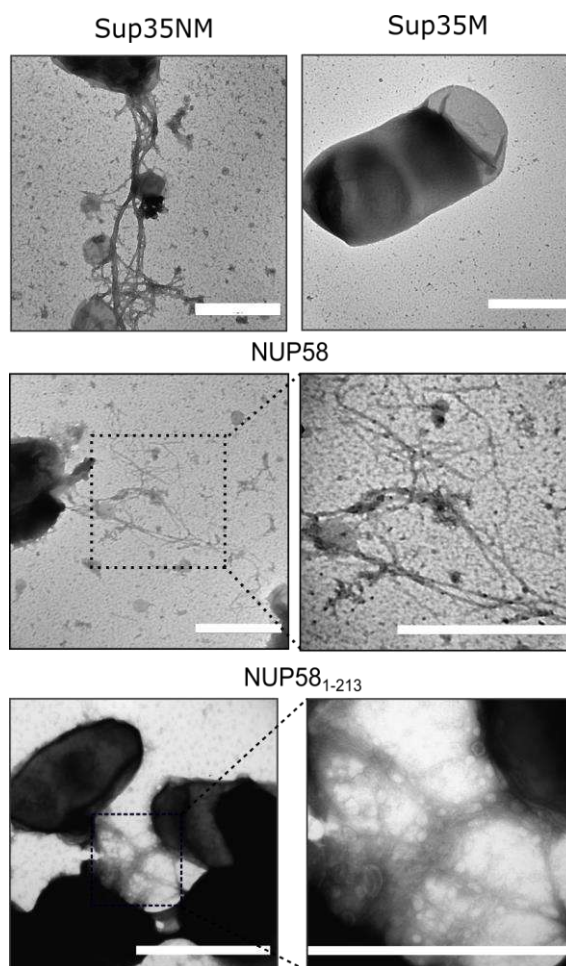


Рисунок 17 — Белок NUP58 и его фрагмент NUP58₁₋₂₁₃ образуют фибриллы в системе C-DAG. На рисунке представлены микрофотографии ПЭМ. Белки Sup35NM и Sup35M использовали в качестве положительного и отрицательного контроля соответственно. Масштабная линейка равна 1 мкм.

Количество клеток бактерий, в которых сверхпродуцировался полноразмерный белок NUP58, не позволяло провести эксперименты по поляризационной микроскопии и для этого эксперимента мы использовали клетки сверхпродуцирующие фрагмент NUP58₁₋₂₁₃. Колонии были проанализированы с помощью поляризационного микроскопа. Мы наблюдали яблочно-зеленое свечение в случае белков NUP58₁₋₂₁₃ и Sup35NM, что свидетельствует о том, что белок NUP58 обладает амилоидогенными свойствами (рис. 18).

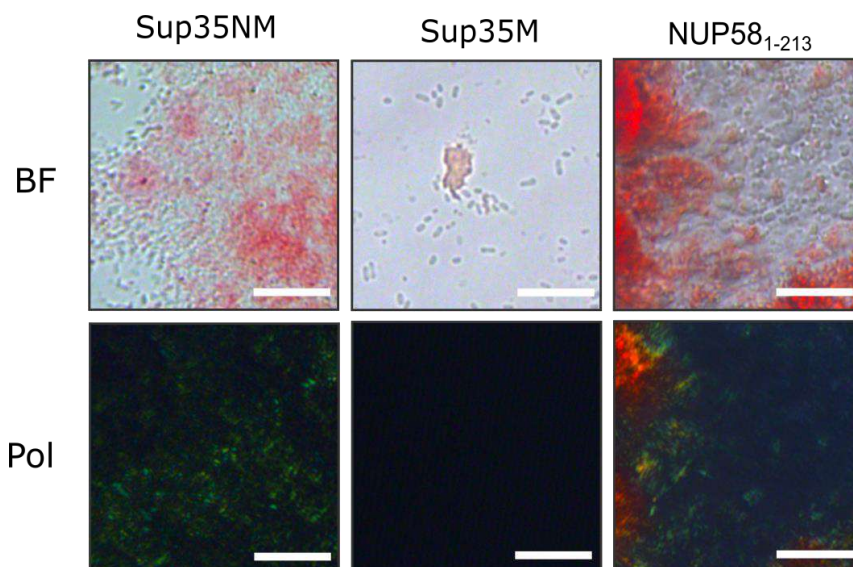


Рисунок 18 — При сверхпродукции белка NUP58₁₋₂₁₃ в бактериях его фибриллы обладают яблочно-зеленым свечением в поляризованном свете. Представлены микрофотографии клеток с Рисунка 16. Белки Sup35NM и Sup35M использовали в качестве положительного и отрицательного контроля соответственно. На рисунке представлены фотографии в проходящем свете (BF) и в поляризованном свете (Pol). Масштабная линейка 50 мкм.

Дрожжи являются удобным модельным объектом благодаря простоте введения различных конструкций в клетки, простоте культивирования, а также наличию описанных прионов и разработанных систем для проверки агрегации белков (см. Обзор литературы). Поэтому мы использовали их в качестве модельной системы для проверки амилоидогенных свойств белка NUP58. Для этого мы вводили химерную конструкцию, кодирующую белок NUP58 слитый с флуоресцентным белком GFP, под GPD промотором в клетки дрожжей *S. cerevisiae* с помощью трансформации. Данный промотор обеспечивает конститутивную сверхпродукцию белка. Одним из Q-богатых белков дрожжей *S. cerevisiae* является Rnq1, агрегация которого приводит к появлению приона [PIN⁺]. Агрегаты белка Rnq1 могут индуцировать агрегацию других polyQ белков [102]. Для того чтобы проверить влияет ли наличие приона [PIN⁺] на агрегацию белка NUP58, мы трансформировали 2 изогенных штамма дрожжей 74-D694 и 2-74-D694, которые различались [PIN⁺] статусом, плазмидой pAG416-EGFP-NUP58. После этого 6 трансформантов каждого штамма были проанализированы с использованием флуоресцентной микроскопии. В клетках дрожжей мы могли наблюдать флуоресцентные фокусы свечения белка NUP58, сшитого с GFP. Это служит ещё одним доказательством амилоидогенных свойств данного белка. Однако в результате мы не выявили визуальных различий между [PIN⁺] и [pin⁻] штаммами ни в количестве клеток с агрегатами, ни их морфологии (рис. 19).

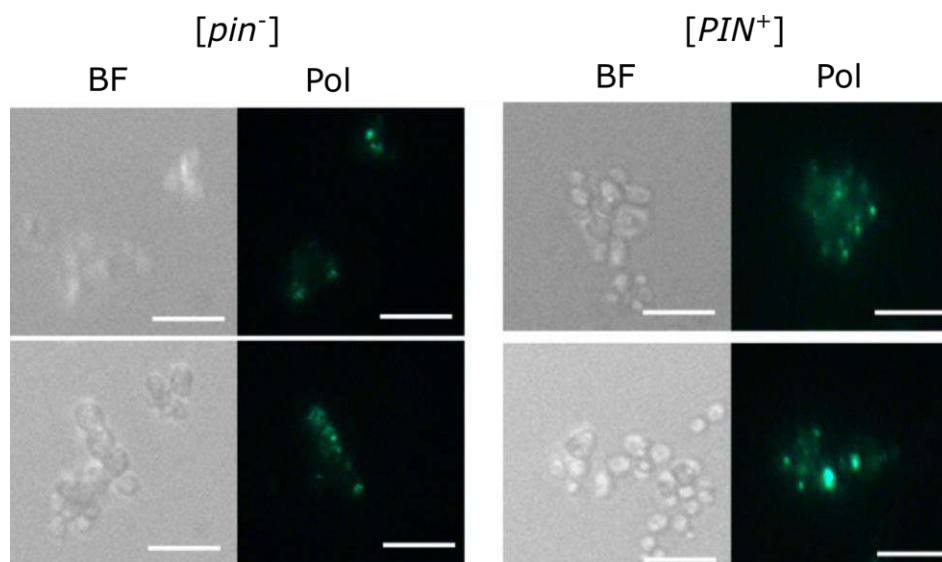


Рисунок 19 — Агрегация белка NUP58 не зависит от присутствия дрожжевого приона $[PIN^+]$. Штамм 2-74-D694 – $[pin^-]$, штамм 74-D694 – $[PIN^+]$. На рисунке представлены изображения в проходящем свете (BF), и GFP. Масштабная линейка равна 5 мкм.

3.2. Фрагменты нуклеопорина NUP58 обладают амилоидогенными свойствами

Для определения участка NUP58, отвечающего за его агрегацию, нами был проведен делеционный анализ белка NUP58. На основании предсказаний программы ArchCandy (рис. 5) нами были выбраны потенциальные фрагменты белка NUP58 для дальнейшей оценки их амилоидогенности, а именно фрагменты NUP58₁₋₉₅, и NUP58₂₁₅₋₅₉₉. Для получения укороченных вариантов проводили амплификацию фрагментов с матрицы pDONR221-NUP58 с помощью ПЦР, программа которой описана в соответствующем разделе “Материалов и методов”, праймеры перечислены в Таблице 4. Последующее получение плазмид описано в разделе Материалы и методы. Эксперименты в этом разделе проведены совместно с Антоновой Екатериной Юрьевной.

3.2.1 Проверка агрегации фрагментов белка NUP58 в системе C-DAG

Для проверки агрегации фрагментов с помощью системы C-DAG была произведена бактериальная трансформация *E. coli* штамма VS39 плазмидами pVS-GW-NUP58-215-599 и pVS-GW-NUP58-1-95 (рис. 20). Для бактерий, содержащих плазмиды с фрагментами гена NUP58 при 30°C мы наблюдали красную окраску колоний (рис. 20) на чашках, содержащих индукторы и Конго красный.

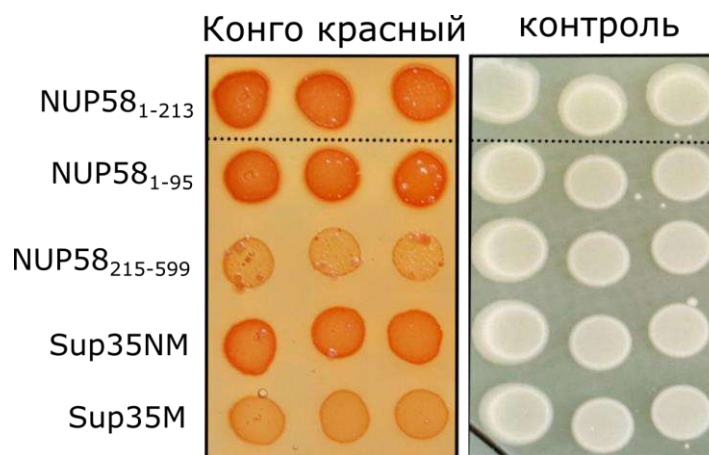


Рисунок 20 — Фрагменты белка NUP58 связываются с красителем Конго красным. Обозначения: контроль – селективная среда с антибиотиками, Конго красный – среда с антибиотиками, красителем Конго красный и индукторами. Белки Sup35NM и Sup35M использовали в качестве положительного и отрицательного контроля соответственно. Время роста бактерий – 5 дней.

В качестве положительного контроля выступал Sup35NM, также NUP58₁₋₂₁₃ использовался как дополнительный положительный контроль в связи с тем, что его агрегация была показана ранее [30]. В случае положительных контролей мы наблюдали красную окраску колоний, в случае отрицательного контроля – белка Sup35M красная окраска колоний отсутствовала. Сопоставив цвет исследуемых колоний, содержащих фрагменты белка NUP58, с положительными и отрицательными контролями были сделаны следующие наблюдения: окрашивание амилоидных фибрилл Конго красным наблюдается у фрагмента NUP58₁₋₉₅, а фрагмент NUP58₂₁₅₋₅₉₉ не обладает этим свойством. Затем бактерии, выращенные на чашках (рис. 20), содержащих индуктор IPTG и краситель Конго красный, были проанализированы с использованием просвечивающей электронной микроскопии (рис. 21). В качестве положительного и отрицательного контроля мы также использовали белки Sup35NM и Sup35M, соответственно, в которых мы наблюдали образование фибрилл или же наблюдали гладкие бактериальные клетки. В результате мы наблюдали наличие фибрилл на поверхности клеток только одного фрагмента, а именно – Nup58₁₋₉₅.

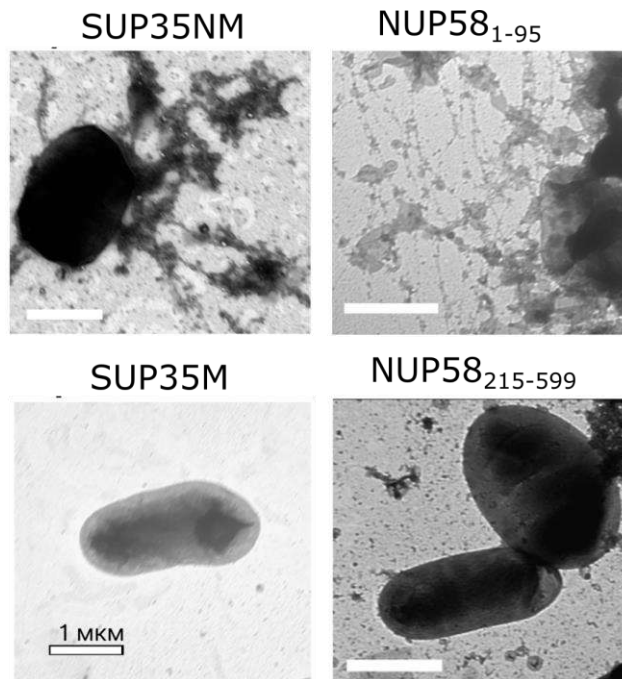


Рисунок 21 — Фрагмент белка NUP58₁₋₉₅ образуют фибриллы в системе C-DAG. На рисунке представлены микрофотографии ПЭМ. Белки Sup35NM и Sup35M использовали в качестве положительного и отрицательного контроля. Масштабная линейка равна 1 мкм.

Далее эти же клетки были нами проанализированы с помощью поляризационного микроскопа (рис. 22). Мы наблюдали яблочно-зеленое свечение в случае фрагмента белка NUP58₁₋₉₅, что свидетельствует о его амилоидных свойствах. Для фрагмента NUP58₂₁₅₋₅₉₉ мы не наблюдали свечения в поляризованном свете, что свидетельствует об отсутствии амилоидных свойств в данной системе.

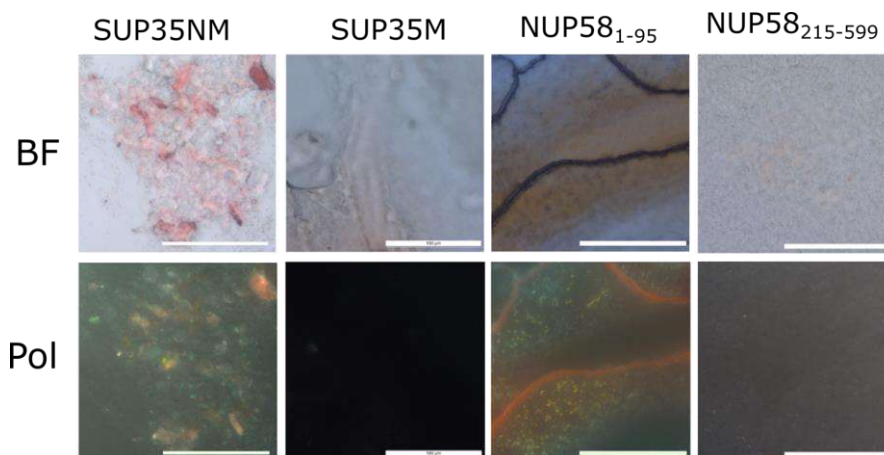


Рисунок 22 — При сверхпродукции белка NUP58₁₋₉₅ в бактериях его фибриллы обладают яблочно-зеленым свечением в поляризованном свете. Представлены микрофотографии клеток с чашек с Рисунка 20. Белки Sup35NM и Sup35M использовали в качестве положительного и отрицательного контроля соответственно. На рисунке представлены фотографии в проходящем свете (BF) и в поляризованном свете (Pol). Масштабная линейка 50 мкм.

Обобщенные результаты проведенной проверки фрагментов человеческого белка NUP58 в системе C-DAG представлены в Таблице 6. Таким образом, мы можем говорить о том, что основной амилоидогенный участок располагается с 1 по 213 аминокислотный остаток, что хорошо согласуется с предсказаниями программы ArchCandy (рис. 5).

Таблица 6 – Результаты проверки амилоидных свойств фрагмента белка человека NUP58 в системе C-DAG

Белок	Красный цвет колоний	Поляризация	Фибриллы на ПЭМ
NUP58 ₁₋₂₁₃	Да	Да	Да
NUP58 ₁₋₉₅	Да	Да	Да
NUP58 ₂₁₅₋₅₉₉	Нет	Нет	Нет

3.2.2 Проверка агрегации фрагментов белка NUP58 в дрожжевой системе

Мы использовали дрожжи *S. cerevisiae* в качестве дополнительной модельной системы для проверки амилоидогенных свойств фрагментов белка NUP58. Для этого мы трансформировали клетки дрожжей *S. cerevisiae* химерными конструкциями с фрагментами белка человека NUP58 под GPD промотором. Данный промотор обеспечивает конститутивную сверхпродукцию белка. Для того чтобы проверить влияет ли наличие приона [*PIN*⁺] на агрегацию фрагментов белка NUP58, мы трансформировали 2 изогенных штамма дрожжей 1-OT56 и 2-OT56, которые различались [*PIN*⁺] статусом, плазмидами pAG416GPD-EGFP-NUP58-215-599 и pAG416GPD-EGFP-NUP58-1-95. После этого трансформанты каждого штамма были проанализированы с использованием флуоресцентной микроскопии. В результате, были обнаружены фокусы свечения для конструкций NUP58₁₋₉₅ и NUP58₂₁₅₋₅₉₉ (рис. 23), что обусловлено агрегацией фрагментов белка. Это означает, что конструкции NUP58₁₋₉₅ и NUP58₂₁₅₋₅₉₉ способны агрегировать в клетках дрожжей. Проведенный анализ показал отсутствие различий в частоте встречаемости агрегатов фрагментов белков нуклеопооринов в [*PIN*⁺] и [*pin*⁻] штаммах.

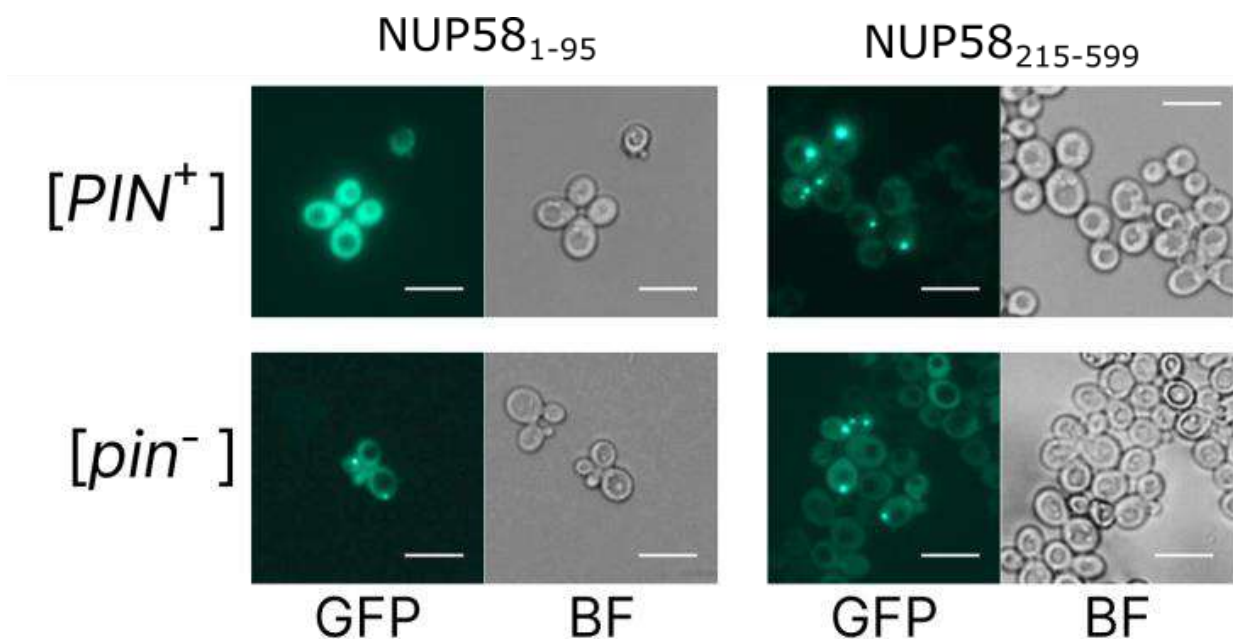


Рисунок 23 – Агрегация фрагментов белка NUP58 зависит от присутствия дрожжевого приона $[PIN^+]$, фотографии флуоресцентной микроскопии. В клетках дрожжей мы могли наблюдать флуоресцентные фокусы свечения белка NUP58, сшитого с GFP – это служит ещё одним доказательством амилоидных свойств данного белка. Диффузное же свечение означает, что белок продуцируется клетками дрожжей, но не формирует фибриллы. Штамм 2-OT56 – $[pin^-]$, штамм 1-OT56 – $[PIN^+]$. На рисунке представлены изображения в проходящем свете, и GFP. Масштабная линейка равна 5 мкм

3.3. Ортологи белка человека NUP58 и дрожжевого белка Nup100 демонстрируют амилоидогенные свойства

Регуляция ядерно-цитоплазматического транспорта является важнейшим процессом, который поддерживает клеточный гомеостаз. Наличие амилоидных свойств у белка человека NUP58, а также у дрожжевых нуклеопоринов, позволяет сделать предположение о том, что амилоидные свойства могут быть консервативными и встречаться у нуклеопоринов из различных таксономических групп. Для решения данной задачи мы провели биоинформатическую оценку амилоидных свойств этих белков в программе ArchCandy с наложением дополнительного фильтра на неструктурированные участки белков. Выбор программы был основан на серии статей, в которых была продемонстрирована её высокая точность по сравнению с аналогами [6, 22, 126]. Эти исследования были выполнены совместно с Сухановой К.В. и Бондаревым С.А.

3.3.1 Биоинформатический анализ амилоидных свойств ортологов белков нуклеопоринов

В анализ были взяты нуклеопорины с FG-повторами, поскольку для двух белков дрожжей *S. cerevisiae* (Nup100 и Nsp1) ранее были получены экспериментальные

свидетельства их агрегации [58, 86]. Кроме этого, ранее в своей работе мы показали амилоидные свойства для агрегатов белка человека NUP58, который также содержит аналогичный домен. Список белков для анализа был сформирован на основе обзорных статей (например, [155]). Поиск ортологов мы проводили по базе данных EggNOGG (<http://eggnog5.embl.de/>) [65] для группы Opisthokonta. В первую очередь мы анализировали белки *S. cerevisiae*, так как для большого количества дрожжевых белков были показаны амилоидные свойства [10]. Список белков и соответствующие ортогруппы представлены в Таблице 7.

Таблица 7 – Белки, взятые в анализ, и их ортогруппы.

* – нуклеопорины, которые не содержат FG-повторов

Белок <i>S.cerevisiae</i>	Ортогруппа по EggNOGG	Гомолог позвоночных	Ортогруппа по EggNOGG для гомолога среди позвоночных (если не совпадает со столбцом 2)
Nup42	ENOG5039YMU	hCG1/NLP1	
Nup159	ENOG5039SKI	Nup214	
Nup49	ENOG5039TYE	Nup58, Nup45	ENOG5039TBQ
Nup57	ENOG5038C34	Nup54	ENOG503988N
Nsp1	ENOG5038HQQ	Nup62	
Nup100, Nup116, Nup145	ENOG5038I30	Nup98	
Nup1	ENOG5038UZQ	Nup153	ENOG5039R35
Nup2	ENOG5038HDP	Nup50	ENOG503969S
Nup60	ENOG503A52U	-	
Nup84*	ENOG5038BZM	Nup107	
Nup192*	ENOG5038B8H	Nup207	

Перед последующим анализом последовательности были дополнительно проверены на предмет повторов (более одной последовательности для одного вида), а также наличие последовательностей, которые были ошибочно включены в набор при составлении базы данных. Для каждой группы последовательностей было построено множественное выравнивание на основании алгоритма MUSCLE [42], который является наиболее широко используемым на сегодняшний день. Алгоритм, встроенный в

программу UGENE [112], был запущен с дополнительным шагом «refine» для улучшения качества выравнивания. В ходе анализа полученного выравнивания и фильтрации мы удаляли последовательности в случае, (1) если записи о белке были удалены из баз данных NCBI, (2) если захватывали только C-терминальную часть белка (лишены FG-повторов), (3) если были значительно короче по сравнению с другой последовательностью того же вида.

Для уточнения положения интересующих нас фрагментов мы создали набор функций, которые позволили нам наложить данные об амилоидогенных регионах белков на их множественное выравнивание. Это позволило нам проследить, насколько консервативны амилоидные свойства и аминокислотный состав выровненных фрагментов белков. Консервативность амилоидных свойств в конкретной позиции выравнивания мы оценивали, как долю последовательностей, в которых соответствующая аминокислота включена в амилоидогенный участок, от всех последовательностей, где нет «пробела» (gap) в конкретной позиции. Для того чтобы избежать смещения расчётов в сторону наиболее представленных таксономических групп мы случайным образом оставляли в анализе только часть последовательностей из групп. Эту процедуру мы повторяли по 10 раз для каждого набора белков. В ходе анализа мы также собрали данные о наличии третичных структур в нуклеопоринах (база данных PDB) и наложили эти данные на выравнивания. Для образования амилоидных агрегатов важным требованием является неструктурированность склонного к агрегации участка белка. В дальнейшем участки с известной структурой мы исключали из рассмотрения.

При анализе результатов мы обращали внимание на гомологичные, согласно выравниванию, последовательности с высокой консервативностью амилоидных свойств, которые присутствуют у более чем половины проанализированных последовательностей, и находятся за пределами структурированных доменов белка. Среди гомологов белков Nup84 и Nup192 (белки без FG-повторов) мы не обнаружили подобных кандидатов. Аналогичные выводы мы сделали для белков Nup42, Nup1, Nup153, Nup2, Nup50, Nup58, Nup54, Nup145 и Nup60. При этом в случае Nup49 и Nup57 такие фрагменты были найдены. Для Nsp1 и Nup159 нам удалось обнаружить участки с консервативными амилоидными свойствами только для отдельных таксономических групп: Chordata и Ascomycota соответственно (рис. 24). Отдельно хотелось бы отметить, что в ряде случаев консервативность амилоидных свойств некоторых из таких последовательностей оказывалась выше, чем консервативность аминокислотной последовательности. Это может косвенно свидетельствовать, что в ходе эволюции при изменении

последовательности белка его склонность к агрегации могла сохраняться. Важно отметить, что Nup49 и Nup57, а также Nsp1 и Nup159 — это белки, которые располагаются непосредственно в канале ядерной поры и напрямую участвуют в образовании селективного барьера. Таким образом, можно предположить, что агрегация этих белков может иметь важное значение, поскольку соответствующее свойство сохраняется у многих видов.

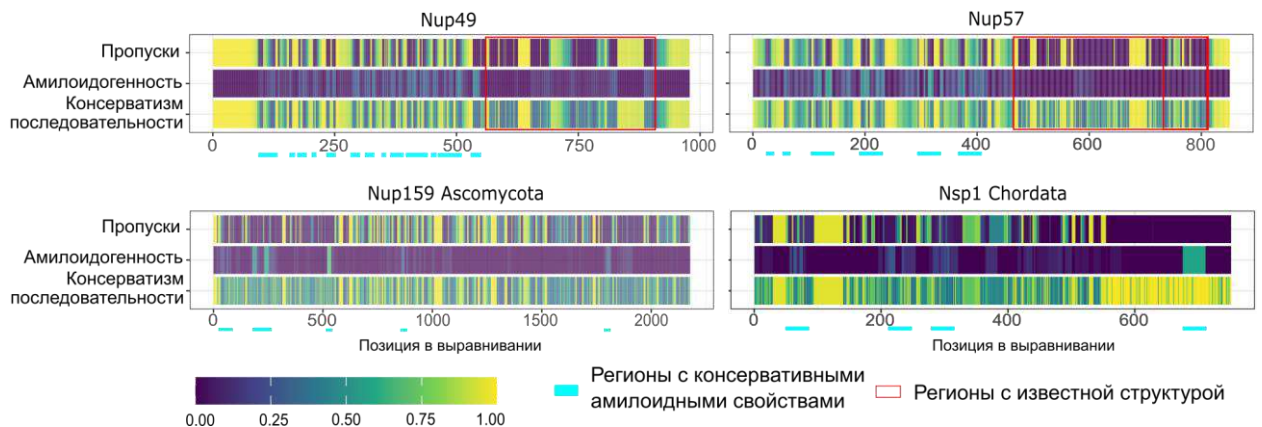


Рисунок 24 – Некоторые из нуклеопоринов с FG-повторами обладают участками с консервативными амилоидными свойствами. Цвета на схеме кодируют значения параметров, указанных слева, для отдельных позиций белкового выравнивания. Голубыми линиями отмечены участки с консервативными амилоидными свойствами. Красная рамка отделяет участки с известной структурой.

Отдельно в ходе работы нами были проанализированы последовательности дрожжевого белка Nup100 в нескольких дрожжевых штаммах: штамм SC288C (данный штамм является классическим референсом в исследованиях), а также 2 штамма 74-D694 и 15V-P4. Белок Nup100 является белковым детерминантом хорошо описанного приона [*NUP100*⁺] [59]. Согласно полученным результатам, мы можем наблюдать, что большое количество аминокислотных замен расположено после 400 аминокислоты (рис. 25). Непосредственно за агрегацию, согласно экспериментальным данным, отвечает участок с 200 по 400 а.к. [59]. Следует отметить, что мы обнаружили две структурно различных аллели гена *NUP100*. При этом в штамме 74-D694 присутствует уникальная химерная аллель, в которой последовательность вблизи N-конца белка идентична эталонной аллели из штамма S288C, а средняя и C-концевая части белка происходят от предковой аллели другого штамма (15V-P4). Набор мутаций, обнаруженный в этих штаммах, по-разному влияет на склонность фрагмента нуклеопорина *NUP100*₁₋₄₀₀ к агрегации, однако суммарный эффект все равно направлен на сохранение амилоидных свойств белка *NUP100*. Это может служить ещё одним доказательством того, что агрегация

нуклеопоринов может быть необходима в случае организации ядерно-цитоплазматического транспорта [13].

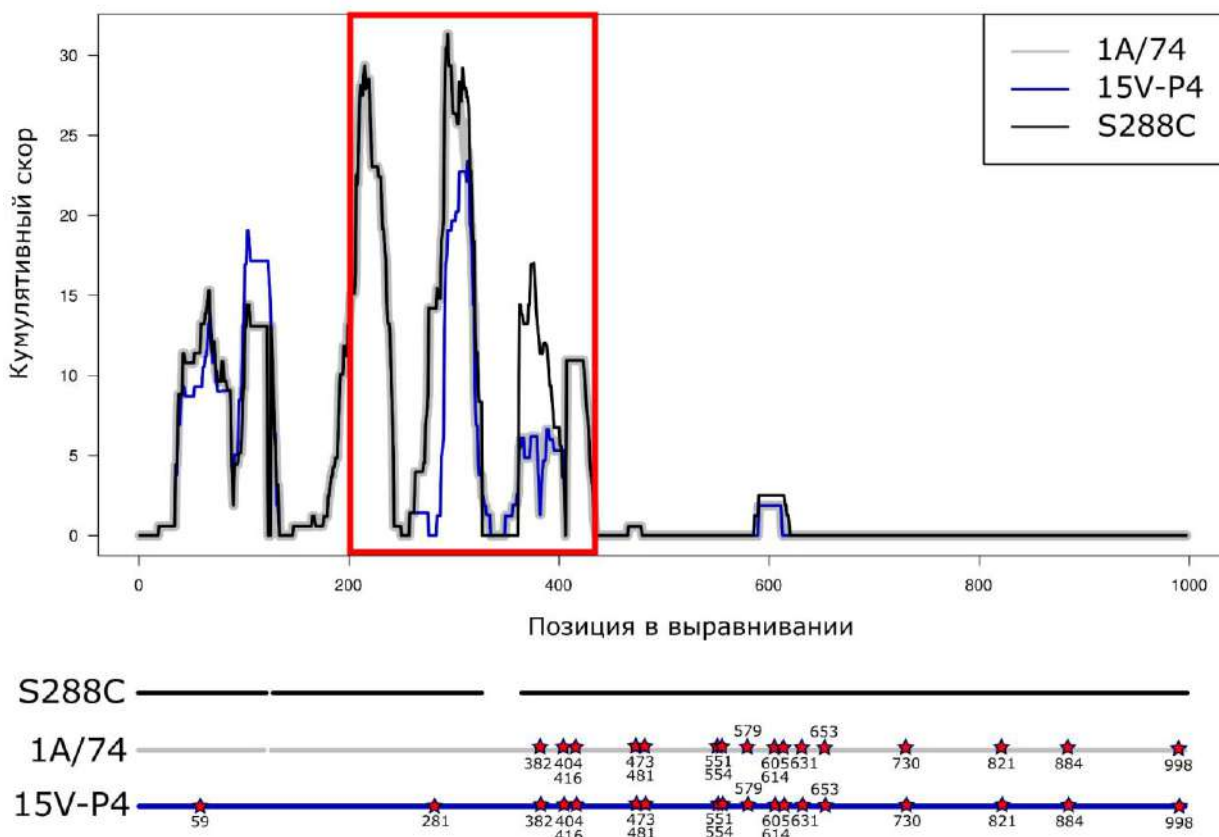


Рисунок 25. Дрожжевой белок Nup100 демонстрирует консервативность амилоидных свойств в различных штаммах дрожжей. Кумулятивный скор ArchCandy отражает способность белка образовывать β -арки, которые являются характерной чертой амилоидов. Красная рамка - прионный домен, необходимый для образования агрегатов. Разрывы в линиях обозначают положения делеций в соответствующих аллелях гена *NUP100*.

3.3.2 Белки нуклеопорины различных организмов демонстрируют амилоидогенные свойства в системе C-DAG

В ходе проведенного биоинформатического анализа нами было выявлено большое количество нуклеопоринов обладающих амилоидными свойствами. Для экспериментальных проверок нами было отобрано отдельные представители ортологов из различных организмов. Нами были отобраны ортологи, которые обладали наибольшим уровнем предсказанной амилоидогенности, а также принадлежали каким-либо модельным организмам. Соответствующие эксперименты были проведены совместно с Рогозой Татьяной Михайловной. Далее потенциально амилоидогенные фрагменты этих белков были клонированы в плазмиды серии pVS-GW для последующих проверок в

бактериальной системе C-DAG (см. Материалы и методы). Эксперимент в каждом случае был проведён для шести независимых трансформантов и в двух независимых повторностях.

Согласно полученным результатам клетки, продуцирующие фрагменты hsNup62₁₋₁₇₅, tgNup58₆₀₋₃₂₀, dmNup98₂₅₀₋₅₀₀ и spNup98₂₅₀₋₅₀₀, имеют красный цвет на среде с Конго красным (рис. 26).

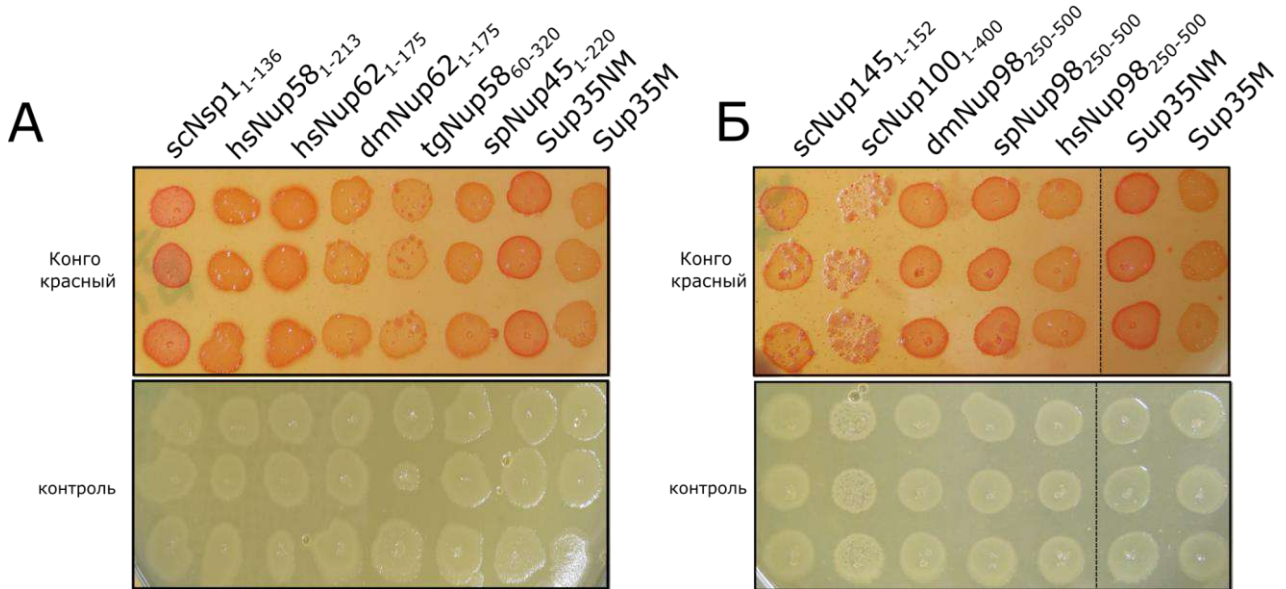


Рисунок 26 – Сверхпродукция нуклеопоринов различных видов приводит к окрашиванию клеток бактерий на среде с Конго красным. На панели А представлены результаты для ортологов дрожжевого белка Nsp1, для ортологов дрожжевого белка Nup145 (Nup100, Nup116) – на панели Б. Конго красный – среда с антибиотиками, красителем Конго красный и индукторами. Белки Sup35NM и Sup35M использовали в качестве положительного и отрицательного контроля. Время роста бактерий – 5 дней.

Наличие яблочно-зеленого двулучепреломления агрегатов, окрашенных Конго красным, является важным доказательством присутствия амилоидов. Нам удалось показать эту особенность только для клеток бактерий, продуцирующих фрагменты нуклеопоринов tgNup58₆₀₋₃₂₀, dmNup98₂₅₀₋₅₀₀ и spNup98₂₅₀₋₅₀₀ (рис. 27).

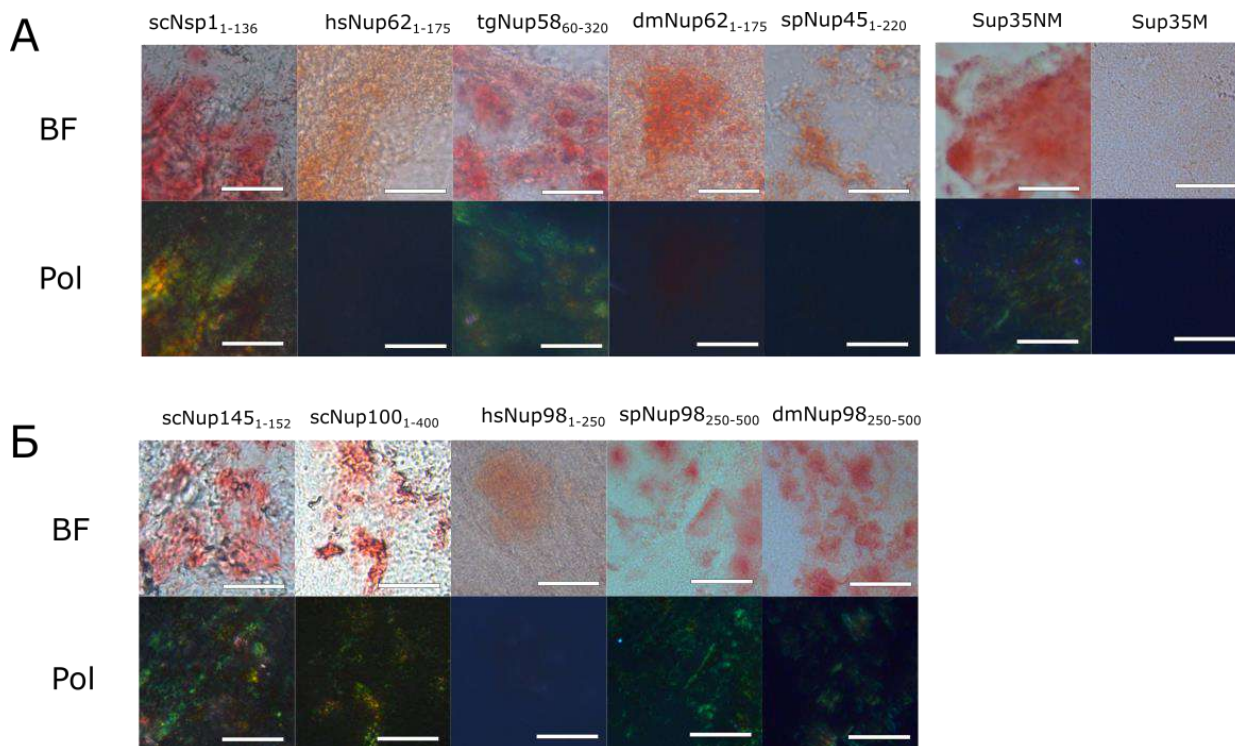


Рисунок 27 – Бактерии, продуцирующие фрагменты белков $tgNup58_{60-320}$, $dmNup98_{250-500}$ и $spNup98_{250-500}$, демонстрируют яблочно-зеленое свечение в поляризованном свете. На панели А представлены результаты для ортологов дрожжевого белка Nsp1, а для ортологов дрожжевого белка Nup145 (Nup100, Nup116) - на панели Б. На рисунке представлены фотографии в проходящем свете (BF) и в поляризованном свете (Pol) бактерий с чашек, представленных на рисунке 26. Белки Sup35NM и Sup35M взяты в качестве положительного и отрицательного контроля соответственно. Масштабная линейка 25 мкм.

На следующем этапе работы мы проверили наличие фибрилл на поверхности полученных трансформантов. Для этого мы использовали метод просвечивающей электронной микроскопии. Препараты были подготовлены так же, как и в экспериментах с дрожжевыми нуклеопоринами. В результате анализа препаратов мы смогли обнаружить фибриллы на препаратах с бактериями, продуцирующими белки $tgNup58_{60-320}$, $dmNup98_{250-500}$ и $spNup98_{250-500}$ (рис. 28), что совпадает с данными поляризационной микроскопии. Сходные результаты были получены для двух независимых трансформантов.

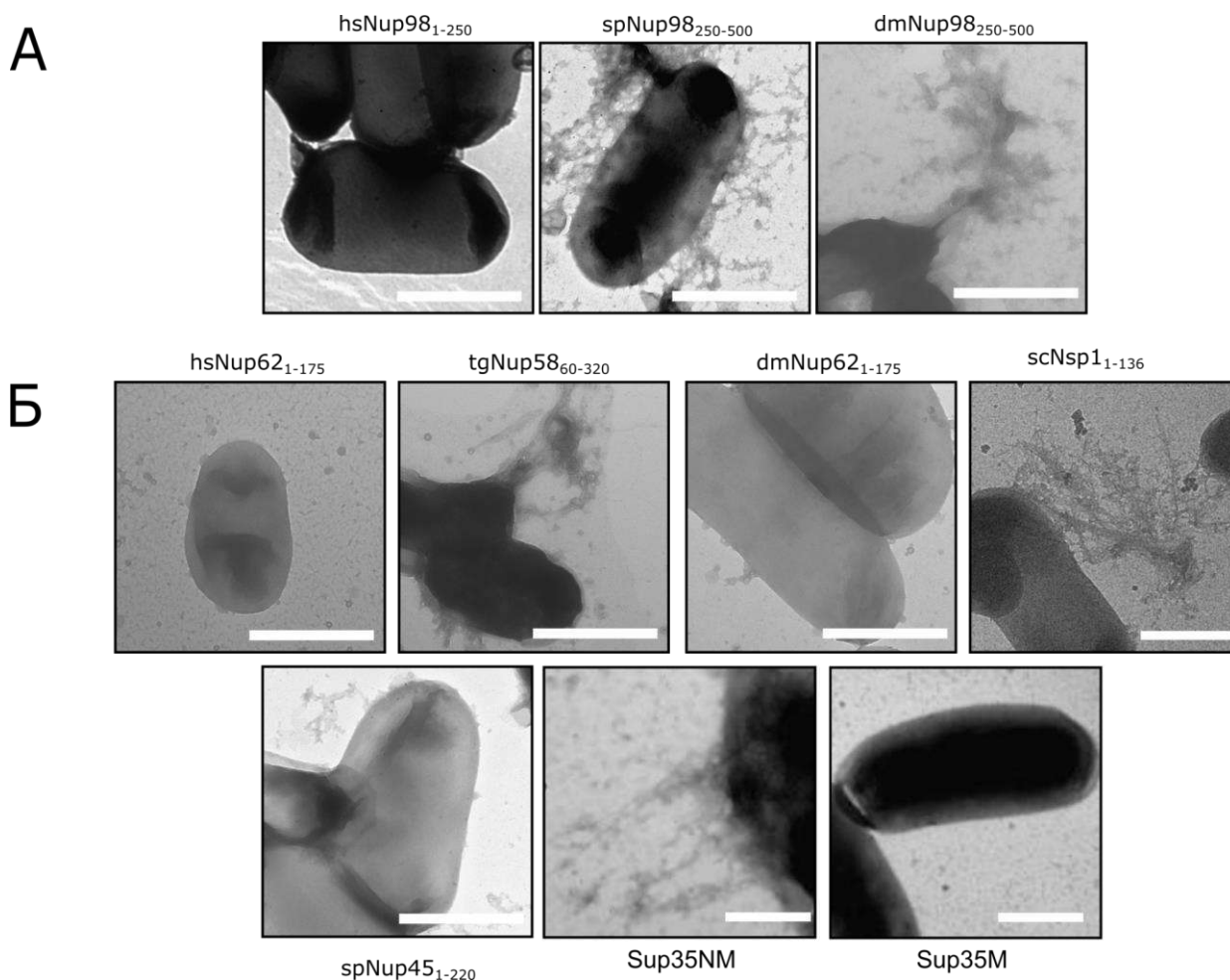


Рисунок 28 – Фрагменты нуклеопоринов $tgNup58_{60-320}$, $spNup98_{250-500}$ и $dmNup98_{250-500}$ образуют амилоидные агрегаты на поверхности клеток. На панели А представлены результаты для ортологов дрожжевого белка Nsp1, на панели Б – для ортологов дрожжевого белка Nup145 (Nup100, Nup116).

Обобщая результаты, полученные в бактериальной системе C-DAG, можно заключить, что фрагменты белков $tgNup58_{60-320}$, $spNup98_{250-500}$ и $dmNup98_{250-500}$ обладают амилоидными свойствами, что частично подтверждает консерватизм амилоидных свойств среди всех белков нуклеопоринов.

3.3.3 Белки нуклеопорины различных организмов демонстрируют амилоидогенные свойства в дрожжевой системе

В бактериальной системе C-DAG далеко не все из исследованных белков демонстрировали амилоидные свойства, что противоречило результатам биоинформатического анализа. В связи с этим мы решили провести дополнительную проверку способности исследуемых белков агрегировать с использованием дрожжевой модельной системы. Для это мы получили набор конструкций на основе pAG416-EGFP-ccdB для сверхпродукции исследуемых белков, слитых с EGFP. Этими конструкциями мы трансформировали штамм 74-D694 и проанализировали локализацию белков внутри

клеток. Для *tgNup58*₆₀₋₃₂₀ *spNup45*₁₋₂₂₀ *hsNup98*₁₋₂₅₀ *spNup98*₂₀₋₅₀₀ *dmNup98*₂₅₀₋₅₀₀ нам удалось детектировать флуоресцентные скопления белков. При этом в случаях с *tgNup58*₆₀₋₃₂₀ и *spNup45*₁₋₂₂₀ мы скорее наблюдали аморфные скопления белка (рис. 29).

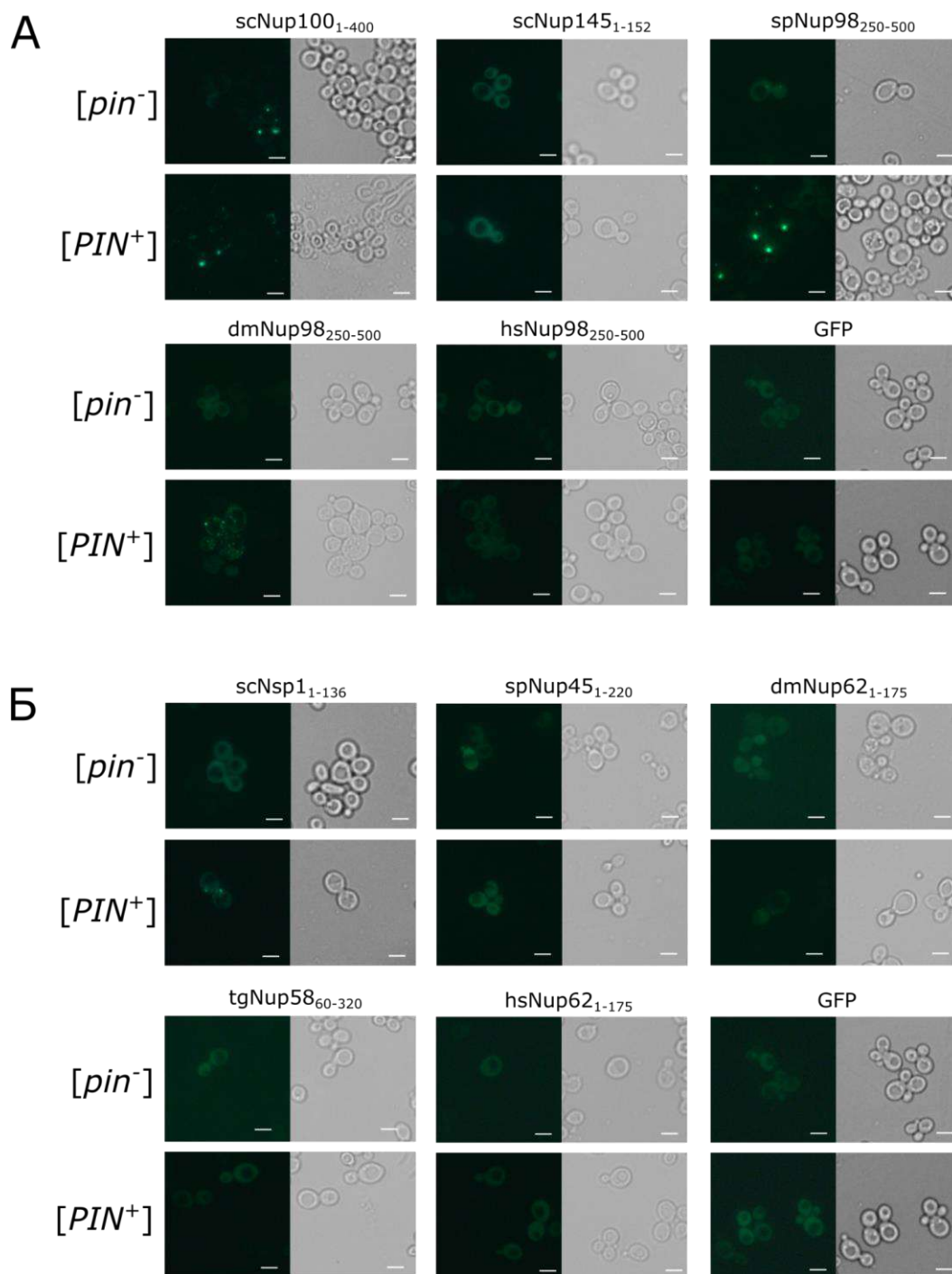


Рисунок 29 – Некоторые белки нуклеопорины агрегируют в клетках дрожжей: Микрофотографии белков ортологов Nup100 (А) и Nsp1 (Б), слитых с GFP, на которых были получены фрагменты нуклеопоринов, слитые с GFP. В качестве отрицательного контроля использовали только GFP. Масштабная линейка равна 25 мкм.

Обобщенные результаты проведенных проверок в бактериальной и дрожжевой модельных системах собраны в Таблице 8. Первое, на что мы вынуждены обратить

внимание, что не во всех случаях используемый нами критерий для предсказания амилоидных свойств сработал. Согласно оригинальной статье [6], наличие хотя бы одной бета-арки является критерием потенциальной амилоидогенности. Все проанализированные нами участки белков удовлетворяют этому критерию, однако не все демонстрируют хотя бы возможность агрегации. Этот факт, с одной стороны, может служить поводом, чтобы поставить под сомнение точность ArchCandy. С другой стороны, проведенных проверок в двух модельных системах недостаточно чтобы полностью исключить возможность того, что белок обладает амилоидогенными свойствами. Нельзя исключить и то, что исследуемые белки являются амилоидогенными, но в других условиях.

Таблица 8 – Проверка амилоидных свойств ортологов Nsp1 и Nup145.

Название конструкции	Красный цвет клеток на среде с Конго красным	Яблочно-зеленое двулучепреломления	Фибриллы на поверхности клеток	Агрегация в клетках дрожжей
scNup100 ₁₋₄₀₀	Да	Да	Нет	Да
scNup145 ₁₋₁₅₂	Да	Да	Да	Нет
scNsp1 ₁₋₁₃₆	Да	Да	Да	Да
hsNup62 ₁₋₁₇₅	Да	Нет	Нет	Нет
dmNup62 ₁₋₁₇₅	Нет	Нет	Нет	Нет
spNup45 ₁₋₂₂₀	Нет	Нет	Нет	Да
tgNup58 ₆₀₋₃₂₀	Да	Да	Да	Да
hsNup98 ₂₅₀₋₅₀₀	Нет	Нет	Нет	Да
dmNup98 ₂₅₀₋₅₀₀	Да	Да	Да	Да
spNup98 ₂₅₀₋₅₀₀	Да	Да	Да	Да

Сокращения в названиях конструкций: *dm* – *D. melanogaster*, *hs* – *H. sapiens*, *sc* – *S. cerevisiae*, *sp* – *S. pombe*, *tg* – *Taeniopygia guttata*. После номера белка приведены границы соответствующего участка. Например, *hsNup62*₁₋₁₇₅ обозначает фрагмент с 1 по 175 аминокислоту белка человека *Nup62*.

Не во всех случаях данные о склонности конкретного белка к агрегации совпадают для разных модельных систем. В частности, белки *spNup145*₁₋₂₂₀ и *hsNup98*₁₋₂₅₀ нельзя отнести к амилоидам по результатам C-DAG, но они образуют флуоресцентные фокусы

свечения в клетках дрожжей. Подобные наблюдения, вероятно, являются следствием различий в моделях: разным уровнем продукции белков, локализацией белков (в бактериях они импортируются из клетки, в дрожжах остаются в цитоплазме), а также принципиально разным набором проверок амилоидных свойств, которые проводят в этих системах. С нашей точки зрения, оптимальным в такой ситуации является комплексный подход. Следуя этой логике, наиболее вероятно, что белки tgNup58₆₀₋₃₂₀, dmNup98₂₅₀₋₅₀₀ и spNup98₂₅₀₋₅₀₀ могут формировать амилоидные агрегаты.

3.3.4 Оценка влияния приона [*PIN*⁺] на агрегацию нуклеопоринов

Агрегаты различных QN-богатых белков могут взаимодействовать друг с другом в дрожжевых клетках. В частности, агрегаты Rnq1, связанные с прионом [*PIN*⁺], необходимы для агрегации белка Sup35 *de novo* и индукции приона [*PSI*⁺] [36]. Для агрегации некоторых дрожжевых нуклеопоринов также требуется прион [*PIN*⁺] [59]. В рамках работы нами были проведены эксперименты по оценке влияния приона [*PIN*⁺] на агрегацию фрагментов дрожжевых нуклеопоринов NSP1₁₋₁₃₆ и Nup145₁₋₁₅₂, а также на агрегацию фрагментов нуклеопоринов других видов. Конструкция с фрагментом Nup100₁₋₄₀₀ выступала в роли положительного контроля, поскольку агрегация этого белка была ранее описана в литературе [59]. Два изогенных штамма 1-OT56 и 2-OT56, отличающиеся наличием приона [*PIN*⁺], были трансформированы плазмидами серии pAG416-EGFP ранее полученными в нашей лаборатории. В этих конструкциях последовательности, кодирующие фрагменты нуклеопоринов, находятся под контролем конститутивного GPD помотора (использование данного промотора позволяет увеличить количества белка в клетке) и слиты с EGFP. Для оценки влияния [*PIN*⁺] статуса на агрегацию белков нуклеопоринов клетки выращивали в селективной среде, и далее анализировали количество клеток, в которых наблюдали фокусы свечения, которые считались за агрегаты. В качестве отрицательного контроля (отсутствие агрегации использовался белок EGFP). В случае фрагментов нуклеопоринов Nup100₁₋₄₀₀ и Nsp1₁₋₁₃₆ мы могли наблюдать большое количество фокусов свечения, в то время как для остальных белков мы наблюдали их незначительное количество (рис. 29). Далее частоты встречаемости агрегатов были проанализированы с использованием точного критерия Фишера (результаты приведены в Таблице 9). Согласно полученным результатам, мы можем говорить, что наличие приона [*PIN*⁺] оказывает значимое влияние на частоту возникновения агрегатов фрагмента белка NSP1₁₋₁₃₆, в то время как для фрагмента белка Nup145₁₋₁₅₂ и остальных фрагментов такой зависимости не наблюдается (Таблица 9).

Таблица 9 – Дрожжевой фактор $[PIN^+]$ увеличивает частоту агрегации белковых фрагментов для дрожжевых нуклеопоринов Nup100₁₋₄₀₀ и NSP1₁₋₁₃₆.

Таблица содержит информацию о долях клеток с флуоресцентными агрегатами. Для сравнения долей клеток с агрегатами и без агрегатов использован точный критерий Фишера.

Конструкция	% клеток с фокусами свечения в $[PIN^+]$ штамме	% клеток с фокусами свечения в $[pin^-]$ штамме	Статистическая достоверность (p-value <0.05)
scNSP1 ₁₋₁₃₆	4,99 ± 0,835	0,0 ± 0,162	да
scNup100 ₁₋₄₀₀	52,11 ± 2,055	31,94 ± 1,687	да
scNup145 ₁₋₁₅₂	0,32 ± 0,227	0,16 ± 0,162	нет
hsNup62 ₁₋₁₇₅	0,0 ± 0,498	0,7 ± 0,312	нет
dmNup62 ₁₋₁₇₅	0,29 ± 0,211	0,0 ± 0,161	нет
spNup45 ₁₋₂₂₀	0,0 ± 0,16	0,16 ± 0,165	нет
tgNup58 ₆₀₋₃₂₀	0,0 ± 0,152	0,0 ± 0,139	нет
hsNup98 ₂₅₀₋₅₀₀	1,29 ± 0,455	0,48 ± 0,28	нет
dmNup98 ₂₅₀₋₅₀₀	2,75 ± 0,622	1,83 ± 0,525	нет
spNup98 ₂₅₀₋₅₀₀	3,50 ± 0,675	3,41 ± 0,699	нет

3.4. Влияние агрегации нуклеопоринов на ядерно-цитоплазматический транспорт

Так как белки нуклеопорины являются достаточно консервативными, и у некоторой их части сохраняются амилоидные свойства [31] нами было принято решение проанализировать влияние агрегации их фрагментов на ядерно-цитоплазматический транспорт. Для проведения анализа мы сконструировали специализированные конструкции на основе вектора pAG415GPD-ccdB-Cerulean. В него с помощью рекомбинационного клонирования были перенесены кодирующие последовательности фрагментов нуклеопоринов различных видов, которые являются ортологами дрожжевых

нуклеопоринов Nsp и Nup145, а также человеческого нуклеопорина NUP58. Стоит отметить, что для человеческого нуклеопорина NUP58 нет прямых ортологов у дрожжей. Таким ортологом является белок NUP62. Однако белки NUP58 и NUP62 являются паралогами и выполняют схожие функции. Такими ортологами являлись – Nup58 *Taeniopygia guttata* (фрагмент с 60 по 320 а.к.), Nup98 *Schizosaccharomyces pombe* (фрагмент с 250 по 500 а.к.) и Nup98 *Drosophila melanogaster* (фрагмент с 250 по 500 а.к.). Для сравнения влияния сверхпродукции фрагментов нуклеопоринов на ядерно-цитоплазматический транспорт в [*PIN*⁺] и [*pin*⁻] штаммах мы использовали штаммы OT56-NLS-GFP и 1-OT56-NLS-GFP и далее проводили эксперимент согласно описанию в Материалах и методах. Результаты эксперимента, проведенного для штамма 1-OT56-NLS-GFP показали, что значимое снижение ядерно-цитоплазматического транспорта по сравнению с контролем (ccdB) мы наблюдаем для следующего фрагмента белка нуклеопорина – spNup98₂₅₀₋₅₀₀ (p-value = 2.4*10⁻⁵) (Таблица 10). В то же самое время мы не наблюдаем различий для конструкции dmNup98₂₅₀₋₅₀₀ и tgNup58₆₀₋₃₂₀ (рис. 30), а также фрагментов дрожжевых белков.

Таблица 10 – Результаты теста Вилкоксона с поправкой Бенджамина-Хохберга для сравнения влияния на ядерно-цитоплазматический транспорт в штамме с прионом [*pin*]

Сравниваемая пара	Значение p-value
ccdB – dmNup98 ₂₅₀₋₅₀₀	0,39918
ccdB – spNup98 ₂₀₋₅₀₀	2,4*10 ⁻⁵
ccdB – tgNup58 ₆₀₋₃₂₀	0,11838
ccdB-scNsp1 ₁₋₁₃₆	0,11838
ccdB-scNup145 ₁₋₁₅₂	0,11838
Nsp1 – dmNup98 ₂₅₀₋₅₀₀	0,62691
Nsp1 – spNup98 ₂₀₋₅₀₀	0,00417
Nsp1 – tgNup58 ₆₀₋₃₂₀	0,80221
Nup145 – dmNup98 ₂₅₀₋₅₀₀	0,63569
Nup145 – spNup98 ₂₀₋₅₀₀	0,00019
Nup145 – tgNup58 ₆₀₋₃₂₀	0,67122

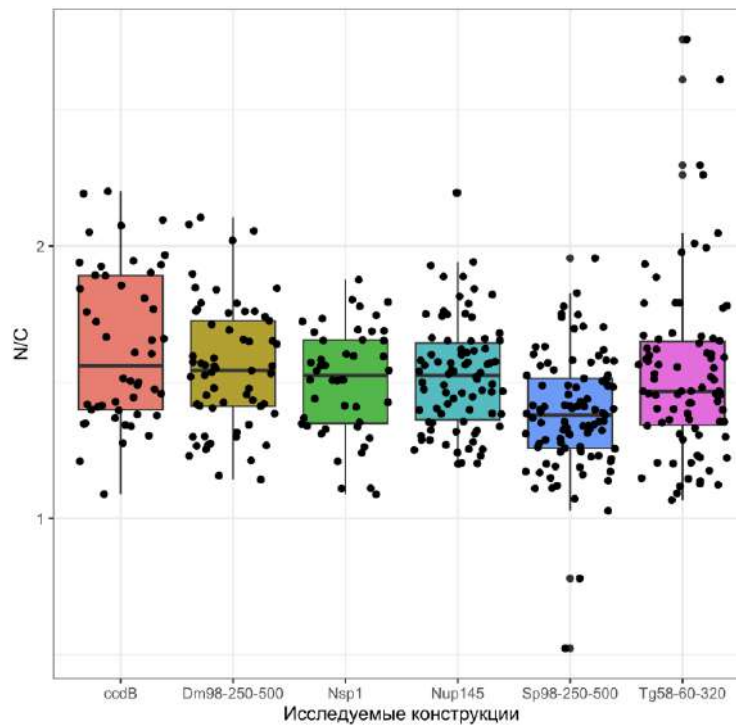


Рисунок 30 – Сверхпродукция амилоидогенных участков нуклеопоринов разных видов приводит к нарушению ядерного импорта в штамме не содержащего прион [*PIN*⁺]. На графике представлены отношения сигналов от NLS-GFP в ядре и цитоплазме (N/C). Наличие различий между группами выявляли с использованием критерия Вилкоксона и с последующим использованием поправки Бенджамина-Хохберга на множественные сравнения.

Аналогичный эксперимент был проведен и для штамма, несущего прион [*PIN*⁺]. В результате мы наблюдали снижение ядерно-цитоплазматического транспорта для всех конструкций по сравнению с контрольными образцами (в качестве контроля использовалась конструкция не несущая белка нуклеопорина – *ccdB*), а также по сравнению с фрагментами дрожжевых нуклеопоринов *Nsp1*₁₋₁₃₆ и *Nup145*₁₋₁₅₂ (рис. 32). Для сравнения использовался тест Вилкоксона с поправкой на множественные сравнения Бенджамина-Хохберга. Полученные значения уровней значимости для каждой пары сравнений приведены в Таблице 11.

Таблица 11 – Результаты теста Вилкоксона с поправкой Бенджамина-Хохберга для сравнения влияния на ядерно-цитоплазматический транспорт в штамме с прионом [*PIN*⁺]

Сравниваемая пара	Значение p-value
<i>ccdB</i> – <i>dmNup98</i> ₂₅₀₋₅₀₀	$< 2*10^{-16}$
<i>ccdB</i> – <i>spNup98</i> ₂₀₋₅₀₀	$< 2*10^{-16}$
<i>ccdB</i> – <i>tgNup58</i> ₆₀₋₃₂₀	$< 2*10^{-16}$
<i>ccdB-scNsp1</i> ₁₋₁₃₆	$< 2*10^{-16}$
<i>ccdB-scNup145</i> ₁₋₁₅₂	$< 2*10^{-16}$

Nsp1 – dmNup98 ₂₅₀₋₅₀₀	$1,5*10^{-11}$
Nsp1 – spNup98 ₂₀₋₅₀₀	$< 2*10^{-16}$
Nsp1 – tgNup58 ₆₀₋₃₂₀	$1,9*10^{-6}$
Nup145 – dmNup98 ₂₅₀₋₅₀₀	$< 2*10^{-16}$
Nup145 – spNup98 ₂₀₋₅₀₀	$< 2*10^{-16}$
Nup145 – tgNup58 ₆₀₋₃₂₀	$4,2*10^{-11}$

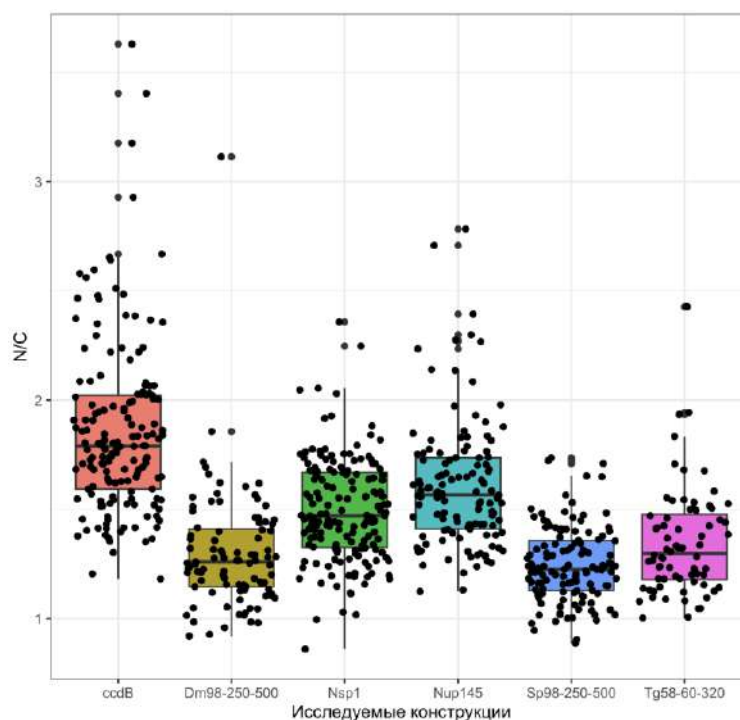


Рисунок 31 – Сверхпродукция амилоидогенных участков нуклеопоринов разных видов приводит к нарушению ядерного импорта в штамме с прионом [*PIN*⁺]. На графике представлены отношения сигналов от NLS-GFP в ядре и цитоплазме (N/C). Наличие различий между группами выявляли с использованием критерия Вилкоксона и с последующим использованием поправки Бенджамина-Хохберга на множественные сравнения.

Полученные результаты позволяют сделать предположение, что наличие приона [*PIN*⁺] может влиять на процессы ядерно-цитоплазматического транспорта. Для этого был проведен дополнительный анализ, а именно мы проверили отличается ли эффективность ядерно-цитоплазматического транспорта для фрагментов нуклеопоринов. В результате анализа было показано для белка spNup98₂₅₀₋₅₀₀ наличие приона [*PIN*⁺] влияет на показываем эффект на транспорт (рис. 31, таблица 11). В результате проведения теста Вилкоксона было показано, что наличие приона [*PIN*⁺] приводит к более сильному снижению ядерно-цитоплазматического транспорта ($p\text{-value} = 4,959*10^{-8}$). Также наличие приона [*PIN*⁺] влияет на силу снижения ядерно-цитоплазматического транспорта в случае сверхпродукции фрагментов нуклеопоринов dmNup98₂₅₀₋₅₀₀ ($p\text{-value} = 2,549*10^{-11}$) и

tgNup58₆₀₋₃₂₀ (p-value = $2,438 \cdot 10^{-5}$). Таким образом, мы можем говорить, что представленная система оценки ядерно-цитоплазматического транспорта зависит от присутствия фактора [*PIN*⁺], и наличие данного приона может оказывать влияние на ядерно-цитоплазматический транспорт в клетках дрожжей. Эксперименты в данном разделе проведены совместно с Рогозой Т.М.

ГЛАВА 4. Обсуждение

4.1 Амилоидные свойства белка человека NUP58

Результаты, полученные в рамках данной работы, впервые демонстрируют, что человеческий белок NUP58 может образовывать амилоиды в условиях *in vitro* и *in vivo*. Для подтверждения амилоидогенности белка необходимо, чтобы были выполнены следующие условия: наличие связывания со специфическими красителями, формирование фибрилл, устойчивых к ионным детергентам и протеазам в системах *in vivo* и *in vitro* [3]. В нашей работе показано, что белок NUP58 образует SDS-устойчивые агрегаты (рис. 9 и 11), которые в том числе устойчивы к обработке протеиназой К (рис. 13). Кроме того, полученные фибриллы этого белка взаимодействовали с амилоид-специфическими красителями (Тиофлавин Т и Конго красный) и демонстрировали характерные свойства: увеличение флуоресценции (рис. 15) и свечение в поляризованном свете (рис. 14). Интересным фактом является то, что в растворе обнаружено две формы агрегатов NUP58, отличающихся по размеру. При этом крупные агрегаты были чувствительны к обработке ВМЕ, который разрушает дисульфидные связи, в связи с чем их можно назвать полимерами (рис. 12). Мы предполагаем, что за это отвечают два остатка цистеина в NUP58 в положениях 252 и 521, расположенные вне предсказанной амилоидогенной области (1-213 а.к., рис. 5). Однако следует отметить, что в клетках дрожжей *S. cerevisiae* наблюдается агрегация фрагмента белка с 215 по 599 аминокислотный остаток. Несмотря на то, что данный факт согласуется с предсказаниями программы ArchCandy (рис. 5), это предположение требует дополнительных проверок и уточнений.

Более того, человеческий белок NUP58 демонстрирует амилоидные свойства в бактериальной системе C-DAG и образует флуоресцентные фокусы свечения в клетках дрожжей. Клетки бактерий, продуцирующие полноразмерный NUP58 или его амилоидогенную часть NUP58₁₋₂₁₃, могут образовывать на поверхности амилоидные агрегаты. Это подтверждается красным цветом колоний на среде, содержащей краситель Конго красный (рис. 16), яблочно-зеленым двулучепреломлением клеток в поляризованном свете (рис. 18) и белковыми фибриллами на поверхности бактериальных клеток, выявленными с помощью ТЭМ (рис. 17). Поскольку оба цистеина расположены вне фрагмента NUP58₁₋₂₁₃, демонстрирующего амилоидные свойства в системе C-DAG, мы пришли к выводу, что эти остатки не являются значимыми для амилоидогенеза белка. Поэтому нами выдвинуто предположение, что небольшие олигомеры, обнаруженные *in vitro* в присутствии ВМЕ, также являются амилоидами. Среди уже описанных амилоидов существует пример – β 2-микроглобулин, образование агрегатов которого происходит

также за счет формирования дисульфидных мостиков [44]. Частичный делеционный анализ белка NUP58 показал, что его фрагмент NUP58₁₋₉₅ проявляет амилоидные свойства как в системе C-DAG, так и в дрожжевой системе, что согласуется с предсказаниями ArchCandy (рис. 5). Это согласуется и с оценкой консервативности амилоидных свойств, анализ которых показал наличие консервативного участка с амилоидными свойствами в регионе 95 аминокислоты (рис. 6). Однако для однозначной локализации домена, отвечающего за агрегацию белка NUP58, необходимы дополнительные проверки. Во-первых, мы наблюдаем агрегацию фрагмента NUP58₂₁₅₋₅₉₉ в клетках *S. cerevisiae*, но не наблюдаем образования фибрилл и связывания с красителем Конго красным в системе C-DAG. Хотя в C-конце белка наблюдается повышенное содержание FG-повторов, что может способствовать агрегации в клетках дрожжей. Во-вторых, согласно предсказаниям программы ArchCandy (рис. 5) максимальный кумулятивный скор (оценку амилоидогенности) мы наблюдаем для участка с 175 по 213 аминокислоты, что также согласуется с оценкой консервативности амилоидных свойств (рис. 6).

Описанные характеристики белка человека NUP58 позволяют считать его новым амилоидом. Проведенный биоинформатический анализ ортологов белка NUP58 показал, что все они являются потенциальными амилоидами (рис. 6) [30]. В ходе этого анализа нами был выявлен фрагмент белка, который является амилоидогенным у многих ортологов и расположен вне области FG-повторов, предположительно, играющих ключевую роль в формировании селективного барьера внутри ядерной поры [48, 90, 116]. Примечательно, что консервативность белковой последовательности в этом фрагменте ниже, чем консервативность амилоидогенных свойств [30]. Это может свидетельствовать о том, что образование амилоидов внутри ЯПК является функциональным и необходимо для регуляции ядерно-цитоплазматического транспорта. Подобная идея была выдвинута ранее на основании доказательств образования амилоидов нуклеопоринами человека и дрожжей [104]. Таким образом, мы предполагаем, что выявленный фрагмент NUP58 с консервативной тенденцией к агрегации может играть важную роль в формировании селективного барьера при ЯПК.

4.2 Консервативность амилоидных свойств нуклеопоринов

В ходе проведенной работы нами было показано, что согласно биоинформатическим предсказаниям амилоидные свойства встречаются практически у всех ортологов белка человека NUP58. Стоит отметить, что группа белков нуклеопоринов обладает определенной консервативностью последовательности. По этой причине можно было ожидать сохранение амилоидных свойств. Частично это подтверждается изучением

прионных доменов белков дрожжей. Например, Nsp1, Nup42, Nup49, Nup57, Nup100 и Nup116 образовывали агрегаты *in vivo*. Почти во всех случаях данные агрегаты были устойчивы к SDS (исключение составлял белок Nup57), и только агрегаты фрагментов Nup100 и Nup116 взаимодействовали с Тиофлавином Т *in vitro* [10]. Поэтому важным этапом данной работы стало проведение анализа амилоидных свойств белков нуклеопоринов из разных таксономических групп. В ходе проведения биоинформатического анализа показано, что многие нуклеопорины из разных таксономических групп являются потенциальными амилоидами (рис. 24). Более того, для ортологов белков Nup49, Nup57, Nup159 и Nsp1 мы выявили консервативные области, которые обладали амилоидными свойствами согласно биоинформатическим предсказаниям (рис. 24). Сохранение амилоидных свойств среди ортологов также описано и для других белков, которые являются функциональными амилоидами: например, белок CREB [148], FXR1 [147] и белки содержащие RHM-мотивы [74].

Дальнейшие экспериментальные проверки показали, что фрагменты дрожжевых нуклеопоринов Nsp1₁₋₁₃₆ и Nup100₁₋₄₀₀ демонстрируют амилоидные свойства в системе C-DAG: красную окраску колоний на среде с красителем (рис. 26) и взаимодействие с красителем Конго красным с последующим яблочно-зеленым двулучепреломлением (рис. 27). Это согласуется с более ранними экспериментальными данными. Так, фрагмент дрожжевого белка Nsp1₁₋₁₇₅ образует устойчивые к детергенту агрегаты в дрожжевых клетках при сверхпродукции, а соответствующие агрегаты, полученные *in vitro*, окрашиваются красителем Тиофлавином Т [10]. Последовательность с 1 по 601 аминокислоту белка образует гидрогель *in vitro* [49], содержащий межмолекулярные β-листы, что является характерной особенностью амилоидных агрегатов [119]. Аналогичные результаты были получены для Nsp1₂₋₂₇₇ [4]. Было показано, что дрожжевой фрагмент Nup100₁₋₅₉₂ образует устойчивые к детергенту агрегаты в клетках и формирует агрегаты *in vitro*, которые окрашиваются Тиофлавином Т [10]. Дальнейший анализ этого белка показал, что более короткие фрагменты Nup100₁₋₂₀₀ и Nup100₂₀₁₋₄₀₀ белка способны к агрегации в дрожжах, а Nup100₃₀₀₋₄₀₀ образует фибриллы, которые окрашиваются Тиофлавином Т [59].

Большинство ортологов дрожжевых нуклеопоринов, для которых были продемонстрированы амилоидные свойства [10], обладали амилоидными свойствами согласно биоинформатическим предсказаниям. Нами были отобраны несколько белков нуклеопоринов для дальнейшего анализа проведены экспериментальные проверки в системе C-DAG и в дрожжевой системе. Эти проверки показали, что фрагменты только двух нуклеопоринов, являющихся ортологами дрожжевых, а именно dmNup98₂₅₀₋₅₀₀ и

spNup98₂₅₀₋₅₀₀, демонстрировали амилоидные свойства (таблица 8). Для них было характерно яблочно-зеленое свечение при окрашивании красителем Конго красным (рис. 27), формирование фибрилл на поверхности клеток (рис. 28), а также образование флуоресцентных фокусов свечения в клетках дрожжей (рис. 29). Аналогичные свойства демонстрируют и фрагменты дрожжевых нуклеопоринов scNup100₁₋₄₀₀ и scNSP1₁₋₁₃₆, что согласуется с литературными данными [4, 10, 59]. В то же время фрагмент нуклеопорина tgNup58₆₀₋₃₂₀, а также фрагмент белка нуклеопорина scNup145₁₋₁₅₂ демонстрируют амилоидные свойства только в системе C-DAG (рис. 26 и рис. 27). Полученные результаты по амилоидным свойствам нуклеопоринов не позволяют сделать однозначного вывода о распространенности амилоидных свойств среди всех нуклеопоринов. Несомненно, такие свойства присущи большому количеству представителей этого семейства белков, однако для этого необходимо проводить больше экспериментальных проверок. Кроме того, для таких проверок необходимо расширить список используемых систем (например, добавить культуры клеток человека), для более достоверных результатов, так как посттрансляционные модификации могут влиять на агрегацию белка [134].

4.3 Влияние агрегации нуклеопоринов на импорт макромолекул в ядро

Белки нуклеопорины с FG-повторами образуют селективный барьер внутри ЯПК. Это происходит за счет заполнения центрального канала ядерной поры неструктурированными доменами. Стоит отметить, что наличие таких доменов характерно для амилоидных белков. Небольшие молекулы легко проходят этот фильтр, но для крупных грузов необходимы взаимодействия со специфическими рецепторами ядерного транспорта, чтобы проходить через барьер благодаря способности взаимодействовать с FG-повторами. Ранее считали, что FG-повторы дрожжевого Nsp1 и других нуклеопоринов образуют стабильный гидрогель внутри ЯПК [4, 86, 135, 155]. Дальнейшие исследования показали наличие в гидрогелях характерных для амилоидов межмолекулярных β -листов [155]. Амилоидные фибриллы предположительно играют важную роль в формировании гидрогелей за счет наличия областей, содержащих FG-повторы для дрожжевого белка Nup49 и человеческого белка NUP153 [104].

Предположительно, агрегация белков нуклеопоринов может приводить к нарушению ядерно-цитоплазматического транспорта. При оценке влияния агрегации нуклеопоринов на ядерно-цитоплазматический транспорт в данном исследовании мы получили следующие результаты: фрагменты дрожжевых нуклеопоринов Nsp1₁₋₁₃₆ и Nup145₁₋₁₅₂ влияют на импорт макромолекул в ядро в штамме с прионом [*PIN*⁺]. Далее мы

проанализировали влияние агрегации ортологов дрожжевых нуклеопоринов Nup145 и Nsp1 из других организмов на ядерно-цитоплазматический транспорт. Для исследования мы использовали фрагменты tgNup58₆₀₋₃₂₀, spNup98₂₅₀₋₅₀₀ и dmNup98₂₅₀₋₅₀₀ для которых показаны амилоидные свойства в этой работе. В ходе работы мы выявили, что для всех фрагментов нуклеопоринов характерно снижение эффективности транспорта макромолекул из цитоплазмы в ядро клетки при наличии [*PIN*⁺] фактора (рис. 30 и рис. 31). Это можно объяснить тем, что в агрегаты белка Rnq1 включаются фрагменты белков нуклеопоринов, которые в свою очередь приводят к включению в состав агрегатов белков, отвечающих за ядерно-цитоплазматический транспорт. В случае отсутствия в штамме приона [*PIN*⁺] мы наблюдали эффект на транспорт только для одного фрагмента нуклеопорина, а именно spNup98₂₅₀₋₅₀₀. Для некоторых нейродегенеративных заболеваний (болезнь Хантингтона) описаны случаи секвестирования белков, отвечающих за ядерно-цитоплазматический транспорт, в состав агрегатов белка Htt [52]. В состав таких включений входят белки RanGAP1, Nup62 и Nup88, которые образуют внутриядерные включения совместно с белком НТТ [57]. Было показано, что в ходе развития различных нейродегенеративных заболеваний наблюдается комплексный эффект по нарушению транспорта мРНК в ядро. Это происходит из-за включения в состав агрегатов белков, отвечающих за транспорт мРНК в ядро, что приводит к нарушению клеточного гомеостаза [19, 37]. Возможно, что схожие процессы мы наблюдаем и в случае сверхпродукции фрагментов белков нуклеопоринов. В ходе этого процесса нарушается клеточный гомеостаз, часть белков, отвечающих за импорт макромолекул в ядро, связывается с фрагментами и не принимает участие в транспорте, в результате этого мы наблюдаем снижение уровня импорта макромолекул в ядро.

Полученные данные по эффекту сверхпродукции фрагментов нуклеопоринов на импорт макромолекул в ядро не позволяют сделать однозначного заключения. С одной стороны, существуют литературные данные о том, что белки нуклеопорины демонстрируют амилоидные свойства и могут образовывать гидрогели. Возможно, что сборка-разборка агрегатов в просвете ядерной поры может являться системой регуляции интенсивности транспорта. С другой стороны, сверхпродукция фрагмента белка нуклеопорина tgNup58₆₀₋₃₂₀ приводила к снижению импорта макромолекул в ядро, хотя этот фрагмент не агрегировал в клетках дрожжей. Этот факт может указывать на то, что изменение уровня отдельных белков нуклеопоринов также может влиять на процессы ядерно-цитоплазматического транспорта. Снижение эффективности импорта макромолекул в ядро происходит за счет изменения количества функциональных белков, отвечающих за процессы ядерно-цитоплазматического транспорта. Таким образом, на

сегодняшний день нет однозначного механизма влияния агрегации нуклеопоринов на ядерно-цитоплазматический транспорт. Вероятно, необратимая агрегация нуклеопоринов является скорее аномальным процессом и оказывает влияние на ядерно-цитоплазматический транспорт за счет включения белков, обеспечивающих транспорт, в состав агрегатов.

ВЫВОДЫ

1. Белок человека NUP58 обладает амилоидными свойствами в модельных системах и *in vitro*.
2. За агрегацию белка NUP58 отвечает N-концевой фрагмент белка, причем первых 95 а.к. достаточно для этого процесса.
3. Фрагменты нуклеопоринов Nup98 *Homo sapiens*, *Schizosaccharomyces pombe* и *Drosophila melanogaster* демонстрируют амилоидные свойства в модельных системах.
4. Сверхпродукция амилоидогенных фрагментов нуклеопоринов дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, а также других видов, приводит к нарушению транспорта макромолекул в ядро в клетках дрожжей в присутствии приона [*PIN*⁺].

Список литературы

1. Галкин, А. П. Идентификация и анализ взаимодействия прионов и амилоидов в протеоме дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*: дис. ... докт. биол. наук: 03.02.07. — СПб., 2015. — 205 с.
2. Инге-Вечтомов, С. Г. Селективные системы для получения рецессивных рибосомных супрессоров у дрожжей сахаромисетов / С. Г. Вечтомов, О. Н. Тиходеев, Т. С. Карпова // Генетика. — 1988. — Т. 24. — № 7. — С. 1159–1165.
3. Нижников, А.А. Амилоиды: от патогенеза к функции / А.А. Нижников, К.С. Антоненц, С.Г. Инге-Вечтомов // Биохимия. — 2015. — Т. 80. — № 9. — С. 1356—1375.
4. Ader, C. Amyloid-like interactions within nucleoporin FG hydrogels / C. Ader C., S. Frey, W. Maas, H. B. Schmidt, D. Görlich, M. Baldus // Proceedings of the National Academy of Sciences. — 2010. — Vol. 107. — No. 14. — P. 6281–6285.
5. Aguzzi, A. Molecular mechanisms of prion pathogenesis / A. Aguzzi, C. Sigurdson, M. Heikenwaelder // Annual Review of Pathology-mechanisms of Disease. — 2008. — Vol. 3. — No. 11. — P. 67–97.
6. Ahmed, A. B. A structure-based approach to predict predisposition to amyloidosis / A. B. Ahmed, N. Znassi, M. T. Château, A. V. Kajava // Alzheimer's and Dementia. — 2015. — Vol. 11. — No. 6. — P. 681–690.
7. Ahmed, A. B. Breaking the amyloidogenicity code: Methods to predict amyloids from amino acid sequence / A. B. Ahmed, A. V. Kajava // FEBS Letters. — 2013. — Vol. 587. — No. 8. — P. 1089–1095.
8. Aïmanianda, V. The dual activity responsible for the elongation and branching of β -(1,3)-glucan in the fungal cell wall / V. Aïmanianda, C. Simenel, C. Garnaud, C. Clavaud, R. Tada, L. Barbin, I. Mouyna, C. Heddergott, L. Popolo, Y. Ohya, M. Delepierre, J. Latge // MBio. — 2017. — Vol. 8. — No. 3. — P. 1–14.
9. Alber, F. The molecular architecture of the nuclear pore complex / F. Alber, S. Dokudovskaya, L.M. Veenhoff, W. Zhang, J. Kipper, D. Devos, A. Suprpto, O. Karni-Schmidt, R. Williams, B.T. Chait, A. Sali, M. P. Rout // Nature. — 2007. — Vol. 450. — No. 7170. — P. 695-701.
10. Alberti, S. A systematic survey identifies prions and illuminates sequence features of prionogenic proteins / S. Alberti, R. Halfmann, O. King, A. Kapila, S. Lindquist // Cell. — 2009. — Vol. 137. — P. 146–158.
11. Alteri, C. J. *Mycobacterium tuberculosis* produces pili during human infection / C. J. Alteri, J. Xicohténcatl-Cortes, S. Hess, G. Caballero-Olín, J. A.Giron, R. L. Friedman //

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. — 2007. — Vol. 104. — No. 12. — P. 5145–5150.
12. Antonets, K.S. Accumulation of storage proteins in plant seeds is mediated by amyloid formation / K.S. Antonets, M.V. Belousov, A.I. Sulatskaya, M.E. Belousova, A.O. Kosolapova, M.I. Sulatsky // PLoS Biology. — 2020. — Vol. 18. — No 7. — P. e3000564.
 13. Barbitoff, Y.A. Chromosome-level genome assembly and structural variant analysis of two laboratory yeast strains from the Peterhof Genetic Collection lineage / Y.A. Barbitoff, A.G. Matveenko, A.B. Matiiv, E.M. Maksiutenko, S.E. Moskalenko, P.B. Drozdova, D.E. Polev, A.Y. Beliavskaia, L.G. Danilov, A.V. Predeus, G.A. Zhouravleva // G3 Genes|Genomes|Genetics. — 2021. — Vol. 11. — P. jkab029.
 14. Barnhart, M. M. Curli biogenesis and function / M. M. Barnhart, M. R. Chapman // Annual review of microbiology. — 2006. — Vol. 60. — P. 131–147.
 15. Bates, G. P. et al. Huntington disease / G.P. Bates, R. Dorsey, J. F. Gusella, M. R. Hayden, C. Kay, B. R. Leavitt, M. Nance, C.A. Ross, R. I. Scahill, R. Wetzel, E. J. Wild, S. J. Tabrizi // Nature Reviews Disease Primers. — 2015. — Vol. 1. — P. 1–21.
 16. Baxa U. Structural basis of infectious and non-infectious amyloids / U. Baxa // Current Alzheimer research. — 2008. — Vol. 5. — No. 3. — P. 308–18.
 17. Bian Z., Normark S. Nucleator function of CsgB for the assembly of adhesive surface organelles in *Escherichia coli* / Z. Bian, S. Normark // The EMBO Journal. — 1997. — Vol. 16. — No. 19. — P. 5827– 5836.
 18. Birsa, N. Cytoplasmic functions of TDP-43 and FUS and their role in ALS / N. Birsa, M.P. Bentham, P. Fratta // Seminars in Cell and Developmental Biology. — 2020. — Vol. 99. — P. 193-201.
 19. Bitetto, G. Nucleo–cytoplasmic transport defects and protein aggregates in neurodegeneration / G. Bitetto, A. Di Fonzo // Translational Neurodegeneration. — 2020. — Vol. 9. — No. 1. — P. 25.
 20. Bradford, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / M. Bradford// Analytic Biochemistry. — 1976. — Vol. 72. — P. 248–54.
 21. Bondarev, S.A. Protein co-aggregation related to amyloids: methods of investigation, diversity, and classification / S.A. Bondarev, K.S. Antonets, A.V. Kajava, A.A. Nizhnikov, G.A. Zhouravleva // International Journal of Molecular Sciences. — 2018. — Vol. 19. — No. 8. — P. 2292.
 22. Bondarev, S.A. Structure-based view on $[PSI^+]$ prion properties / S.A. Bondarev, G.A. Zhouravleva, M.V. Belousov, A.V. Kajava // Prion. — 2015. — Vol. 9. — No. 1. — P.190-

- 199.
23. Cao, Q. Amyloid precursor proteins anchor CPEB to membranes and promote polyadenylation-induced translation / Q. Cao, Y.-S. Huang, M.-C. Kan, J. D. Richter // *Molecular and cellular biology*. – 2005. – Vol. 25. – No. 24. – P. 10930–10939.
 24. Chabelskaya, S. Inactivation of NMD increases viability of *sup45* nonsense mutants in *Saccharomyces cerevisiae* / S. Chabelskaya, V. Gryzina, S. Moskalenko, C. Le Goff, G. Zhouravleva // *BMC molecular biology*. – 2007. – Vol. 8. – P. 71.
 25. Chandramowliswaran, P. Mammalian amyloidogenic proteins promote prion nucleation in yeast / P. Chandramowliswaran, M. Sun, K. L. Casey, A. V. Romanyuk, A. V. Grizel, J. V. Sopova, A. A. Rubel, C. Nussbaum-Krammer, I. M. Vorberg, Y. O. Chernoff // *Journal of Biological Chemistry*. – 2018. – No. 293. – P. 3436–3450.
 26. Chapman, M. R. Role of *Escherichia coli* curlin operons in directing amyloid fiber formation / M. R. Chapman, L. S. Robinson, J. S. Pinkner, R. Roth, J. Heuser, M. Hammar, S. Normark, S. J. Hultgren // *Science*. – 2002. – Vol. 295. – No. 5556. – P. 851–855.
 27. Chiti, F. Protein misfolding, functional amyloid, and human disease / F. Chiti, C.M. Dobson // *Annual Review of Biochemistry*. – 2006. – Vol. 75. – P. 333–366.
 28. Chou, C.C. TDP-43 pathology disrupts nuclear pore complexes and nucleocytoplasmic transport in ALS/FTD / C.C.Chou, Y. Zhang, M.E. Umoh // *Nature Neuroscience*. – 2018. – Vol. 21. – P. 228–239.
 29. Coustou, V. The protein product of the Het-s heterokaryon incompatibility gene of the fungus *Podospora anserina* behaves as a prion analog / V. Coustou, C. Deleu, S. Saupe, J. Begueret // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1997. – Vol. 94. – No. 18. – P. 9773–9778.
 30. Danilov, L.G. The human NUP58 nucleoporin can form amyloids *in vitro* and *in vivo* / L.G. Danilov, S.E. Moskalenko, A.G. Matveenko, X.V. Sukhanova, M.V. Belousov, G.A. Zhouravleva, S.A. Bondarev // *Biomedicines*. – 2021. – Vol. 9. – P. 1451.
 31. Danilov, L.G. Identification of new FG-repeat nucleoporins with amyloid properties / L.G. Danilov, X.V. Sukhanova, T.M. Rogoza, E.Y. Antonova, N.P. Trubitsina, G.A. Zhouravleva, S.A. Bondarev // *International Journal of Molecular Science*. – 2023. – Vol. 24 – P. 8571.
 32. Dawson, H. N. Loss of Tau elicits axonal degeneration in a mouse model of Alzheimer's disease / H. N. Dawson, V. Cantillana, M. P. Vitek, D. M. Wilcock, J. R. Lynch, D. T. Laskowitz // *Neuroscience*. – 2010. – V. 169. – No. 1. – P. 516–531.
 33. Denning, D.P. Disorder in the nuclear pore complex: the FG repeat regions of

- nucleoporins are natively unfolded / D.P. Denning, S.S. Patel, V. Uversky, A.L. Fink, M. Rexach // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2003. – V.100. – No. 5. – P. 2450-2455.
34. DePace, A.H. A critical role for amino-terminal glutamine/asparagine repeats in the formation and propagation of a yeast prion / A.H. DePace, A. Santoso, P. Hillner, J.S. Weissman // *Cell*. – 1998. – Vol. 93. – No. 7. – P. 1241-1252.
35. Derkatch, I. L. Genesis and variability of $[PSI^+]$ prion factors in *Saccharomyces cerevisiae* / I. L. Derkatch, Y. O. Chernoff, V. V. Kushnirov, S. G. Inge-Vechtomov, S. W. Liebman // *Genetics*. – 1996. – Vol. 144. – No. 4. – P. 1375-1386.
36. Derkatch, I. L. Prions affect the appearance of other prions: the story of $[PIN^+]$ / I. L. Derkatch, M. E. Bradley, J. Y. Hong, S. W. Liebman // *Cell*. – 2001. – Vol. 106. – No. 2. – P. 171–182.
37. Ding, B. Nucleocytoplasmic transport: regulatory mechanisms and the implications in neurodegeneration / B. Ding, M. Sepehrimanesh // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2021. – Vol. 22. – No.8. – P. 4165.
38. Dosztányi, Z. IUPred: Web server for the prediction of intrinsically unstructured regions of proteins based on estimated energy content / Z. Dosztányi, V. Csizmok, P. Tompa, I. Simon // *Bioinformatics*. – 2005. – Vol. 21. – No. 16. – P. 3433-3434.
39. Dueholm, M. S. Functional amyloid in *Pseudomonas* / M. S. Dueholm, S. V. Petersen, M. Sønderkær, P. Larsen, G. Christiansen, K. L. Hein, ... & D. E. Otzen // *Molecular Microbiology*. – 2010. – Vol. 77. – No. 4. – P. 1009-1020.
40. Dultz, E. Live imaging of single nuclear pores reveals unique assembly kinetics and mechanism in interphase / E. Dultz, J. Ellenberg // *Journal of Cell Biology*. – 2010. – Vol. 191. – No. 1. – P. 15-22.
41. Ed, H. Towards understanding nuclear pore complex architecture and dynamics in the age of integrative structural analysis / H. Ed, B. Martin // *Current Opinion in Cell Biology*. – 2015. – Vol. 34. – P. 31–38.
42. Edgar, R. C. MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput / R.C. Edgar // *Nucleic Acids Research*. – 2004. – Vol. 32. – No. 5. – P. 1792–1797.
43. Ehud, C. Opposing activities protect against age onset proteotoxicity / C. Ehud, B. Jan, M. P. Rhonda, W. K. Jeffery, D. Andrew // *Science*. – 2006. – Vol. 313. – P. 1604-1610.
44. Eichner, T. Understanding the complex mechanisms of β 2-microglobulin amyloid assembly / T. Eichner, S.E. Radford // *The FEBS Journal*. – 2011. – Vol. 278. – P.

- 3868–3883.
45. Elliot, M. A. The chaplins: A family of hydrophobic cell-surface proteins involved in aerial mycelium formation in *Streptomyces coelicolor* / M. A. Elliot, N. Karoonuthaisiri, J. Huang, M. J. Bibb, S. N. Cohen, C. M. Kao, M. J. Buttner // *Genes and Development*. – 2003. – Vol. 17. – No. 14. – P. 1727-1740.
 46. Feoktistova, M. cIAPs Block Ripoptosome Formation, a RIP1/Caspase-8 Containing Intracellular Cell Death Complex Differentially Regulated by cFLIP Isoforms / M. Feoktistova, P. Geserick, B. Kellert, D. Dimitrova, C. Langlais, M. Hupe, K. Cain, M. MacFarlane, G. Häcker, M. Leverkus // *Molecular Cell*. – 2011. – Vol. 43. – No. 3. – P. 449-463.
 47. Fowler, D. M. Functional amyloid formation within mammalian tissue / D. M. Fowler, A. V. Koulov, C. Alory-Jost, M. S. Marks, W. E. Balch, J. W. Kelly // *PLoS Biology*. – 2006. – Vol. 4. – No. 1. – P. 100-107.
 48. Fragasso, A. A designer FG-Nup that reconstitutes the selective transport barrier of the nuclear pore complex / A. Fragasso, H.W. de Vries, J. Andersson, E.O. van der Sluis, E. van der Giessen, A. Dahlin, P.R. Onck, C. Dekker // *Nature Communications*. – 2021. – Vol. 12. – P. 2010.
 49. Frey, S. A saturated FG-repeat hydrogel can reproduce the permeability properties of nuclear pore complexes / S.Frey, D. Görlich // *Cell*. – 2007. – Vol. 130. – No. 3. – P. 512-523.
 50. Frey, S. FG-rich repeats of nuclear pore proteins form a three-dimensional meshwork with hydrogel-like properties / S. Frey, R.P. Richter, D. Görlich // *Science*. – 2006. – Vol. 314. – P. 815–817.
 51. Gasset-Rosa, F. Cytoplasmic TDP-43 de-mixing independent of stress granules drives inhibition of nuclear import, loss of nuclear TDP-43, and cell death / F. Gasset-Rosa, S. Lu, H. Yu, C. Chen, ... & D.W. Cleveland // *Neuron* – 2019. – Vol. 102. – No. 2. – P. 339-357.
 52. Gasset-Rosa, F. Polyglutamine-expanded Huntingtin exacerbates age-related disruption of nuclear integrity and nucleocytoplasmic transport / F. Gasset-Rosa, C. Chillón-Marinas, A. Goginashvili, R.S. Atwal, ... & C. Lagier-Tourenne // *Neuron*. – 2017. – Vol. 94. – No. 1. – P. 48-57.
 53. Gibson, D. L. AgfC and AgfE facilitate extracellular thin aggregative fimbriae synthesis in *Salmonella Enteritidis* / D. L. Gibson, A. P. White, C. M. Rajotte, W. W. Kay // *Microbiology*. – 2007. – Vol. 153. – No. 4. – P. 1131-1140.
 54. Goedert, M. 100 years of Lewy pathology / M. Goedert, M. G. Spillantini, K. D.

- Tredici, H. Braak // *Nature Reviews Neurology*. – 2013. – Vol. 1. – P. 13–24.
55. Gour, S. Antimicrobial peptide (CnAMP2) from liquid endosperm of *Cocos nucifera* forms amyloidlike fibrillar structure / S. Gour, V. Kaushik, V. Kumar, P. Bhat, S.C.Yadav, J.K. Yadav // *The Journal of Peptide Science*. – 2016. – Vol. 22. – No. 4. – P. 201–207.
56. Goyal, P. Structural and mechanistic insights into the bacterial amyloid secretion channel CsgG / P. Goyal, P. V. Krasteva, N. Van Gerven, F. Gubellini, I. Van den Broeck, A. Troupiotis-Tsaïlaki, ... & H. Remaut // *Nature*. – 2014. – Vol. 516. – No. 7530. – P. 250-253.
57. Grima, J.C. Mutant Huntingtin disrupts the nuclear pore complex / J.C. Grima, J.G. Daigle, N. Arbez, K.C. Cunningham, ... & J.D. Rothstein. // *Neuron*. – 2017. – Vol. 94. – No. 1. – P. 93-107.
58. Halfmann, R. Screening for amyloid aggregation by Semi-Denaturing Detergent-Agarose Gel Electrophoresis / R. Halfmann, S. Lindquist // *Journal of visualized experiments: JoVE*. – 2009. – Vol. 17. – No. 2008. – P. 1-4.
59. Halfmann, R. Prion formation by a yeast GLFG nucleoporin / R. Halfmann, J.J.R. Wright, S. Alberti, S. Lindquist, M. Rexach // *Prion*. – 2012. – Vol. 6. – P. 391–399.
60. Hammar, M. Nucleator-dependent intercellular assembly of adhesive curli organelles in *Escherichia coli* / M. Hammar, Z. Bian, S. Normark // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1996. – Vol. 93. – No. 13. – P. 6562–6566.
61. Hartono, Nucleoporin Nup58 localizes to centrosomes and mid-bodies during mitosis / Hartono, M. Hazawa, K. S. Lim, F. R. Dewi, A. Kobayashi, R. W. Wong // *Cell Division*. – 2019. – Vol. 14. – No. 1. – P. 1-13.
62. Hee, J. Melanosomal formation of PMEL core amyloid is driven by aromatic residues / J. Hee, S. Mitchell, X. Liu, R. Leonhardt // *Science Report*. – 2011. – Vol. 7. – No. 1. – P. 1-12.
63. Hoelz, A. The structure of the nuclear pore complex / A. Hoelz, E. W. Debler, G. Blobel // *Annual Review of Biochemistry*. – 2011. – Vol. 80. – No. 1. – P. 613-643.
64. Hofer, S. Studying Huntington's disease in yeast: from mechanisms to pharmacological approaches / S. Hofer, K. Kainz, A. Zimmermann, M.A. Bauer, T. Pendl, M. Poglitsch, F. Madeo and D. Carmona-Gutierrez // *Frontiers in Molecular Neuroscience*. – 2018. – V. 11. – P. 318.
65. Huerta-Cepas J., eggNOG 5.0: a hierarchical, functionally and phylogenetically annotated orthology resource based on 5090 organisms and 2502 viruses / J. Huerta-

- Cepas, D. Szklarczyk, D. Heller, A. Hernández-Plaza, S. K. Forslund, H. Cook, D. R. Mende, I. Letunic, T. Rattei, L. J. Jensen, C. von Mering and P. Bork // *Nucleic Acids Research*. – 2019. – Vol. 47. – No. 1. – P. 309–314.
66. Humenik, M. Ion and seed dependent fibril assembly of a spidroin core domain / M. Humenik, A. M. Smith, S. Arndt, T. Scheibel // *Journal of Structural Biology*. – 2015. – Vol. 191. – No. 2. – P. 130-138.
67. Iconomidou, V.A. Amyloids protect the silkworm oocyte and embryo / V.A. Iconomidou, G. Vriend, S.J. Hamodrakas // *FEBS Letters*. – 2000. – Vol. 479. – No. 3. – P. 141–145.
68. Isgro, T. A. Cse1p-binding dynamics reveal a binding pattern for FG-repeat nucleoporins on transport receptors / T. A. Isgro, K. Schulten // *Cell Press*. – 2007. – Vol. 15. – No. 8. – P. 977-991.
69. IUPAC-IUB JCBN. IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN). Nomenclature and symbolism for amino acids and peptides. Recommendations 1983 // *The Biochemical journal*. – 1984. – Vol. 219. – No. 2. – P. 345-73.
70. Jackson, M.P. Why are functional amyloids non-toxic in humans? / M.P. Jackson, E.W. Hewitt // *Biomolecules*. – 2017. – Vol. 7. – No. 4. – P. 71.
71. Jeener, J. Investigation of exchange processes by two-dimensional NMR spectroscopy / J. Jeener, B. H. Meier, P. Bachmann, R. R. Ernst // *The Journal of Chemical Physics*. – 1979. – Vol. 71. – No. 11. – P. 4546–4553.
72. Kaiser C., Michaelis S., Mitchell A. *Methods in Yeast Genetics*. – NY: CSHL PRESS, 1994. – 234 pp.
73. Kajava, A. V. β -Arcades: Recurring Motifs in Naturally Occurring and Disease-Related Amyloid Fibrils / A. V. Kajava, U. Baxa, A. C. Steven // *The FASEB Journal*. – 2010. – Vol. 24. – No. 5. – P. 1311-1319.
74. Kajava, A.V. Evolutionary link between metazoan RHIM motif and prion-forming domain of fungal heterokaryon incompatibility factor HET-s/HET-s / A.V. Kajava, K. Klopffleisch, S. Chen, K. Hofmann // *Scientific Reports*. – 2014. – Vol. 4. – P. 7436.
75. Kalebina, T. Amyloid-like properties of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall glucantransferase Bgl2 / T. Kalebina, T. Plotnikova, A. Gorkovskii, I. Selyakh, O. V. Galzitskaya, E. Bezsonov, G. Gellissen, I. Kulaev // *Prion*. – 2008. – Vol. 2. – No. 2. – P. 91–96.
76. Kaye, R. Molecular mechanisms of amyloid oligomers toxicity / R. Kaye, C. A. Lasagna-Reeves // *Journal of Alzheimer's Disease*. – 2013. – Vol. 33. – No. 1. – P. S67-S78.

77. Kelley, J. B. Fluorescence-based quantification of nucleocytoplasmic transport / J. B. Kelley, B. M. Paschal // *Methods*. – 2019. – Vol. 157 – P. 106-114.
78. Khan, A. U. Role of Nucleoporins and Transport Receptors in Cell Differentiation / A. U. Khan, R. Qu, J. Ouyang, J. Dai // *Frontiers in Physiology*. – 2020. – P. 239-251.
79. Knowles, T. P. J. The amyloid state and its association with protein misfolding diseases / T. P. J. Knowles, M. Vendruscolo, C. M. Dobson // *Nature reviews: Molecular cell biology*. – 2014. – Vol. 15. – No. 6. – P. 384-396.
80. Koh, J. Allosteric regulation in gating the central channel of the nuclear pore complex / J. Koh, G. Blobel // *Cell*. – 2015. – Vol. 161. – No. 6. – P. 1361–1373.
81. Kryndushkin, D. S. Yeast [*PSI*⁺] prion aggregates are formed by small Sup35 polymers fragmented by Hsp104 / D. S. Kryndushkin, I. M. Alexandrov, M. D. Ter-Avanesyan, V. V. Kushnirov // *The Journal of biological chemistry*. – 2003. – Vol. 278. – No. 49. – P. 49636-49643.
82. Kryndushkin, D. Non-targeted identification of prions and amyloid-forming proteins from yeast and mammalian cells / D. Kryndushkin, N. Pripuzova, B. G. Burnett, F. Shewmaker // *Journal of Biological Chemistry*. – 2013. – Vol. 288. – No. 38. – P. 27100-27111.
83. Kushnirov, V. V. Nucleotide sequence of the SUP2 (SUP35) gene of *Saccharomyces cerevisiae* / V. V. Kushnirov, M. D. Ter-Avanesyan, M. V. Telckov, A. P. Surguchov, V. N. Smirnov, S. G. Inge-Vechtomov // *Gene*. – 1988. – Vol. 66. – No. 1. – P. 45–54.
84. Kushnirov, V. V. Purification and analysis of prion and amyloid aggregates / V. V. Kushnirov, I. M. Alexandrov, O. V. Mitkevich, I. S. Shkundina, M. D. Ter-Avanesyan // *Methods*. – 2006. – Vol. 39. – No. 1. – P. 50-55.
85. Kushnirov, V. V. Structure and replication of yeast prions / V. V. Kushnirov, M. D. Ter-Avanesyan // *Cell*. – 1998. – Vol. 94. – No. 1. – P. 13-16.
86. Labokha, A.A. Systematic analysis of barrier-forming FG hydrogels from *Xenopus* nuclear pore complexes / A.A. Labokha, S. Gradmann, S. Frey, B.B. Hülsmann, H. Urlaub, M. Baldus, D. Görlich, // *The EMBO Journal*. – 2013. – Vol. 32. – P. 204–218.
87. Lasagna-Reeves, C. A. Alzheimer brain-derived tau oligomers propagate pathology from endogenous tau / C. A. Lasagna-Reeves, D. L. Castillo-Carranza, U. Sengupta, M. J. Guerrero-Munoz, T. Kiritoshi, V. Neugebauer, G. R. Jackson, R. Kaye // *Scientific Reports*. – 2012. – Vol. 2. – No. 1. – P. 700.
88. Lee, C. Y. D. Genetic manipulations of mutant huntingtin in mice: new insights into Huntington's disease pathogenesis / C. Y. D. Lee, J. P. Cantle, X. W. Yang // *The FEBS journal*. – 2013. – Vol. 280. – No. 18. – P. 4382-4394.

89. Li, J. The RIP1/RIP3 Necrosome Forms a Functional Amyloid Signaling Complex Required for Programmed Necrosis / J. Li, T. McQuade, A. B. Siemer, J. Napetschnig, K. Moriwaki, Y. S. Hsiao, ... & H. Wu // *Cell*. – 2012. – Vol. 150. – No. 2. – P. 339-350.
90. Li, C. The selective permeability barrier in the nuclear pore complex / C. Li, A. Goryaynov, W. Yang // *Nucleus*. – 2016. – Vol. 7. – P. 430–446.
91. Liang, Y. Dynamic Association of NUP98 with the Human Genome / Y. Liang, T. M. Franks, M. C. Marchetto, F. H. Gage, M. W. Hetzer // *PLOS Genetics*. – 2013. – Vol. 9. – No. 2. – P. 1-14.
92. Liebman, S. W. Prions in yeast / S. W. Liebman, Y. O. Chernoff // *Genetics*. – 2012. – Vol. 191. – No. 4. – P. 1041-1072.
93. Louros, N.N. A common —aggregationpronell interface possibly participates in the selfassembly of human zona pellucida proteins / N.N. Louros, E.D. Chrysina, G.E. Baltatzis, E.S. Patsouris, S.J. Hamodrakas, V.A. Iconomidou // *FEBS Letters*. – 2016. – Vol. 590. – No. 5. – P. 619–630.
94. Ma, J. Super-resolution 3D tomography of interactions and competition in the nuclear pore complex / J. Ma, A. Goryaynov, W. Yang // *Nature Structural and Molecular Biology*. – 2016. – Vol. 23. – No. 3. – P. 239-247.
95. Mackenzie, I.R. Molecular neuropathology of frontotemporal dementia: insights into disease mechanisms from postmortem studies / I.R. Mackenzie, M. Neumann // *Journal of Neurochemistry*. – 2016. – Vol. 138. – Suppl.1. – P. 54-70.
96. Majumdar, A. Critical role of amyloid-like oligomers of *Drosophila* Orb2 in the persistence of memory / A. Majumdar, W. C. Cesario, E. White-Grindley, H. Jiang, F. Ren, L. Li, ... & K. Si // *Cell*. – 2012. – Vol. 148. –No. 3. – P. 515-529.
97. Matiiv, A.B. Amyloid and amyloid-like aggregates: Diversity and the term crisis / A.B. Matiiv, N.P. Trubitsina, A.G. Matveenko, Y.A. Barbitoff, G.A. Zhouravleva, S.A. Bondarev // *Biochemistry*. – 2020. – Vol. 85. – P. 1011-1034.
98. Matveenko, A. G. SFP1-mediated prion-dependent lethality is caused by increased Sup35 aggregation and alleviated by Sis1 / A. G. Matveenko, P. B. Drozdova, M. V. Belousov, S. E. Moskalenko, S. A. Bondarev, Y. A. Barbitoff, A. A. Nizhnikov, G. A. Zhouravleva // *Genes to Cells*. – 2016. – Vol. 21. – No. 12. – P. 1290-1308.
99. McLaurin, J. Review: modulating factors in amyloid- β fibril formation / J. McLaurin, D. Yang, C. M. Yip, P. E. Fraser // *Journal of Structural Biology*. – 2000. – Vol. 130. – No. 2/3. – P. 259-270.
100. Medina, M. The role of extracellular tau in the spreading of neurofibrillary pathology

- / M. Medina, J. Avila // *Frontiers in cellular neuroscience*. – 2014. – Vol. 8. – P. 113.
101. Meyer-Luehmann, M. Exogenous induction of cerebral β -amyloidogenesis is governed by agent and host / M. Meyer-Luehmann, J. Coomaraswamy, T. Bolmont, S. Kaeser, C. Schaefer, E. Kilger, ... & M. Jucker // *Science*. – 2006. – Vol. 313. – No. 2006. – P. 1781-1784.
 102. Meriin, A. B. Endocytosis machinery is involved in aggregation of proteins with expanded polyglutamine domains / A. B. Meriin, X. Zhang, I. M. Alexandrov, A. B. Salnikova, M. D. Ter-Avanesian, Y. O. Chernoff, M. Y. Sherman // *FASEB Journal*. – 2007. – Vol. 21. – No. 8. – P. 1915-1925.
 103. Michelitsch, M.D. A census of glutamine/asparagine-rich regions: implications for their conserved function and the prediction of novel prions / M.D. Michelitsch, J.S. Weissman // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2000. – Vol. 97. – No. 22. – P.11910-11915.
 104. Milles, S. Facilitated aggregation of FG nucleoporins under molecular crowding conditions / S. Milles, K. Huy Bui, C. Koehler, M. Eltsov, M. Beck, E.A. Lemke // *EMBO Reports*. – 2013. – Vol. 14. – P. 178–183.
 105. Milles, S. Single molecule study of the intrinsically disordered FG-repeat nucleoporin 153 / S. Milles, E.A. Lemke // *Biophysical Journal*. – 2011. – Vol. 101. – No. 7. – P. 1710-1719.
 106. Morales, R. *De novo* induction of amyloid- β deposition *in vivo* / R. Morales, C. Duran-Aniotz, J. Castilla, L. D. Estrada, C. Soto // *Molecular psychiatry*. – 2012. – Vol. 17. – No. 12. – P. 1347-53.
 107. Murakami, T. Experimental induction and oral transmission of avian AA amyloidosis in vaccinated white hens / T. Murakami, N. Muhammad, Y. Inoshima, T. Yanai, M. Goryo, N. Ishiguro // *Amyloid*. – 2013. – Vol. 20. – No. 2. – P. 80-85.
 108. Nenninger, A. A. Localized and efficient curli nucleation requires the chaperone-like amyloid assembly protein CsgF / A. A. Nenninger, L. S. Robinson, S. J. Hultgren // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2009. – Vol. 106. – No. 3. – P. 900–905.
 109. Nizhnikov, A. A. Proteomic screening for amyloid proteins / A. A. Nizhnikov, A. I. Alexandrov, T. A. Ryzhova, O. V. Mitkevich, A. A. Dergalev, M. D. Ter-Avanesyan, A. P. Galkin // *PLoS ONE*. – 2014. – Vol. 9. – No. 12. – P. 1-18.
 110. Nospikel T. When parsimony backfires: neglecting DNA repair may doom neurons in Alzheimer's disease / T. Nospikel, P.C. Hanawalt // *Bioessays*. – 2003. – Vol. 25. – No. 2. – P. 168-73.

111. Oh, J. Amyloidogenesis of type III-dependent harpins from plant pathogenic bacteria / J. Oh, J. G. Kim, E. Jeon, C. H. Yoo, S. M. Jae, S. Rhee, I. Hwang // *Journal of Biological Chemistry*. – 2007. – Vol. 282. – No. 18. – P. 13601-13609.
112. Okonechnikov, K. Unipro UGENE: A unified bioinformatics toolkit / K. Okonechnikov, O. Golosova, M. Fursov, & Ugene Team // *Bioinformatics*. – 2012. – Vol. 28. – No. 8. – P. 1166–1167.
113. Oli, M. W.. Functional amyloid formation by *Streptococcus mutans* / M. W. Oli, H. N. Otoo, P. J. Crowley, K. P. Heim, M. M. Nascimento, C. B. Ramsook, P. N. Lipke, L. J. Brady // *Microbiology (United Kingdom)*. – 2012. – Vol. 158. – No. 12. – P. 2903-2916.
114. Olsén, A. The RpoS Sigma factor relieves H-NS-mediated transcriptional repression of *csgA*, the subunit gene of fibronectin-binding curli in *Escherichia coli* / A. Olsén, A. Arnqvist, M. R. Hammar, S. Sukupolvi, S. Normark // *Molecular Microbiology*. – 1993. – Vol. 7. – No. 4. – P. 523-536.
115. Olsén, A. Fibronectin binding mediated by a novel class of surface organelles on *Escherichia coli* / A. Olsén, A. Jonsson, S. Normark // *Nature*. – 1989. – Vol. 338. – No. 6217. – P. 652-655.
116. Onischenko, E. Natively unfolded FG repeats stabilize the structure of the nuclear pore complex / E. Onischenko, J.H. Tang, K.R. Andersen, K.E. Knockenhauer, P. Vallotton, C.P. Derrer, A. Kralt, C.F. Mugler, L.Y. Chan, T.U. Schwartz // *Cell*. – 2017. – Vol. 171. – P. 904–917.
117. Oughtred, R. The BioGRID database: A comprehensive biomedical resource of curated protein, genetic, and chemical interactions / R. Oughtred, J. Rust, C. Chang, B.J. Breitkreutz, C. Stark, ... & Tyers M. // *Protein Science*. – 2021. – Vol. 30. – No. 1. – P. 187-200.
118. Patel, S.S. Natively unfolded nucleoporins gate protein diffusion across the nuclear pore complex / S.S. Patel, B.J. Belmont, J.M. Sante, M.F. Rexach // *Cell*. – 2007. – Vol.129. – No. 1. – P. 83-96.
119. Petri, M. Structural characterization of nanoscale meshworks within a nucleoporin FG hydrogel / M. Petri, S. Frey, A. Menzel, D. Gorlich, S. Techert // *Biomacromolecules*. – 2012. – Vol. 13. – P. 1882–1889.
120. Picken, M. M. The Pathology of Amyloidosis in Classification: A Review / M. M. Picken // *Acta Haematologica*. – 2020. – Vol. 60153. – P. 1-13.
121. Prusiner, S. B. Prions causing degenerative neurological diseases / S. B. Prusiner // *Annual review of medicine*. – 1987. – Vol. 38. – P. 381-398.

122. Prusiner, S. B. Creutzfeldt-Jakob disease and scrapie prions / S. B. Prusiner // Alzheimer disease and associated disorders. – 1989. – Vol. 3. - No. 1/2. – P. 52-78.
123. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R foundation for statistical computing [Электронный ресурс] / R Core Team // R Found. Stat. Comput. URL: <https://www.R-project.org/>
124. Rencus-Lazar S. Yeast Models for the Study of Amyloid-Associated Disorders and Development of Future Therapy / Y. DeRowe, H. Adsi, E. Gazit, D. Laor // Frontiers in Molecular Biosciences. – 2019. – Vol. 6. – P. 15.
125. Riek, R. The HET-S/s Prion Motif in the Control of Programmed Cell Death / R.Riek, S. Saue // Cold Spring Harbor Perspectives in Biology. – 2016. – Vol. 8. – No. 9. – P. 1-11.
126. Roche, D. B. Usage of a dataset of NMR resolved protein structures to test aggregation versus solubility prediction algorithms / D. B. Roche, E. Villain, A. V. Kajava // Protein Science. – 2017. – Vol. 26. – No. 9. – P. 1864–1869.
127. Romero, D. Amyloid fibers provide structural integrity to *Bacillus subtilis* biofilms / D. Romero, C. Aguilar, R. Losick, R. Kolter // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2010. – Vol. 107. – No. 5. – P. 2230-2234.
128. Romero, D. Functional amyloids in bacteria / D. Romero, R. Kolter // International Microbiology. – 2014. – Vol. 17. – No. 2. – P. 65-73.
129. Ruan Q.X. An investigation into the effect of potassium ions on the folding of silk fibroin studied by generalized two-dimensional NMR–NMR correlation and Raman spectroscopy / Q.X. Ruan, P. Zhou, B.-W. Hu, D. Ji // FEBS Journal. – 2008. – Vol. 275. – P. 219-232.
130. Rubel, A. Identification of PrP sequences essential for the interaction between the PrP polymers and A β peptide in a yeast-based assay / A. Rubel, T. Ryzhova, K. S. Antonets, Y. Chernoff, A. Galkin // Prion. – 2013. – Vol. 7. – No. 6. – P. 469-476
131. Sambrook, J. Molecular cloning: a laboratory manual, second edition. — NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York, 1989.
132. Sarantseva, S. Apolipoprotein E-mimetics inhibit neurodegeneration and restore cognitive functions in a transgenic drosophila model of Alzheimer’s disease / S. Sarantseva, S. Timoshenko, O. Bolshakova, E. Karaseva, D. Rodin, A. L. Schwarzman, M. P. Vitek // PLoS ONE. – 2009. – Vol. 4. – No. 12. - P. e8191.
133. Schilling, G. Intranuclear inclusions and neuritic aggregates in transgenic mice expressing a mutant N-terminal fragment of huntingtin / G. Schilling, M. W. Becher, A. H. Sharp, H. A. Jinnah, K. Duan, J. A. Kotzuk, ... & D. R. Borchelt // Human Molecular

- Genetics. – 1999. – Vol. 8. – No. 3. – P. 397-407.
134. Schaffert, L.N. Do Post-Translational Modifications Influence Protein Aggregation in Neurodegenerative Diseases: A Systematic Review / L.N. Schaffert, W.G. Carter // Brain Sciences. – 2020. – Vol. 10. – No. 4. – P. 232.
 135. Schmidt, H.B. Transport selectivity of nuclear pores, phase separation, and membraneless organelles / H.B. Schmidt, D. Görlich // Trends in Biochemical Sciences. – 2016. – Vol. 41. – P. 46–61.
 136. Schneider, C. A. NIH Image to ImageJ: 25 years of Image Analysis / C. A. Schneider, W. S. Rasband, K. W. Eliceiri // Nature Methods. – 2012. – Vol. 9. – No. 7. – P. 671–675.
 137. Schwartz, K. Functional amyloids composed of phenol soluble modulins stabilize *Staphylococcus aureus* biofilms / K. Schwartz, A. K. Syed, R. E. Stephenson, A. H. Rickard, B. R. Boles // PLoS Pathogens. – 2012. – Vol. 8. – No. 6. – P. e1002744.
 138. Selkoe, D. J. Alzheimer's Disease / D. J. Selkoe // Cold Spring Harbor Perspectives in Biology. – 2011. – Vol. 3. – No. 7. – P. 4457-4457.
 139. Serio, T. R. Yeast prion [*PSI*⁺] and its determinant, Sup35p / T. R. Serio, A.G. Cashikar, J. J. Moslehi, A. S. Kowal, S. L. Lindquist // Methods in Enzymology. – 1999. – Vol. 309. – P. 649-673.
 140. Shahnawaz, M. Microcin amyloid fibrils A are reservoir of toxic oligomeric species / M. Shahnawaz, C. Soto // Journal of Biological Chemistry. – 2012. – Vol. 287. – No. 15. – P. 11665-11676.
 141. Sharma, A. Ordered regions of channel nucleoporins Nup62, Nup54, and Nup58 form dynamic complexes in solution / A. Sharma, S. R. Solmaz, G. Blobel, I. Melčák // Journal of Biological Chemistry. – 2015. – Vol. 290. – No. 30. – P. 18370-18378.
 142. Shewmaker, F. Structural Insights into Functional and Pathological Amyloid / F. Shewmaker, R. P. Mcglinchey, R. B. Wickner // The Journal of biological chemistry. – 2011. – Vol. 286. – No. 19. – P. 16533-16540.
 143. Si, K. *Aplysia* CPEB can form prion-like multimers in sensory neurons that contribute to long-term facilitation / K. Si, Y. B. Choi, E. White-Grindley, A. Majumdar, E. R. Kandel // Cell. – 2010. – Vol. 140. – No. 3. – P. 421-435.
 144. Siniukova, V.A. Search for functional amyloid structures in chicken and fruit fly female reproductive cells / V.A. Siniukova, J.V. Sopova, S.A. Galkina, A.P. Galkin // Prion. – 2020. – Vol. 14. – No. 1. – P. 278–282.
 145. Sipe, J. D. Amyloid fibril proteins and amyloidosis: chemical identification and clinical classification International Society of Amyloidosis 2016 Nomenclature

- Guidelines / J. D. Sipe, M. D. Benson, J. N. Buxbaum, S.-I. Ikeda, G. Merlini, M. J. M. Saraiva, P. Westermark // *Amyloid*. – 2016. – Vol. 23. – No. 4. – P. 209-213.
146. Sivanathan, V. A bacterial export system for generating extracellular amyloid aggregates / V. Sivanathan, A. Hochschild // *Nature protocols*. – 2013. – Vol. 8. – No. 7. – P. 1381–1390.
147. Sopova, J.V. RNA-binding protein FXR1 is presented in rat brain in amyloid form / J.V. Sopova, E.I. Koshel, T.A. Belashova, S.P. Zadorsky, A.V. Sergeeva, V.A. Siniukova, A.A. Shenfeld, M.E. Velizhanina, K.V. Volkov, A.A. Nizhnikov // *Scientific Reports*. – 2019. – Vol. 9. – P. 18983.
148. Stephan, J.S. The CPEB3 protein is a functional prion that interacts with the actin cytoskeleton / J.S. Stephan, L. Fioriti, N. Lamba, L. Colnaghi, K. Karl, I.L. Derkatch, E.R. Kandel // *Cell Reports*. – 2015. – Vol. 11. – P. 1772–1785.
149. Studier, F. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes / F. Studier, B. A. Moffatt // *Journal of Molecular Biology*. – 1986. – Vol. 189. – No. 1. – P. 113-130.
150. Sugiyama, S. Self-propagating amyloid as a critical regulator for diverse cellular functions / S. Sugiyama, M. Tanaka // *Journal of Biochemistry*. – 2014. – Vol. 155. – No. 6. – P. 345-351.
151. Swinnen, B. The phenotypic variability of amyotrophic lateral sclerosis / B. Swinnen, W. Robberecht // *Nature Reviews Neurology*. – 2014. – Vol. 10. – No. 11. – P. 661-670.
152. Syed, A. K. Fold modulating function: Bacterial toxins to functional amyloids / A. K. Syed, B. R. Boles // *Frontiers in Microbiology*. – 2014. – Vol. 5. – P. 1-10.
153. Taylor, J.P. Decoding ALS: from genes to mechanism / J.P. Taylor, R.H. Jr. Brown, D.W. Cleveland // *Nature*. – 2016. – Vol. 539. – No. 7628. – P. 197-206.
154. Taylor, J.P. Toxic proteins in neurodegenerative disease / J.P. Taylor, J. Hardy, K.H. Fischbeck // *Science*. – 2002. – Vol. 296. – No. 5575. – P.1991-1995.
155. Terry, L.J. Flexible gates: dynamic topologies and functions for FG nucleoporins in nucleocytoplasmic transport / L.J. Terry, S.R. Wentz. // *Eukaryotic Cell*. – 2009. – Vol. 8. – No. 12. – P. 1814-1827.
156. Tipping, K. Amyloid Fibres: Inert EndStage Aggregates or Key Players in Disease? / K. Tipping, P. V. Oosten-Hawle, E. Hewitt, S. Radford // *Trends in Biochemical Sciences* – 2015. – Vol. 40. – No. 12. – P. 719-727.
157. Toombs, J.A. Compositional determinants of prion formation in yeast / J.A. Toombs, B.R. McCarty, E.D. Ross // *Molecular Biology of the Cell*. – 2010. – V. 30. – No. 1. –

- P. 319-332.
158. Von Der Haar, T. Development of a novel yeast cell-based system for studying the aggregation of Alzheimer's disease-associated A β peptides *in vivo* / T. Von Der Haar, L. Joss'e, P. Wright, J. Zenthon, M. F. Tuite // *Neurodegenerative Diseases*. – 2007. – Vol. 4. – No. 2/3. – P. 136-147.
 159. Vonsattel, J. P. G. Huntington Disease / J. P. G. Vonsattel, M. Difiglia // *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*. – 1998. – Vol. 57. – No. 5. – P. 369-384.
 160. Walczak, H. TNF and ubiquitin at the crossroads of gene activation, cell death, inflammation, and cancer / H. Walczak // *Immunological Reviews*. – 2011. – Vol. 244. – No. 1. – P. 9-28.
 161. Wang, L. Empirical correlation between protein backbone 15N and 13C secondary chemical shifts and its application to nitrogen chemical shift re-referencing / L. Wang, J.L. Markley // *Journal of Biomolecular NMR*. – 2009. – Vol. 44. – No 2. – P. 95-99.
 162. Westermark, G. T. Serum amyloid A and protein AA: Molecular mechanisms of a transmissible amyloidosis / G. T. Westermark, P. Westermark // *FEBS Letters*. – 2009. – Vol. 583. – No. 16. – P. 2685-2690.
 163. Winklhofer, K. F. The two faces of protein misfolding: gain- and loss-of-function in neurodegenerative diseases / K. F. Winklhofer, J. Tatzelt, C. Haass // *The EMBO Journal*. – 2008. – Vol. 27. – No. 2. – P. 336-349.
 164. Xu, L. Nucleoporin 35 regulates cardiomyocyte pH homeostasis by controlling Na⁺-H⁺ exchanger-1 expression / L. Xu, L. Pan, J. Li, B. Huang, J. Feng, C. Li, ... & Y. H. Chen // *Journal of Molecular Cell Biology*. – 2015. – Vol. 7. – No. 5. – P. 476-485.
 165. Yang, J. Gating pluripotency via nuclear pores / J. Yang, N. Cai, F. Yi, G.H. Liu, J. Qu, J.C. Izpisua Belmonte // *Trends in Molecular Medicine*. – 2014. – Vol. 20. – No.1. – P. 1-7

Благодарности

Приношу глубокую благодарность Станиславу Александровичу Бондареву за чуткое руководство, терпеливое отношение, методические советы, а также всестороннюю помощь в планировании экспериментов, их проведении и написании работы.

Я хочу поблагодарить Андрея Георгиевича Матвеевко за предоставленные плазмиды и штаммы, Светлану Евгеньевну Москаленко за предоставленный препарат белка NUP58, а также помощь и советы при проведении экспериментальных работ. Хочется принести благодарность Белоусову Михаилу Владимировичу за помощь в визуализации фибрилл с использованием просвечивающей электронной микроскопии. За помощь с конструированием плазмид хотелось поблагодарить Рогозу Татьяну Михайловну.

За помощь с освоением методики ядерно-цитоплазматического транспорта хотелось поблагодарить Трубицину Нину Павловну. За помощь с экспериментами по ядерно-цитоплазматическому транспорту хотелось бы поблагодарить Лосеву Наталью Владимировну. За помощь с проведением экспериментов и оформлением результатов хотелось бы поблагодарить Ксению Владимировну Суханову и Антонову Екатерину Юрьевну. За предоставленные материалы в работе я хочу поблагодарить и Станислава Александровича Бондарева, и Галину Анатольевну Журавлеву за ценные методические советы и материалы. Хочу поблагодарить Андрея Вилховича Каяву за предоставленную программу ArchCandy.

За помощь в освоении методики окраски белков красителем Конго красным и работу с поляризационным микроскопом хочу поблагодарить Марию Евгеньевну Велижанину. За предоставление материала для выделения Данила Валерьевича Качкина и Светлану Анатольевну Галкину за предоставление биоматериала для выделения кДНК. Юлию Викторовну Сопову за неоднократное рецензирование промежуточных отчетов и ценные комментарии при прочтении моей работы.

Хочется выразить благодарность всему коллективу лаборатории физиологической генетики за поддержку, теплое отношение и создание прекрасной рабочей атмосферы.

Отдельно хочется поблагодарить мою жену, Данилову Александру Артемовну, за безграничное терпение и огромную поддержку в написании диссертации, а также хочется выразить благодарность моим родителям за поддержку и советы во время обучения в аспирантуре и при написании диссертации.