

ВЛИЯНИЕ КРАСНОГО ПИГМЕНТА НА АМИЛОИДИЗАЦИЮ БЕЛКОВ У ДРОЖЖЕЙ

© О. В. Невзглядова,^{1,*} А. В. Артемов,
А. Г. Миттенберг, Е. В. Михайлова,
И. М. Кузнецова, К. К. Туроверов, Т. Р. Сойдла

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург;

¹ электронный адрес: oneva43@yahoo.com

В лизатах штаммов дрожжей, несущих мутацию в гене *ADE1* или *ADE2* и накапливающих красный пигмент в результате полимеризации аминокислоты (промежуточного вещества в биосинтезе аденина), изучали флуоресценцию тиофлавина Т, связанного с амилоидизированными белками. Было показано, что на среде, содержащей 10-кратный избыток аденина, который подавляет синтез пуринов *de novo* и тем самым блокирует образование красного пигмента, флуоресценция тиофлавина, связанного с амилоидом, увеличивается в несколько раз. К тому же эффекту приводит возникновение мутаций, блокирующих первые этапы биосинтеза пуринов и таким образом подавляющих синтез красного пигмента. Генерация мутаций в генах *ADE1* или *ADE2* в исходно белых прототрофных по аденину штаммах дрожжей приводит к значительному падению флуоресценции. Изучение фракции белковых полимеров посредством электрофореза в агарозном геле позволило предположить, что изменения флуоресценции действительно связаны с понижением количества амилоида в клетках, накапливающих красный пигмент. Опыты на модельных фибриллах инсулина свидетельствуют в пользу того, что красный пигмент взаимодействует с готовыми фибриллами, препятствуя их связыванию с тиофлавином Т. Сравнение осадочных белков, выделенных из красных и белых изогенных штаммов в 2D-электрофорезе с последующим масс-спектроскопическим анализом, позволило идентифицировать 23 пигментзависимых белка. Среди них преобладают шапероны и белки, участвующие в метаболизме глюкозы, что делает их близкими по составу к прионассоциированным белкам, выявленным нами ранее. Предполагается, что красный пигмент, связываясь с амилоидными фибриллами, препятствует образованию прионовых агрегатов, а нарушение связи фибрилл с шаперонами приводит к подавлению размножения прионов.

Ключевые слова: амилоид, прионы, тиофлавин Т, красный пигмент, *Saccharomyces cerevisiae*.

Существуют «конформационные заболевания» человека и животных (Вишневецкая и др., 2007; Herczenik, Gebbink, 2008; Uversky, 2008; Uversky et al., 2008; Zhou et al., 2008). Они связаны с образованием измененной пространственной структуры белков и приводят к аномальной агрегации с образованием амилоидных фибрилл. В ряде случаев амилоидное состояние может передаваться как по вертикали (от родителей потомству), так и по горизонтали (из клетки в клетку и из организма в организм). Подобные «инфекционные» белки называют прионами. Конформационные заболевания, будучи до сих пор неизлечимыми, являются серьезным вызовом для современной медицины и ветеринарии. Ведется масштабный поиск терапевтических агентов, способных излечивать эти заболевания (Trevitt, Collinge, 2006). Медленное течение этих болезней у человека и животных и длительный инкубационный период, который может продолжаться десятилетия, затрудняют исследования, которые в основном проводятся на клеточных и на внеклеточных (in vitro) моделях. В связи с этим весьма продуктивными являются эксперименты на низших эукариотах — дрожжах, открывающие возможность применения методов молекулярной генетики in vivo. Во введении к нашей предыдущей

статье (Невзглядова и др., 2010) мы рассматривали известные прионы дрожжей. Более подробно эти прионы описываются в ряде статей (Wickner, 1994; Chernoff et al., 2002; Chernoff, 2004, 2007; Wickner et al., 2006, 2007, 2008; Derkatch, Liebman, 2007; Du et al., 2008; Nemecek et al., 2009; Patel et al., 2009). Самым известным прионом дрожжей является [*PSI*⁺], прионизированная форма Sup35p — фактора терминации трансляции, известно также как eRF3. При прионизации этого белка кодоны-терминаторы начинают прочитываться. Это дает возможность отслеживать процесс прионизации Sup35p по возникновению супрессии нонсенс-мутаций (такие мутации возникают почти в любом гене, кодирующем белок).

Для диагностики наличия амилоидов используют флуоресцентный краситель тиофлавин Т (Chernoff et al., 2002). Нами были выявлены стерические ограничения, определяющие высокий квантовый выход флуоресценции тиофлавина Т, встраивающегося в фибриллы (Vogorai et al., 2003).

Мы показали, что грубые лизаты клеток дрожжей, относящихся к разным штаммам, имеют разную флуоресценцию. При этом сравнение изогенных штаммов, разли-

чающихся наличием приона [*PSI*⁺], выявило четкую корреляцию между присутствием этого приона и величиной интенсивности флуоресценции (IF). В частности, используя [*PSI*⁺]-культуру в качестве донора цитоплазмы в опытах по цитодукции, мы получили цитодуктанты с митотически стабильным повышением уровня флуоресценции по сравнению с [*psi*⁻] родительской реципиентной культурой (Невзглядова и др., 2008). В дальнейшем изучение флуоресценции у разных фракций, полученных при центрифугировании грубых лизатов при 1000 g, выявило в осадках значительно большую флуоресценцию, чем в супернатантах. Это, по всей видимости, связано с тем, что осадки содержат значительно больше амилоидизированного материала. Одновременно неожиданно для себя мы убедились в том, что не только прионовый статус влияет на интенсивность флуоресценции, но также цвет культуры. Штаммы, в которых в результате специфических мутаций накапливается красный пигмент, обнаруживают понижение IF в сравнении с изогенными штаммами белого цвета, даже если прионовый статус у них при этом не меняется.

Целью настоящей работы явилось выяснение связи красного пигмента с процессом амилоидизации.

Материал и методика

Использованные штаммы приведены в табл. 1.

Среды для культивирования и основные методы манипулирования дрожжевыми клетками, включая мутагенез, были традиционными (Sherman et al., 1986). Элиминацию прионов GuHCl выполняли, как указано в работе Чернова с коллегами (Chernoff et al., 2002), цитодукцию проводили по Захарову и Яровому (Zakharov, Yarovoy, 1977) с некоторыми изменениями: клетку зигот идентифицировали по характерной гантелеобразной форме и затем изолировали микроманипулированием. В качестве [*PSI*⁺]-цитодуктантов отбирали клоны, которые сохраняли ядерные маркеры [*psi*⁻] родителя, но получали [*PSI*⁺]-фактор, о чем свидетельствовали цвет колонии на среде YEPD, а также способность расти на среде без аденина.

Приготовление и анализ белковых экстрактов из осадков грубых лизатов дрожжевых клеток. Дрожжевые культуры выращивали на агаризованной питательной среде YEPD в течение 5—6 сут. Собранные клетки отмывали водой от остатков питательной среды и лизировали с помощью встряхивателя и стеклянных бус в буфере А: 25 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM NaCl и 10 mM EDTA. Протеазы блокировали добавлением 10 mM фенилметилсульфонилфторида (PMSF). Дитиотреитол (DTT) в буфере А мы не использовали, чтобы избежать разрушения связей прионизированных белков с различными прионассоциированными белками. Остатки клеток и стеклянные бусы удаляли центрифугированием при 100 g в течение 1 мин, а полученные супернатанты разбавляли буфером А в 1.5 раза при 0 °С. Количество белка в разбавленных супернатантах определяли модифицированным методом Лоури (Северин, Соловьев, 1989), после чего лизаты сравниваемых клеток выравнивали по белку и центрифугировали при 1000 g в течение 30 мин. Фракцию супернатантов удаляли, а осадки отмывали. Каждый этап очистки осадков включал в себя ресуспендирование в соответствующем буфере с последующим

центрифугированием. Для сравнения осадочных белков в агарозном геле осадки однократно отмывали в PBS (150 mM NaCl и 25 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$, pH 7.4). Экстракцию белков из осадков выполняли в буфере В (0.15 M Tris-HCl, pH 6.8, 2 % SDS и 50 mM DTT) в течение 15 мин при 37 °С при периодическом встряхивании. Пробы кипятили 10 мин и центрифугировали при 1000 g в течение 5 мин. Отобранные супернатанты служили для дальнейшего анализа осадочных белков: электрофореза в агарозном геле, измерения интенсивности флуоресценции, а также для 2D-электрофореза и идентификации белков с помощью масс-спектроскопии.

Электрофорез проводили в 1.8%-ном агарозном геле в условиях, указанных в работе Сонг и соавторов (Song et al., 2005). Для получения электрофоретических проб обычно использовали объемы лизатов, содержащие 1.5 мг белка. После центрифугирования лизатов и однократной отмывки PBS к осадкам добавляли по 30 мкл буфера В и после обычной процедуры экстракции и кипячения наносили на агарозный гель. Следует отметить, что кипячение в данном случае, очевидно, приводило не к мономеризации полимеров, а к отделению прионовых белковых агрегатов от более крупных клеточных структур, неспособных входить в агарозный гель (см. рис. 1, а).

2D-электрофорез и масс-спектрометрический анализ (MALDI) проводили, как это указано в нашей предыдущей работе (Невзглядова и др., 2010).

Измерение интенсивности флуоресценции (IF) потребовало дополнительной процедуры пересадки проб, так как входящий в состав буфера В SDS, взаимодействуя с тиофлавином Т, сильно повышает IF. Для измерения IF лизаты брали в объемах, соответствующих 9 мг белка. После центрифугирования лизатов осадочные белки отмывали 1 раз PBS и экстрагировали в 200 мкл буфера В, как это описано выше. После кипячения и центрифугирования супернатанты отбирали и пересаживали пятью объемами этилового спирта. Осадки, открученные из-под спирта, растворяли в 200 мкл буфера А и 40 мкл из них помещали в кювету объемом 500 мкл для измерения IF. К пробе добавляли 445 мкл H_2O и 15 мкл раствора тиофлавина Т в концентрации 10^{-3} M. В отдельных опытах аликвоты брали на определение белка в пробе. IF измеряли при длинах волн возбуждения и эмиссии 435 и 486 нм соответственно. Достоверность различий показателей флуоресценции сравниваемых пар изогенных штаммов оценивали с помощью критерия знаков (Закс, 1976).

Результаты и обсуждение

Связь между накоплением красного пигмента в клетках дрожжей и количество амилоидов в осадочной фракции грубых лизатов. Ранее (Невзглядова и др., 2008) нами было показано, что тиофлавин Т может использоваться для количественной оценки содержания амилоидов в лизатах дрожжевых клеток. В качестве модели были выбраны изогенные штаммы, заведомо содержащие и не содержащие известного приона, [*PSI*⁺]-фактора. При этом использовали штаммы с нонсенс-мутацией в гене *ADE1*, ответственной за синтез САИКАР-синтетазы. Эта мутация приводит к накоплению аминокимидозолриботида (АИР), который в результате полимеризации образует красный пигмент (Smirnov et al., 1967).

Штаммы *Saccharomyces cerevisiae*, использованные в работе

Название штамма	Генотип и плазмотип	Источник
LL20	<i>MATα leu2 his3</i>	Л. Н. Миронова и Г. А. Журавлева, кафедра генетики СПбГУ
74-D694, сокр. 74-D(+)	<i>MATα ade1-14 ura3 his3 trp1 leu 2 [PSI^{weak} PIN⁺]</i>	То же
74-D694/Gu1, сокр. 74-D/Gu(-)	<i>MATα ade1-14 ura3 his3 trp1 leu 2 [psi⁻ pin⁻]</i>	» »
OT56	<i>MATα ade1-14 ura3 his3 trp1 leu 2 [PSI^{strong} PIN⁺]</i>	» »
74-3C/Sup35[PSI ⁺], сокр. 74/3C(+)	<i>MATα ade1-14 ura3 his3 trp1 leu 2 [PSI⁺ PIN⁺]</i> . Штамм 74-D(+), трансформированный плазмидой pRS316-GAL-Sup35, проявляющий сильную супрессию	Получен: Невзглядова и др., 2008
74-3C/GuHCl, сокр. 74/3C/Gu(-)	<i>MATα ade1-14 ura3 his3 trp1 leu 2 [psi⁻ pin⁻]</i> . Трансформант 74-3C(+) после элиминации PSI ⁺ -фактора с помощью GuHCl	То же
АН/В	<i>MATα ade1-14 ura3 his3 lys9 kar1 [psi⁻ pin⁻]</i>	А. С. Борхсениус, кафедра генетики СПбГУ
cyt6[PSI ⁺]/(GT26)В, сокр. Cyt6(+)	<i>MATα ade1-14 ura3 his3 lys9 kar1 [PSI⁺ PIN⁺]</i> . Цитодуктант, полученный от скрещивания штамма АН/В со штаммом GT26, служащим донором цитоплазмы	Получен: Невзглядова и др., 2008
cyt6/(GT26)В/GuHCl, сокр. Cyt6/Gu(-)	<i>MATα ade1-14 ura3 his3 lys9 kar1 [psi⁻ pin⁻]</i> . Цитодуктант cyt6(+) после элиминации PSI ⁺ -фактора с помощью GuHCl	То же
GT26	<i>MATα aro7-1 cys1-72 his4-166 leu2-1 lys2-187 met8-1 trp5-48 ura3-1 [PSI⁺ PIN⁺]</i>	Ю. О. Чернов, Технологический институт штата Джорджия, Атланта, США
GT27	<i>MATα aro7-1 cys1-72 his4-166 leu2-1 lys2-187 met8-1 trp5-48 ura3-1 [psi⁻ pin⁻]</i>	То же
168tester	<i>MATα his5 [PSI⁺]</i>	Т. С. Карпова, Национальный институт рака, Бетесда, США
УТК79	<i>MATα ura3 leu2 his3 trp1 lys2</i>	То же
К5-13	<i>MATα his5 kar1-1 [PSI⁺]</i>	Б. Ф. Яровой, ПИЯФ, Санкт-Петербург
К5-5	<i>MATα his4 ade2 kar1-1 [psi⁻]</i>	То же
23В-Р130	<i>MATα ade1::kanMX4 leu2-Δ0 lys2-Δ0</i>	А. М. Зехнов, кафедра генетики СПбГУ
29Г-Р130	<i>MATα ade1::kanMX4 leu2-Δ0 lys2-Δ0</i>	То же
4А-Р131	<i>MATα ade2::kanMX4 ura3-Δ0</i>	» »
49В-Р131	<i>MATα ade2::kanMX4 ura3-Δ0 lys2-Δ0</i>	» »
15В-Р136	<i>MATα ade4::kanMX4 leu2-Δ0</i>	» »
33Г-Р136	<i>MATα ade4::kanMX4 lys2-Δ0</i>	» »
7А-Р137	<i>MATα ade5, 7::kanMX4 ura3-Δ0</i>	» »
15Б-Р137	<i>MATα ade5, 7::kanMX4 ura3-Δ0</i>	» »
5А-Р138	<i>MATα ade6::kanMX4 leu2-Δ0</i>	» »
32Б-Р138	<i>MATα ade6::kanMX4 leu2-Δ0</i>	» »
3А-Р139	<i>MATα ade8::kanMX4 leu2-Δ0</i>	» »
13В-Р139	<i>MATα ade8::kanMX4 leu2-Δ0</i>	» »

Штаммы с такой мутацией очень удобны при изучении прионизации продукта гена *SUP35*, одного из факторов терминации трансляции (eRF3). Когда Sup35p прионизируется (образуется [PSI⁺]-фактор), eRF3 частично инактивируется и начинается частичное прочитывание нонсенс-кодона. Это приводит к появлению полноразмерной и функциональной САЙКАР-синтазы в достаточном количестве, чтобы снять блок в биосинтезе аденина, вследствие чего красный пигмент перестает накапливаться. Таким образом, по цвету дрожжевой колонии и по со-

пряженному с ним признаку — способности расти на полной синтетической среде без аденина — можно судить о прионизации Sup35p.

Ранее мы показали (Невзглядова и др., 2008), что IF в лизатах красных [psi⁻]-клеток меньше, чем у изогенных розовых и белых [PSI⁺]-клеток. Это различие мы объясняли разным прионовым статусом в штаммах (большим содержанием прионов в случае [PSI⁺] и малым у [psi⁻]). В данной работе мы подтверждаем это предположение в опытах, в которых белки, экстрагированные из осадков

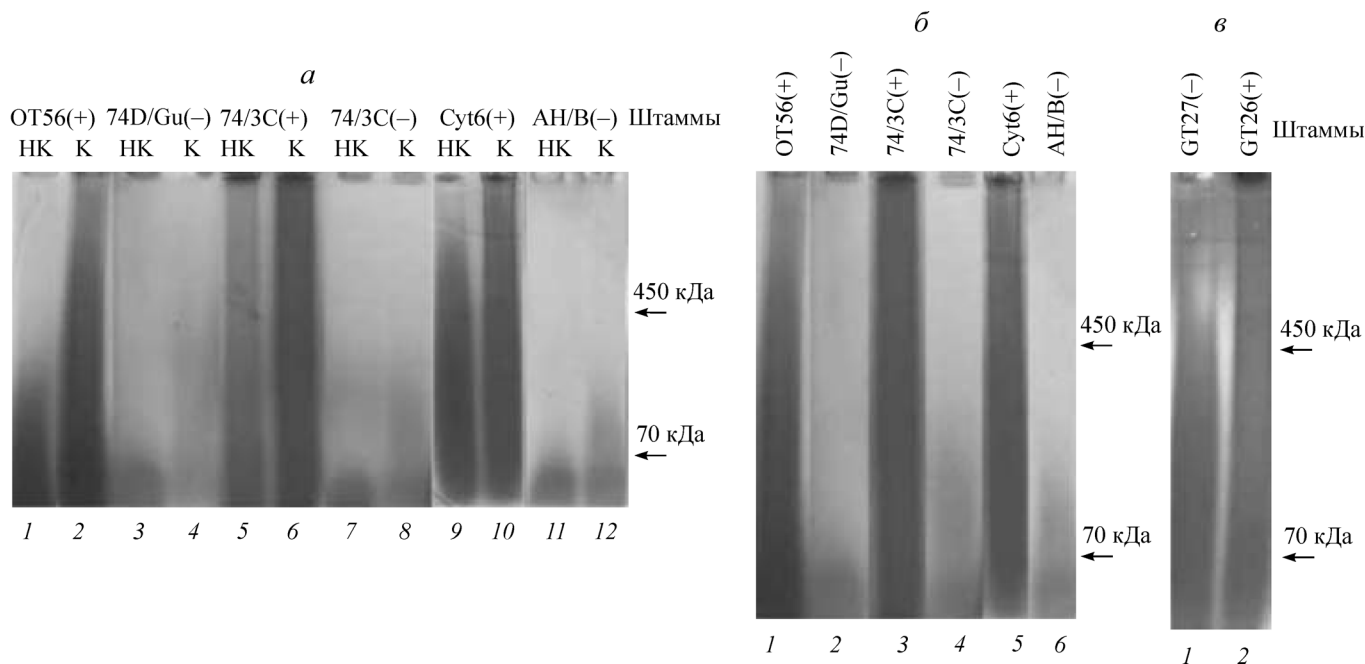


Рис. 1. Электрофореграммы осадочных белков, выделенных из грубых лизатов $[PSI^+]$ -изогенных штаммов в 1.8%-ном агарозном геле.

Здесь и в последующих таблицах и рисунках (+) и (-) означают наличие и отсутствие SI фактора.

а: экстракты, полученные из осадков, делили на аликвоты, одну из которых перед нанесением в гель не подвергали (НК), а другую подвергали (К) кипячению. б, в: все пробы перед нанесением в гель кипятили. Полные названия штаммов приведены в табл. 1. Процедура получения препаратов и условия электрофореза указаны в разделе «Материал и методика».

грубых лизатов (в дальнейшем изложении для краткости названные осадочными белками), разделяли в 1.8%-ном агарозном геле. На рис. 1, б можно видеть, что красные $[psi^-]$ -штаммы сильно уступают изогенному белому $[PSI^+]$ -штамму по количеству белка в области полимерных молекул с мол. массой выше 100 кДа.

Однако в ходе дальнейшей работы (Невзглядова и др., 2010; данные настоящей статьи) появились свидетельства о возможной роли не только прионового состава, но и красного пигмента в амилоидизации белков. Подозрения, говорящие об этой возможности, возникли при изучении пары изогенных культур, различающихся наличием двух прионов, $[PSI^+]$ и $[PIN^+]$, прототрофных по аденину. При проверке их в агарозном геле оказалось, что между этими штаммами нет таких больших различий и что у обоих зона, соответствующая полимерным белкам осадочной фракции, достаточно выражена (рис. 1, в). Чтобы выяснить, связано ли это с белым цветом обеих культур, мы решили проверить, как изменятся показатель IF и подвижность осадочных белков в агарозном геле у красных $[psi^-]$ -культур, если их вырастить на среде с 10-кратным избытком аденина (YEED-ADE), препятствующей накоплению красного пигмента.

В табл. 2 сравниваются 7 пар изогенных штаммов с разным прионовым статусом. При этом мы исходили из того, что величина IF осадочных белков, окрашенных тифлавином Т, характеризует общее количество амилоидного белка в данном штамме, а частное от деления величины IF на количество белка в осадке (IF/prot) отражает его удельную амилоидность. Для каждой сравниваемой пары приведен показатель (%), полученный делением величины IF штамма с большим прионовым статусом на величину IF его партнера с меньшим прионовым статусом. (Этот показатель удобен для оценки различий внутри

каждой изогенной пары штаммов). Изогенными друг другу являются штаммы 74-D и OT56, AN/B и cyt6, GT26 и GT27 и их производные.

При сравнении данных левой части табл. 2 (среда YEED) видно, что для всех пар большему прионовому содержанию соответствуют большие показатели IF и IF/prot. Для изогенных пар, относящихся к сериям 74-OT56 и GT26—GT27 (пары 1—4 и 7), отношение IF прион-богатых штаммов к штаммам со сниженным прионовым содержанием колеблется около оценки 200 %, а соотношение соответствующих IF/prot ненамного больше. Для изогенных пар с другим генетическим фоном (пары 5 и 6) различия выражены намного больше, особенно это относится к удельной амилоидности, оцененной по IF/prot.

Если сравнивать данные, приведенные в правой части табл. 2 (среда YEED-ADE), то в 5 из 7 случаев большему прионовому статусу также соответствуют большие значения IF и IF/prot. Однако при росте на среде с высоким содержанием аденина различия внутри каждой изогенной пары уменьшаются почти вдвое. В 2 из 7 сравниваемых пар (1 и 4) выращивание на аденине вообще сдвигает соотношения IF и IF/prot в противоположную сторону. Исключение из правила стирания различий на среде YEED-ADE представляет собой изогенная пара 7, которая прототрофна по аденину.

Таким образом, приведенные в табл. 2 данные говорят о том, что если $[psi^-]$ - и $[PSI^+_{weak}]$ -штаммы отличаются друг от друга и от $[PSI^+_{strong}]$ цветом колоний, то различия между ними по IF и IF/prot являются очень четкими, если же различия в цвете (накоплении пигмента) нет, то разный прионовый состав не столь сильно влияет на содержание амилоида. Это позволяет предположить, что когда $[psi^-]$ - или $[PSI^+_{weak}]$ -клетки на среде, богатой аденином, переста-

Интенсивность флуоресценции (IF) осадочных белков изогенных штаммов, различающихся содержанием прионов, при выращивании на среде YEPD или YEPD-ADE

Номер пары	Пары штаммов	Среда YEPD				Среда YEPD-ADE			
		IF	Отношение прионов к неприонам или слабым прионам, %	IF/prot	Отношение прионов к неприонам или слабым прионам, %	IF	Отношение прионов к неприонам или слабым прионам, %	IF/prot	Отношение прионов к неприонам или слабым прионам, %
1	74-D (+Weak)	347.8	179	1992	297	3058.0	75.5	37 300	58.4
	OT56 (+Strong)	621.5		5919		2310.0		21 790	
2	74-D (+Weak)	347.8	205	1992	397	3058.0	156.0	37 300	115.0
	74-D/3C(+)	711.4		7904		4769.0		42 970	
3	74-D/3C/Gu(-)	353.4	201	3499	226	4599.0	103.0	30 260	142.0
	74-D/3C(+)	711.4		7904		4769.0		42 970	
4	74-D/Gu(-)	227.6	273	1897	312	1586.0	30.5	52 860	36.7
	OT56 (+Strong)	621.5		5919		484.8		19 390	
5	AH/B(-)	246.2	511	3075	2730	2368.0	179.0	23 680	189.0
	Cyt6(+)	1260.0		83 960		4244.0		44 670	
6	Cyt6/Cu(-)	308.4	408	5411	1550	2492.0	170.0	18 600	240.0
	Cyt6(+)	1260.0		83 960		4244.0		44 670	
7	GT27(-)	927.9	163	22 090	264	1189.0	264.0	1432	2890.0
	GT26(+)	1517.0		58 350		3146.0		41 390	

Примечание. Здесь и в табл. 3—5: prot — количество белка в осадке. Здесь и в табл. 3—6 и 9: отношения выше 100 % выделены жирным шрифтом. Двухсторонний критерий знаков для 7 пар на 1%-ном уровне: границы 0 и 7, на 5%-ном — 1 и 6. Для среды YEPD: различия между содержащими и не содержащими высокое количество прионов клетками достоверны при $p < 0.01$, для среды YEPD-ADE (содержащей 10-кратный избыток аденина) различия недостоверны.

ют накапливать красный пигмент, они «производят» гораздо больше амилоидов. В результате IF осадочных белков у них возрастает и уже мало отличается от флуоресценции осадочных белков [$PSI^{strong+}$]-клеток. Это подтверждается данными по электрофорезу в агарозном геле. Оказалось, что после того как [psi^-]-красные штаммы приобрели белый цвет, несмотря на отсутствие в них [PSI^+]-фактора, они обнаруживают значительное количество белков с весьма высокой молекулярной массой (миг-

рирующих в агарозном геле выше маркера 450 кДа — апоферритина) (рис. 2).

На рис. 2 можно видеть, что на штаммах, почти не накапливающих красного пигмента из-за сильной нон-сенс-супрессии [$PSI^{strong+}$], выращивание на среде, обогащенной аденином, сказывается мало (рис. 2, а, в, дорожки 1, 2). В то же время у розового штамма [PSI^{weak+}] со слабой супрессией после выращивания на среде YEPD-ADE при разгонке осадочных белков в агарозном

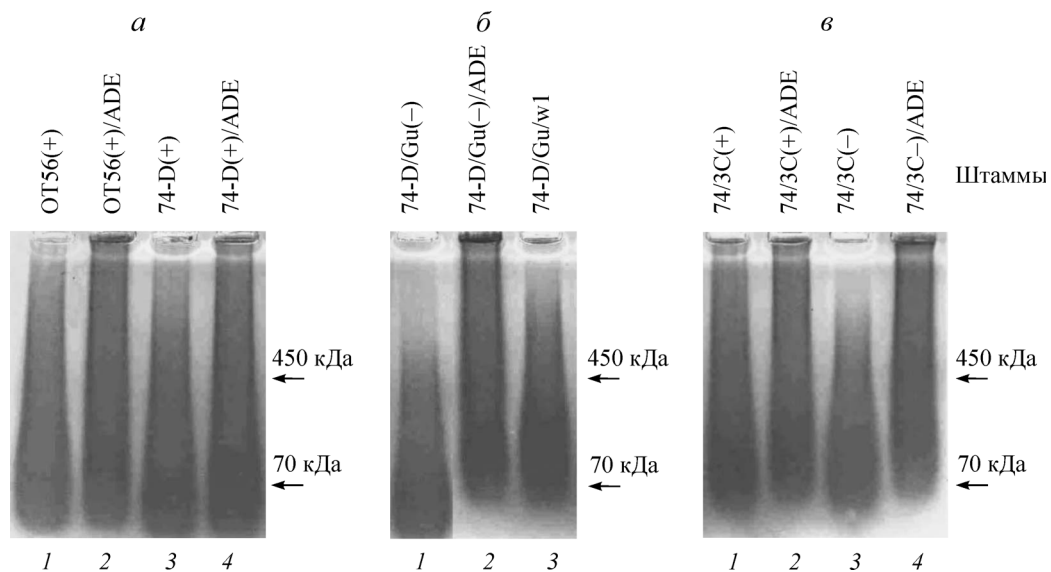


Рис. 2. Электрофореграммы осадочных белков, выделенных из грубых лизатов клеток дрожжей, выращенных на полной среде и на среде, обогащенной аденином (ADE) в 1.8%-ном агарозном геле.

а—в — разные штаммы; в, дорожка 3 — мутант белого цвета (табл. 3).

Таблица 3

IF осадочных белков изогенных пар штаммов, различающихся накоплением красного пигмента

Номер пары	Цвет культуры	Штамм	Генотип по аденину	Фактор [PSI]	IF	Отношение Бел/Кр, %	IF/prot	Отношение Бел/Кр, %
1	Кр	K5-5	<i>ade2</i>	(-)	284.6	174	3558	160
	Бел	K5-5/w1	<i>ade2ade5, 7</i>	(-)	495.9		5700	
2	Кр	АН/В	<i>ade1</i>	(-)	246.2	181	3075	204
	Бел	АН/В/w1	<i>ade1 ade6</i>	(-)	446.0		6282	
3	Кр	74-D/Gu	<i>ade1</i>	(-)	227.6	141	1897	141
	Бел	74-D/Gu/w1	<i>ade1 ade6</i>	(-)	321.3		2677	
4	Розов	74-Dw	<i>ade1</i>	(+weak)	347.8	226	524.5	336
	Бел	74-Dw/w1	<i>ade1 ade6</i>	(+weak)	787.9		1762	
5	Кр	K-13/r1	<i>ade2</i>	(+)	322.2	703	4079	958
	Бел	K-13	»	(+)	2265.0		39 070	
6	Кр	K-13/r3	»	(+)	212.4	1067	2590	1508
	Бел	K-13	»	(+)	2266.0		39 070	
7	Кр	GT26/r1	<i>ade1</i>	(+)	419.7	361	8931	653
	Бел	GT26	»	(+)	1517.0		58 350	
8	Кр	168t/r1	»	(-)	364.0	444	3370	457
	Бел	168t	»	(-)	1617.0		15 400	
9	Кр	YTK/r1	»	(?)	181.7	1098	3187	696
	Бел	YTK	»	(?)	1996.0		22 170	

Примечание. Подчеркнут цвет полученного мутантного штамма. В названии штамма: r — мутант красного цвета (Кр), w — мутант белого цвета (Бел). Двухсторонний критерий знаков для 9 пар на 1%-ном уровне: границы 1 и 8. Различия между красными и белыми клетками достоверны при $P < 0.01$.

геле обнаруживаются более выраженные различия в высокомолекулярной белковой зоне (рис. 2, а, дорожки 3, 4). Наиболее четкие различия при разгонке осадочных белков в агарозном геле характерны для [psi⁻]-красных штаммов, которые на среде YEPD-ADE становятся белыми (рис. 2, б, дорожки 1, 2, в, дорожки 3, 4).

На основе этих данных можно предположить, что даже [psi⁻ pin⁻]-штаммы содержат изрядное количество белков, способных к амилоидизации. Амилоидизация подавляется красным пигментом, поэтому в красных дрожжах таких высокомолекулярных белков мы в агарозе не видим. Однако достаточно блокировать накопление красного пигмента, как они делаются видимыми.

Для дальнейшей работы по изучению роли красного пигмента в амилоидизации белков мы решили расширить выборку сравниваемых изогенных пар. С этой целью, пользуясь индуцированным УФ-мутагенезом, у красных Ade⁻-штаммов с мутацией в гене *ADE1* или *ADE2* получали вторую мутацию, которая подавляла накопление красного пигмента, и наоборот, у Ade⁺-штаммов белого цвета, не нуждающихся в аденине, получали мутации в генах *ADE1* или *ADE2*, которые приводят к накоплению красного пигмента.

В табл. 3 приводятся данные по величинам IF, определяемым в осадочных белках полученных изогенных красно-белых пар. В отдельной графе приводится адениновый генотип исходной культуры, а также указана дополнительная мутация, полученная нами под действием УФ-облучения и идентифицированная с помощью тестерных культур. Данные табл. 3 говорят о том, что при получении из красного или розового штамма белого мутанта, в котором благодаря дополнительной мутации красный пигмент не накапливается (пары 1—4), показатели IF и IF/prot значительно увеличиваются. И наоборот, если из белого штамма получить мутант красного цвета за

счет мутации в гене *ADE1* или *ADE2* (пары 5—9), это приводит к понижению величины IF и IF/prot.

Выращивая красные штаммы, несущие мутации в генах *ADE1* и *ADE2* на среде, богатой аденином, и таким образом превращая их в белые, мы можем снова повысить показатели их флуоресценции. Об этом свидетельствуют данные табл. 4, в которой приводятся результаты попарных сравнений красных и ставших белыми клеток для 9 независимых мутантных штаммов.

Существенно, что высокая концентрация аденина в среде приводит к значительному увеличению IF осадочных белков только в штаммах, в генотипе которых есть мутации, блокирующие биосинтез аденина. Если же штаммы прототрофны по аденину (т. е. несут мутации в генах, контролирующих путь биосинтеза аденина), то показатели флуоресценции мало зависят от количества аденина в среде (табл. 5). Как видно из попарного сравнения клеток, выросших на средах YEPD и YEPD-ADE, проведенного для 6 прототрофных штаммов, в 4 случаях (пары 1—4) различия по флуоресценции невелики, а в последних 2 случаях (пары 5 и 6) высокая концентрация аденина даже подавляет IF.

Анализируя в агарозном геле осадочные белки из красных штаммов и их белых производных, и наоборот, из белых штаммов и красных мутантов, полученных из них, мы обнаружили закономерность, уже выявленную ранее. Во всех случаях в каждой изогенной паре белый штамм содержит высокополимерную фракцию белков, которая у красного штамма значительно редуцирована (рис. 3, а—в, дорожки 1—5). Таким образом, данные по изучению IF окрашенных тиофлавином T осадочных белков из красных и белых изогенных штаммов хорошо соответствуют данным электрофореза. Увеличение IF коррелирует с увеличением фракции высокомолекулярных белков. Вместе эти данные позволяют предположить,

Таблица 4

Влияние 10-кратного увеличения количества аденина (ADE) в среде на IF осадочных белков у штаммов красного цвета

Номер пары	Штаммы и их генотип по аденину	Добавка 10× аденина	Цвет культуры	IF	Отношение Бел/Кр, %	IF/prot	Отношение Бел/Кр, %
1	K5-5 <i>ade-2</i>	—	Кр	284.6	935	3558	1120
		ADE	Бел	2663.0		39 740	
2	АН/В <i>ade1</i>	—	Кр	246.2	339	3075	363
		ADE	Бел	8369.0		11 160	
3	74-D/Gu <i>ade1</i>	—	Кр	227.6	765	1897	918
		ADE	Бел	1740.0		17 400	
4	74-Dw <i>ade1</i>	—	Кр	347.8	347	524.5	1810
		ADE	Бел	1206.0		9512	
5	K-13/r1 <i>ade2</i>	—	Кр	322.2	764	4079	928
		ADE	Бел	2460.0		37 850	
6	K-13/r3 <i>ade2</i>	—	Кр	212.4	1160	2590	2120
		ADE	Бел	2468.0		54 840	
7	GT26/r1 <i>ade1</i>	—	Кр	419.7	397	8931	236
		ADE	Бел	1668.0		21 110	
8	168t/r1 <i>ade1</i>	—	Кр	364.0	496	3370	669
		ADE	Бел	1804.0		22 550	
9	УТК/r1 <i>ade1</i>	—	Кр	181.7	240	3187	171
		ADE	Бел	435.4		5440	

Примечание. Двухсторонний критерий знаков для 9 пар на 1%-ном уровне: границы 1 и 8. Различия между красными (Кр) и белыми (Бел) клетками достоверны при $P < 0.01$.

что амилоидный состав осадков, полученных из грубых лизатов дрожжей, зависит не только от прионового статуса, который можно изменять, либо элиминируя прионы известными способами, либо стимулируя их образование сверхпродукцией соответствующего гена. Амилоидный состав белковой фракции осадков зависит также от присутствия красного пигмента в штаммах, несущих мутацию в гене *ADE1* или *ADE2*. Поэтому, влияя разными способами на накопление красного пигмента в дрожжевых клетках, можно регулировать количество амилоидов в них. Получая красные мутанты из бе-

лых штаммов и белые мутанты из красных, мы наблюдали количественные различия амилоидной фракции в их осадочных белках, о которых судили по IF и миграции белков в агарозе. В красных производных неизменно наблюдали подавление амилоидности осадочных белков.

Мы полагаем, что данные, полученные в описанных опытах, характеризуют роль красного пигмента в живых клетках. Между тем представлялось интересным проверить, как действует красный пигмент, добавленный к белым клеткам при их разрушении, т. е. может ли он рабо-

Таблица 5

Влияние 10-кратного увеличения количества аденина (ADE) в среде на IF осадочных белков у штаммов белого цвета, прототрофных по аденину

Номер пары	Штаммы	Добавка избытка аденина	IF	Отношение Ade/без Ade, %	IF/Prot	Отношение Ade/без Ade, %
1	K-13 »	—	2266.0	102.0	39 070	73.0
		ADE	2305.0		28 450	
2	168t »	—	1617.0	111.0	15 400	129.0
		ADE	1800.0		20 000	
3	LL20 »	—	3084.0	120.0	31 150	103.0
		ADE	3705.0		32 220	
4	GT26 »	—	1517.0	100.0	58 350	100.0
		ADE	1520.0		58 480	
5	GT27 »	—	927.9	86.3	22 090	42.6
		ADE	800.9		9422	
6	УТК »	—	1996.0	74.0	22 170	71.0
		ADE	1488.0		15 830	

Примечание. Цвет культуры во всех случаях — белый. Двухсторонний критерий знаков для 6 пар на 1%-ном уровне: границы 0 и 6, на 5%-ном уровне — 1 и 5. Различия недостоверны.

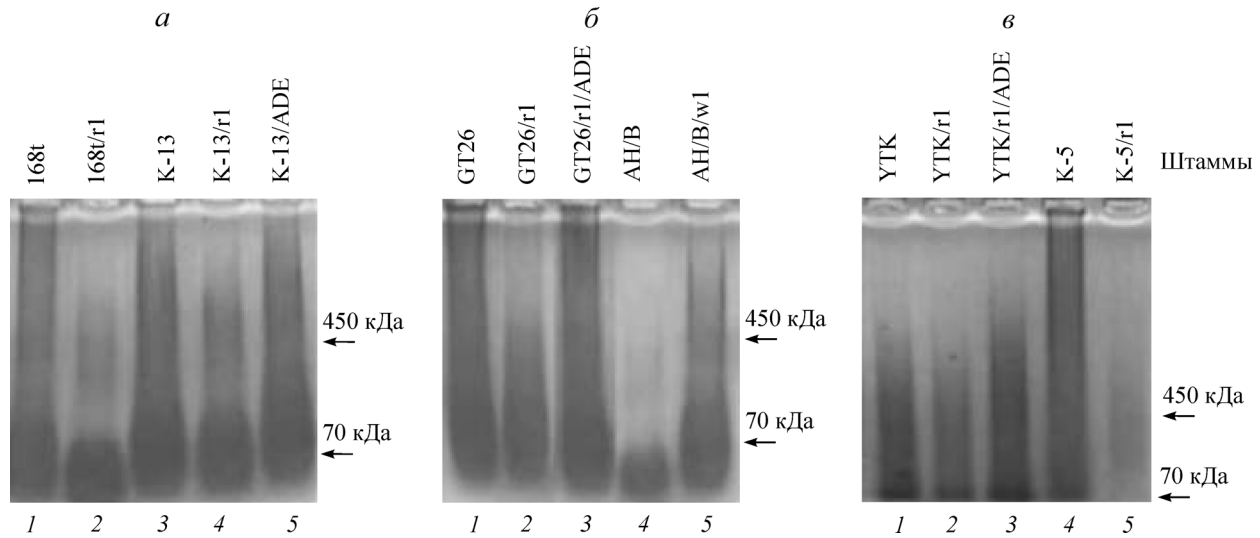


Рис. 3. Электрофореграммы осадочных белков, выделенных из грубых лизатов красных и белых изогенных штаммов в 1.8%-ном агарозном геле.

a—в: соседние дорожки представляют белые и красные дериваты штаммов (табл. 3); *дорожки 5 (a) и 3 (б, в)* — штаммы, выращенные на среде, богатой аденином.

тать *in vitro*. Чтобы ответить на этот вопрос, использовали следующую схему опыта. Клетки изогенной пары штаммов, различающейся по цвету (например, K5-5 исходно красного и K5-5/w1 — мутантного белого штамма), разрушали обычным образом в буфере А с бусами. Затем в течение нескольких секунд при 100 *g* бусы и остатки клеток осаждали, а супернатант отбирали и подвергли центрифугированию в течение 30 мин при 1000 *g* при 4 °С. Осадки отбрасывали, а осветленный таким образом клеточный лизат из клеток красных (CLRed) и белых (CLWhite) штаммов выравнивали по белку и разводили в 1.5 раза буфером А. Затем лизаты красного и белого цвета соответственно использовали для лизиса при следующем цикле разрушения клеток. Теперь брали только белые клетки и к ним в одну, опытную, пробу добавляли освет-

ленный красный клеточный лизат (CLRed), а в другую, контрольную, — осветленный белый клеточный лизат (CLWhite); опытную и контрольную пробы предварительно выравнивали по количеству белка.

Сравнение этих двух проб дает возможность выявить влияние красного пигмента на амилоидизацию. Чтобы дать время красному пигменту повлиять на процесс амилоидизации *in vitro*, лизаты из обеих проб до получения осадков выдерживали 2 ч на холоде. Результаты, полученные на разных парах красно-белых изогенных штаммов суммированы в табл. 6. Из приведенных данных видно, что, несмотря на вариабельность значений IF внутри разных повторностей, во всех случаях присутствие красного пигмента понижает IF осадочных белков, окрашенных тиофлавином Т.

Т а б л и ц а 6

Влияние красного пигмента на IF осадочных белков у белых клеток в опытах *in vitro*

Номер пары	Штаммы	Номер повторности	IF CLRed	IF CLWhite	Отношение CLWhite/CLRed, %
1	K-13 (+)	1	1606	1908	119
		2	1633	2435	149
		3	1948	2967	152
		4	1461	2226	152
2	GT26 (+)	1	1457	1952	134
		2	1132	1548	137
		3	1128	1624	143
3	AH/B/w1(-)	1	858	1120	130
		2	530	1528	288
		3	702	1046	149
4	K5-5/w1(-)	1	791	1256	159
		2	592	812	137
		3	600	736	123

Примечание. Двусторонний критерий знаков для 13 пар на 1%-ном уровне: границы 2 и 11, на 5%-ном уровне — 3 и 10. Различие достоверно при $P < 0.01$.

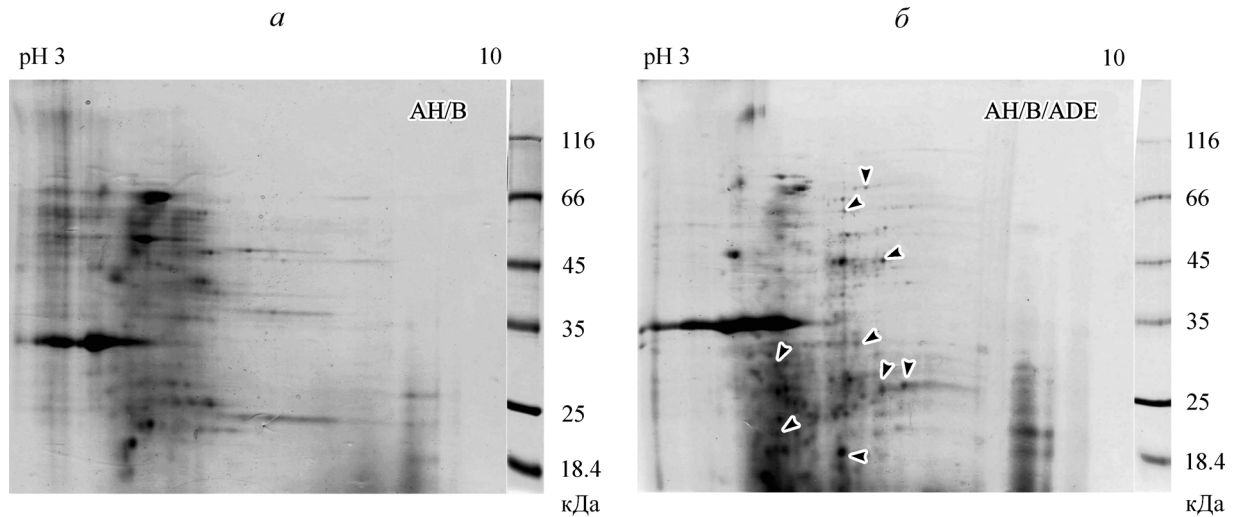


Рис. 4. Данные 2D-электрофореза для осадочных белков, выделенных из грубых лизатов клеток $[psi^-]$ -штамма AN/B красного (а) и белого (б) цвета, благодаря росту на среде YEPD-ADE.

Стрелками (б) показаны точки, соответствующие тем белкам, которые отсутствуют в осадках грубых лизатов красного штамма.

Опыты, проясняющие возможный механизм действия красного пигмента. Существенным для прояснения того, как красный пигмент может влиять на амилоидизацию, является ответ на вопрос о том, можно ли выявить в осадочной фракции белых клеток белки, отсутствующие в изогенных красных клетках.

Ранее при сравнении данных 2D-электрофореза у осадочных белков $[PSI^+]$ - и $[psi^-]$ -штаммов — цитодуктанта и реципиента — мы получили и идентифицировали с помощью MALDI-анализа большое количество белков, мобилизованных в осадок прионами, с которыми они, по литературным данным, физически связаны. Сравнение штаммов $[PSI^+]$ и $[psi^-]$, выращенных в условиях повышенного содержания аденина в среде и имеющих одинаковый белый цвет, показало прионзависимое наследование примерно 30 белков. Они относятся к 4 основным группам: шаперонам, белкам гликолиза, белкам, участвующим в клеточном ответе на окислительный стресс, и

белкам трансляции (Nevzglyadova et al., 2009; Невзглядова и др., 2009).

В настоящей работе мы сравнили с помощью 2D-электрофореза осадочные белки, полученные из $[psi^-]$ -клеток штамма AN/B, выращенного на обычной среде YEPD и среде YEPD-ADE (рис. 4, а, б). В одном случае клетки вырабатывали красный пигмент, в другом его накопление блокировалось. Данные, приведенные на рис. 4, говорят о том, что в белом штамме можно наблюдать ряд белков, которые не агрегировали и поэтому отсутствовали среди осадочных белков красного штамма. На рис. 5, 6 сравниваются 2D-электрофореграммы осадочных белков из красного штамма AN/B (-) и выделенного из него белого мутанта AN/B/w, а также белого штамма K5-13 (+) и выделенного из него красного мутанта K5-13/r, а на рис. 7 — данные для осадочных белков, выделенных из мутантных клеток штамма GT26 белого цвета (а) и полученного от него мутанта GT26/r1 (б) красного

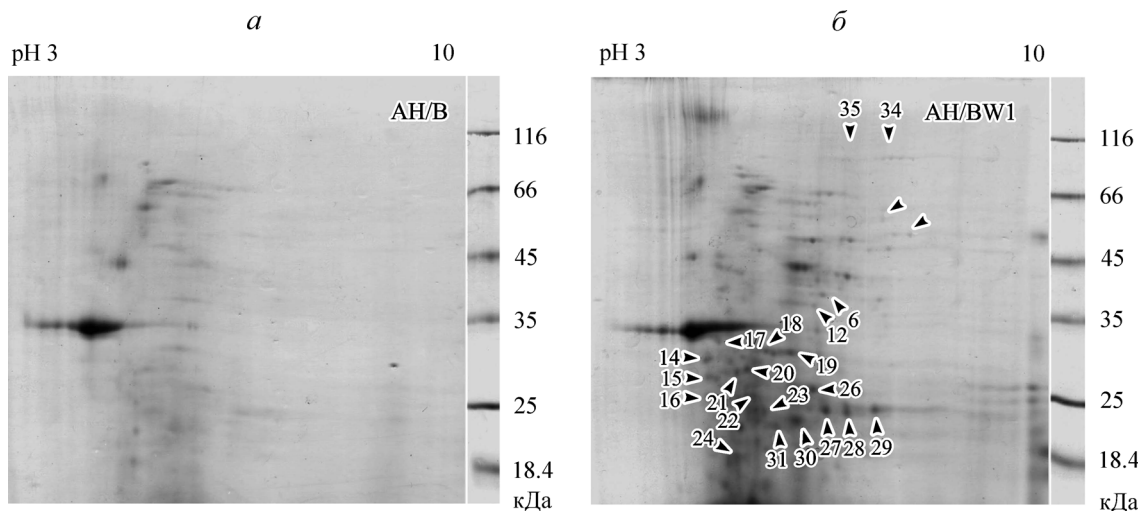


Рис. 5. Данные 2D-электрофореза для осадочных белков, выделенных из клеток $[psi^-]$ штамма AN/B красного цвета (а) и полученного из него штамма AN/B/W1 белого цвета (б) с дополнительной мутацией в гене *ade6*.

Стрелками (б) показаны точки, соответствующие белкам, которые отсутствуют в осадках грубых лизатов красных клеток. Указаны номера проб, выбранных для идентификации с помощью MALDI-анализа (табл. 7).

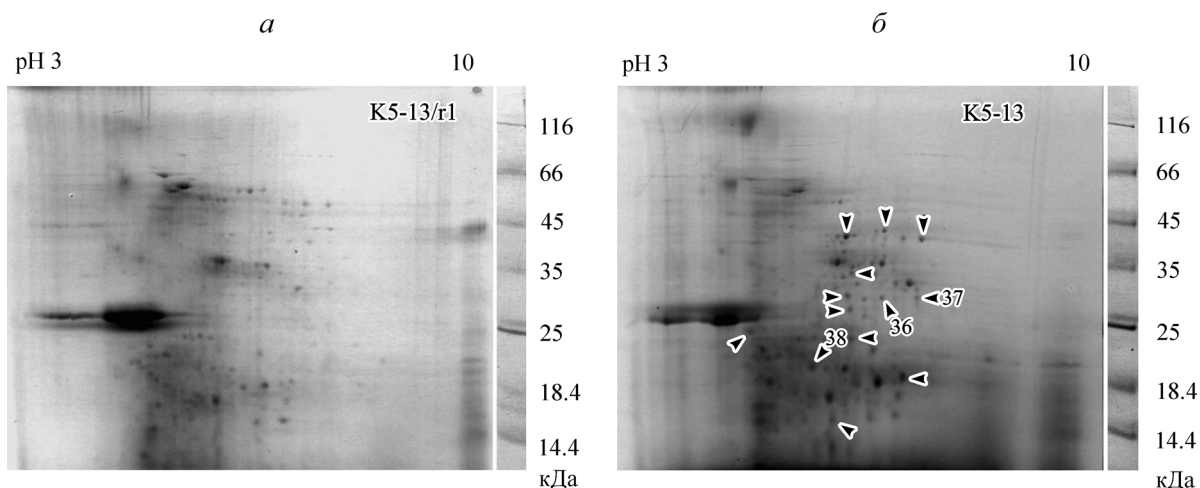


Рис. 6. Данные 2D-электрофореза для осадочных белков, выделенных из мутантных клеток штамма K5-13/r1 красного цвета (а) и исходного штамма K5-13 белого цвета (б).

Стрелками (б) показаны точки, соответствующие тем белкам, которые отсутствуют в осадках грубых лизатов красных клеток. Указаны номера проб, выбранных для идентификации с помощью MALDI-анализа (табл. 7).

цвета. На рис. 5—7 также можно видеть некоторые точки, относящиеся к осадочным белкам белых культур, которые отсутствуют у красных.

Очевидно, пигментзависимые белки могут оказываться в агрегированном состоянии и мигрировать в осадочную фракцию при центрифугировании грубых лизатов только если в штамме нет мутаций в генах *ADE1* и *ADE2*, приводящих к накоплению красного пигмента. С помощью MALDI-анализа было идентифицировано 23 белка (пронумерованных на рис. 5—7), содержащихся в белых штаммах AH/B/w, K5-13 и GT26. Так как они отсутствовали в изогенных красных штаммах, мы относим их к категории пигментзависимых осадочных белков. Табл. 7 и 8 позволяют видеть, к каким группам они принадлежат. Один из идентифицированных нами белков —

Sod1p — способен амилоидизироваться в клетках млекопитающих (Elam et al., 2003; Vanci et al., 2008). Возможно, что и в дрожжах этот белок может вести себя аналогичным образом. Остальные пигментзависимые белки относятся к тем же функциональным группам, что и определенные нами ранее прионзависимые белки.

В табл. 7 приведены белки, участвующие в клеточном ответе на окислительный стресс, и белки, участвующие в процессах трансляции и протеолиза. Более половины идентифицированных белков — шапероны и ферменты метаболизма глюкозы. Это совпадает с нашими данными о прионзависимых белках в осадках, выделенных из грубых лизатов (Nevzglyadova et al., 2009; Nevzglyadova и др., 2010). Список найденных прионзависимых белков близок к составу агрегатов, содержащих

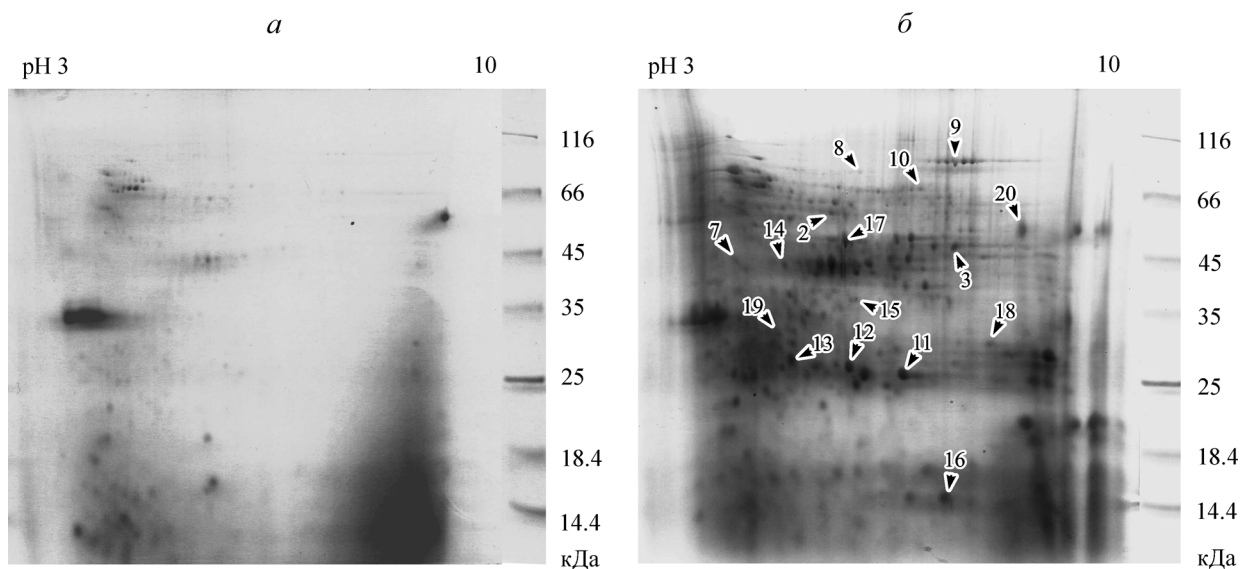


Рис. 7. Данные 2D-электрофореза для осадочных белков, выделенных из мутантных клеток штамма GT26 белого цвета (б) и полученного из него мутанта GT26/r1 красного цвета (а).

Стрелками (б) показаны точки, соответствующие тем белкам, которые отсутствуют в осадках грубых лизатов красных клеток. Указаны номера проб, выбранных для идентификации с помощью MALDI-анализа. В табл. 7 белки, идентифицированные в данном сравнении, отмечены буквой г.

Список идентифицированных белков, наличие которых в осадочной фракции предположительно подавляется красным пигментом

Белок	Номер по классификации NCBI	Номер точки на 2D-электрофореграмме	Мол. масса, кДа	ОИ	Число совпадающих пептидов	Найденные последовательности, %
Hsp26p	NP_009628	13 (g)	23.865	5.31	9	49
Hsp78p	NP_010544	08 (g)	91.280	8.17	29	37
Hsc82p (семейство Hsp90p)	NP_013911	14	80.850	4.78	12	14
Ssa1p (семейство Hsp70p)	NP_009396	17	69.615	5.00	9	15
Ssa2p (семейство Hsp70p)	EDV09289	22	69.490	4.98	10	16
Cdc48	NP_010157	01 (g)	91.939	4.82	48	58
Eno2p	NP_012044	12	46.885	5.67	16	32
		18			16	41
		21			13	30
		17 (g)			26	58
Eno1p	NP_011770	18	46.601	6.04	8	31
		20			15	34
Glk1p	NP_009890	02 (g)	55.342	5.80	24	52
Hxk2p	NP_011261	19 (g)	53.908	5.16	15	33
Pgc1p	NP_009938	6	44.552	6.73	19	55
		19			11	25
		27			9	23
		30			10	34
		31			10	34
		36			14	41
		03 (g)			19	52
Tdh3p	NP_011708	28	35.724	6.46	9	33
		29			14	47
		11 (g)			13	42
		16 (g)			8	25
Tri1p	NP_010335	26	26.779	5.74	11	61
		12 (g)			10	37
Aco1p	NP_013407	34	85.315	8.17	20	27
		09 (g)			46	51
Aco2p	NP_012335	35	86.529	6.50	12	16
Sod1p	NP_012638	23	15.845	5.62	6	48
		24			6	48
Tma19p	NP_012867	15	18.729	4.41	12	56
Gvp36p	NP_012223	07 (g)	36.647	4.91	12	52
Efb1p	NP_009398	16	22.613	4.30	9	47
Tef2p	NP_009676	20 (g)	50.001	9.14	19	41
Por1p	NP_014343	18 (g)	30.410	7.70	9	49
Ach1p	NP_009538	10 (g)	58.675	6.30	21	43
Ura1p	NP_012706	15 (g)	34.779	5.80	13	46

Примечание. (g) — белки, идентифицированные в 2D-электрофорезе для осадочных белков, выделенных из мутантных клеток штамма GT26 белого цвета и полученного из него мутанта GT26/r1 красного цвета (рис. 7). В скобках указана принадлежность к некоторым хорошо известным семействам белков.

прионоподобный полиглутаминовый домен, кодируемый первым экзоном гена гентингина, клонированного в дрожжах (Wang et al., 2007), и к спектру белков, вовлекаемых в агресомы для очищения популяции клеток от поврежденных белков (Wang et al., 2008b). Эта близость явно не случайна, так как в нашем списке присутствует один из ключевых белков дрожжевых агресом — Cdc48p. (Окислительный стресс и протеолиз также связаны с функцией агресом). Внушительный список шаперонов найден в очищенных агрегатах, содержащих [PSI⁺]-прион (Bagriantsev et al., 2008). Также богат шаперонами и белками гликолиза список карбонилированных и вовлекае-

мых в агрегаты белков, представленный в другой работе (Erjavec et al., 2007). Более подробный сравнительный анализ агрегатов приводится в нашей работе (Nevzglyadova et al., 2010).

Принимая во внимание снижение уровня амилоидности у красных штаммов по сравнению с их белыми изогенными парами, мы предлагаем следующую гипотезу для объяснения перекрытия спектров прион- и пигментзависимых белков. Пигментзависимые белки входят в число амилоидзависимых белков. Связь с амилоидами заставляет их переходить в агрегированное состояние и попадать в осадочную фракцию грубых лизатов. Накопление

Таблица 9

Влияние осветленных лизатов (CL) на IF фибрилл инсулина

Номер опыта	Отношение CLRed/B, %	IF CLRed	IF B (buffer)	IF CLWhite	Отношение CLWhite/B, %	Отношение CLWhite/CLRed, %
1	17.6	326	1848	1034	56.0	317
2	38.7	603	1560	1438	92.2	238
3	26.2	227	868	717	82.6	316
4	25.3	309	1222	896	73.3	290
5	36.3	515	1417	1487	105.0	289

Примечание. Двухсторонний критерий знаков для 5 пар на 1%-ном уровне: границы 0 и 5, на 5%-ном уровне — 0 и 5. Разница между CLWhite и CLRed, между CLRed и B достоверна при $P < 0.05$, между CLWhite и B недостоверна.

пригодны, так как сами являются высокотоксичными для клеток. За последние годы сделано множество попыток поиска перспективных антиамилоидных и антиприоновых препаратов (Ehrnhoefer et al., 2008; Riemer et al., 2008; Wang et al., 2008a; Teruya et al., 2009). Тем не менее приходится констатировать, что эффективные терапевтические средства до сих пор не созданы (Wang et al., 2008a). Мы полагаем, что красный пигмент дрожжей сахаромисетов (которые человек употребляет с пищей уже последние несколько тысяч лет) может быть перспективным кандидатом на роль фармакологического антиамилоидного средства, и надеемся подтвердить это в дальнейших опытах.

Мы благодарим Ю. О. Чернова, А. М. Зехнова и Г. А. Журавлеву за предоставление дрожжевых штаммов и плазмид, а Е. М. Тюбину — за участие в экспериментах.

Работа выполнена при финансовой поддержке С.-Петербургского научного центра РАН, Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 07-04-01454 и 09-04-00750), а также программы Ведущие научные школы (НИШ 1961.2008.4) и программы президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» (2008—2012).

Список литературы

- Вишневская А. Б., Куширов В. В., Тер-Аванесян М. Д. 2007. Нейродегенеративные амилоидозы: дрожжевая модель. Молекуляр. биол. 41 (2) : 347—354.
- Закс Л. 1976. Статистическое оценивание. М.: Статистика. 598 с.
- Невзглядова О. В., Артемов А. В., Миттенберг А. Г., Костылева Е. И., Михайлова Е. В., Соловьев К. В., Кузнецова И. М., Туроверов К. К., Сойдла Т. Р. 2010. Сравнительный анализ осадков грубых лизатов из клеток дрожжей, различающихся своим прионовым составом: идентификация набора белков, ассоциированных с прионами. Цитология. 52 (1) : 000—000.
- Невзглядова О. В., Кузнецова И. М., Артемов А. В., Михайлова Е. В., Туроверов К. К., Сойдла Т. Р. 2008. Сравнительная оценка содержания амилоида и прионов в клетках дрожжей. Цитология. 50 (1) : 40—48.
- Северин С. Е., Соловьев Г. А. 1989. Практикум по биохимии. М.: Изд-во МГУ. 508 с.
- Bagriantsev S. N., Gracheva E. O., Richmond J. E., Liebman S. W. 2008. Variant-specific [PSI⁺] infection is transmitted by Sup35 polymers within [PSI⁺] aggregates with heterogeneous protein composition. Mol. Biol. Cell. 19 : 2433—2443.
- Banci L., Bertini L., Boca M., Girotto S., Martinelli M., Valentine J. S., Vieru M. 2008. SOD1 and amyotrophic lateral sclerosis: mutations and oligomerization. PLoS ONE. 3 : e1677.

Chernoff Y. O. 2004. Cellular control of prion formation and propagation in yeast. In: Prions and prion diseases: current perspectives. Wymondham: Horizon Bioscience. 257—303.

Chernoff Y. O. (Ed.). 2007. Protein-based inheritance. Austin, Texas: Landes Bioscience. 137 p.

Chernoff Y. O., Lindquist S. L., Ono B., Inge-Vechtomov S. G., Liebman S. W. 1995. Role of the chaperone protein hsp104 in propagation of the yeast prion-like factor [PSI⁺]. Science. 268 : 880—884.

Chernoff Y. O., Uptain S. M., Lindquist S. L. 2002. Analysis of prion factors in yeast. Meth. Enzymol. 351 : 499—537.

Derkatch I. L., Liebman S. W. 2007. Prion-prion interactions. In: Protein-based inheritance. Austin, Texas: Landes Bioscience. 39—55.

Du Z., Park K.-W., Yu H., Fan Q., Li L. 2008. Newly identified prion linked to the chromatin-remodeling factor Swi1 in *Saccharomyces cerevisiae*. Nature Genetics. 40 : 460—465.

Elam J. S., Taylor A. B., Strange R., Antonyuk S., Doucette P. A., Rodriguez J. A., Hasnain S. S., Hayward L. J., Valentine J. S., Yeates T. O., Hart P. J. 2003. Amyloid-like filaments and water-filled nanotubes formed by SOD1 mutant proteins linked to familial ALS. Nat. Struct. Biol. 10 : 461—467.

Erjavec N., Larsson L., Grantham J., Nystrom T. 2007. Accelerated aging and failure to segregate damaged proteins in Sir2 mutants can be suppressed by overproducing the protein aggregation-remodeling factor Hsp104p. Genes Develop. 21 : 2410—2421.

Ehrnhoefer D. E., Biesche J., Boeddrich A., Herbst M., Masino L., Lurz R., Engemann S., Pastore A., Wanker E. E. 2008. EGCG redirects amyloidogenic polypeptides into unstructured, off-pathway oligomers. Nature Struct. Mol. Biol. 15 : 558—566.

Herczenik E., Gebbink M. F. B. G. 2008. Molecular and cellular aspects of protein misfolding and disease. FASEB J. 22 : 2115—2133.

Jones G. W., Masison D. C. 2003. *Saccharomyces cerevisiae* Hsp70 mutations affect [PSI⁺] prion propagation and cell growth differently and implicate Hsp40 and tetratricopeptide repeat co-chaperones in impairment of [PSI⁺]. Genetics. 163 : 495—506.

Jung G., Jones G., Wegrzyn R. D., Masison D. C. 2000. A role for cytosolic Hsp70 in yeast [PSI⁺] prion propagation and [PSI⁺] as a cellular stress. Genetics. 156 : 559—570.

Kryndushkin D. S., Alexandrov I. M., Ter-Avanesyan M. D., Kushnirov V. V. 2003. Yeast [PSI⁺] protein aggregates are formed by small Sup35 polymers fragmented by Hsp104. J. Biol. Chem. 278 : 49 636—49 643.

Nemecsek J., Nakayashiki T., Wickner R. B. 2009. A prion of yeast metacaspase homolog (Mca1p) detected by a genetic screen. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 106 : 1892—1896.

Невзглядова О. В., Артемов А. В., Миттенберг А. Г., Соловьев К. В., Костылева Е. И., Михайлова Е. В., Кузнецова И. М., Туроверов К. К., Сойдла Т. Р. 2009. Prion-associated proteins in yeast: comparative analysis of isogenic [PSI⁺] and [psi⁻] strains. Yeast. 26 : 611—631.

Невзглядова О. В., Артемов А. В., Миттенберг А. Г., Михайлова Е. В., Кузнецова И. М., Туроверов К. К., Сойдла Т. Р. 2010.

Chapter 6. Yeast protein aggregates, containing chaperones and glucose metabolism enzymes. In: Handbook of molecular chaperones: Roles, structures and mechanisms (Durante P. and Colucci L., Eds). Hauppauge, N.Y., USA: Nova Science Publishers. (In Press).

Patel B. K., Gavin-Smyth J., Liebman S. W. 2009. The yeast global transcriptional co-repressor protein Cyc8 can propagate as a prion. *Nature Cell Biol.* 11 : 344—349.

Riemer C., Burwinkel M., Schwarz A., Gultner S., Mok S. W. F., Heise I., Holtkamp N., Baier M. 2008. Evaluation of drugs for treatment of prion infections of the central nervous system. *J. Gen. Virol.* 89 : 594—597.

Rikhvanov E. G., Romanova N. V., Chernoff Y. O. 2007. Chaperone effects on prion and nonprion aggregates. In: Protein-based inheritance. Austin, Texas: Landes Bioscience. 83—92.

Sherman F., Fink G. R., Hicks J. B. 1986. Laboratory course manual for methods in yeast genetics. Cold Spring Harbor; New York: Cold Spring Harbor Lab. Press. 186 p.

Smirnov M. N., Smirnov V. N., Budowsky E. I., Inge-Vechtomov S. G., Serebrjakov N. G. 1967. Red pigment of adenine-deficient yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 27 : 299—304.

Song Y., Wu Y.-X., Jung G., Tutar Y., Eisenberg E., Greene L. E., Masison D. C. 2005. Role for Hsp70 chaperone in *Saccharomyces cerevisiae* prion seed replication. *Eukaryotic Cell.* 4 : 289—297.

Teruya K., Kawagoe K., Kimura T., Chen C.-J., Sakasegawa Y., Doh-ura K. 2009. Amyloidophilic compounds for prion diseases. *Infectious Disorders-Drug Targets.* 9 : 15—22.

Trevitt C. R., Collinge J. 2006. A systematic review of prion therapeutics in experimental models. *Brain.* 129 : 2241—2265.

Uversky V. N. 2008. Amyloidogenesis of natively unfolded proteins. *Curr. Alzheimer Res.* 5 : 260—287.

Uversky V. N., Oldfield C. J., Dunker A. K. 2008. Intrinsically disordered proteins in human diseases: introducing the D2 concept. *Annu. Rev. Biophys.* 37 : 215—246.

Voropai E. S., Samtsov M. P., Kaplevskii K. N., Maskevich A. A., Stepuro V. I., Povarova O. I., Kuznetsova I. M., Turoverov K. K., Fink A. L., Uverskii V. N. 2003. Spectral properties of

Thioflavin T and its complexes with amyloid fibrils. *J. Appl. Spectroscopy.* 70 : 868—874.

Wang H., Duennwald M. L., Roberts B. E., Rozeboom L. M., Zhang Y. L., Steele A. D., Krishnan R., Su L. J., Griffin D., Mukhopadhyay S., Hennessy E. J., Weigele P., Blanchard B. J., King J., Deniz A. A., Buchwald S. L., Ingram V. M., Lindquist S., Shorter J. 2008a. Direct and selective elimination of specific prions and amyloids by 4, 5-dianilinophthalimide and analogs. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 105 : 7159—7164.

Wang Y., Meriin A. B., Costello C. E., Sherman M. Y. 2007. Characterization of proteins associated with polyglutamine aggregates: a novel approach towards isolation of aggregates from protein conformation disorders. *Prion.* 1 : 128—135.

Wang Y., Meriin A. B., Zaarur N., Romanova N. V., Chernoff Y. O., Costello C. E., Sherman M. Y. 2008b. Abnormal proteins can form aggregates in yeast: aggresome-targeting signals and components of the machinery. *FASEB J.* 23 : 451—463.

Webb S., Lekishvili T., Loeschner C., Sellarajah S., Prelli F., Wisniewski T., Gilbert I. H., Brown T. R. 2007. Mechanistic insights into the cure of prion disease by novel antiprion compounds. *J. Virol.* 81 : 10 729—10 741.

Wickner R. B. 1994. [URE3] as an altered URE2 protein: evidence for an prion analog in *S. cerevisiae*. *Science.* 264 : 566—569.

Wickner R. B., Edskes H. K., Shewmaker F. 2006. How to find a prion: [URE3], [PSI⁺] and [beta]. *Methods.* 39 : 3—8.

Wickner R. B., Edskes H. K., Shewmaker F., Nakayashiki T., Engel A., McCann L., Kryndushkin D. 2007. Yeast prions: evolution of the prion concept. *Prion.* 1 : 94—100.

Wickner R. B., Shewmaker F., Kryndushkin D., Edskes H. K. 2008. Protein inheritance (prions) based on parallel in-register beta-sheet amyloid structures. *BioEssays.* 30 : 955—964.

Zakharov I. A., Yarovoy B. 1977. Cytoduction as a new tool in studying the cytoplasmic heredity in yeast. *Mol. Cell. Biochem.* 14 : 15—18.

Zhou R. Y., Li X. L., Li L. H., Li X. Y., Feng F. J. 2008. Evolution and differentiation of the prion protein gene (PRNP) among species. *J. Heredity.* 99 : 647—652.

Поступила 24 IV 2009

THE EFFECT OF RED PIGMENT ON AMYLOIDIZATION OF YEAST PROTEINS

O. V. Nevzglyadova,¹ A. V. Artemov, A. G. Mittenberg, E. V. Mikhailova, I. M. Kuznetsova, K. K. Turoverov, T. R. Soidla

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg;

¹ e-mail: oneva43@yahoo.com

Amyloid bound thioflavine T fluorescence was studied in the lysates of yeast strains carrying mutations in genes *ADE1* or *ADE2* and accumulating red pigment, a result of polymerization of aminoimidazolribotide (an intermediate of adenine biosynthesis). The fluorescence is drastically enhanced in the case of cells grown in media containing high concentration of adenine (100 mg/l) that blocks accumulation of red pigment. Blocks at first stages of purine biosynthesis *de novo* also impede red pigment and lead to the same effect on thioflavine fluorescence. At the same time induction of mutations in genes *ADE1* or *ADE2* in originally white prototrophic strains leads to considerable drop of fluorescence. A fraction of protein polymers was studied by agarose gel electrophoresis and this permitted to conclude that lowering of fluorescence intensity is indeed connected with the decrease of amyloid amount in cells accumulating red pigment. Model experiments with insulin fibers demonstrate that red pigment binds fibrils and blocks their interaction with Thioflavine T. 2D-electrophoretic comparison of pellet proteins of red and white isogenic strains, followed by MALDI, allowed identification of 23 pigment-dependent proteins. These proteins mostly belong to functional classes of chaperones and proteins, involved in glucose metabolism, closely corresponding to prion-dependent proteins characterized in our previous work. We suppose that, binding amyloid fibrils, red pigment hinders formation of prion aggregates and also, blocking fibril contact with chaperones, impedes prion propagation.

Key words: amyloid, prion, Thioflavine T, red pigment, *Saccharomyces cerevisiae*.