

СРАВНИТЕЛЬНАЯ СТРУКТУРНАЯ И ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАЗНЫХ ФОРМ КРАСНОГО ПИГМЕНТА ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* И ЕГО СИНТЕТИЧЕСКОГО АНАЛОГА

© Т. Р. Амен,¹ Е. В. Михайлова,^{2,*} В. В. Аленин,¹ А. В. Артемов,² П. А. Дементьев,³ М. А. Ходорковский,⁴ Т. О. Артамонова,⁴ И. М. Кузнецова,² Т. Р. Сойдла,² О. В. Невзглядова²

¹ С.-Петербургский государственный университет,

² Институт цитологии РАН, ³ Физико-технический институт им. А. Ф. Иоффе РАН

и ⁴ Государственный политехнический университет, Санкт-Петербург;

* электронный адрес: mikhailovaev@list.ru

Дана сравнительная структурная и функциональная характеристика природного красного пигмента (продукта полимеризации N¹-(β-D-рибофуранозил)-5-аминоимидазола), выделенного из клеток мутантов *ade1* дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, его деривозилированных производных (продуктов кислотного гидролиза природного пигмента) и синтетического пигмента, полученного в результате полимеризации N¹-метил-5-аминоимидазола *in vitro*. Продукты полимеризации *in vitro* идентифицировали при помощи масс-спектрометрии. Все изученные пигменты способны связываться с амилоидами инсулина и подавляют их рост. Данные электронной и атомно-силовой микроскопии позволили выявить общую особенность, присущую препаратам инсулиновых фибрилл, выращенных в присутствии всех форм красного пигмента. Они представляют собой стабильные, устойчивые к воздействию ультразвука конгломераты (в то время как агрегаты инсулина, выращенные без пигментов, чувствительны к действию ультразвука). Вероятно, красный пигмент, вызывая слипание фибрилл, частично блокирует их свободные концы и тем самым тормозит присоединение к ним мономеров.

Ключевые слова: инсулин, амилоид, тиафлавин Т, красный пигмент, *Saccharomyces cerevisiae*, 5-аминоимидазолриботид (АИР).

Принятые сокращения: АИР — N¹-(5'-О-фосфо-β-D-рибофуранозил)-5-аминоимидазол, АИРЗ — N¹-(β-D-рибофуранозил)-5-аминоимидазол, ИФ — интенсивность флуоресценции, Р(МеАИ) — полимер N¹-метил-5-аминоимидазола.

Природные пигменты представляют собой вещества различной химической организации, которые объединяет дифференциальное поглощение света в видимой области спектра. Разнообразие групп природных пигментов чрезвычайно велико.

Изучение природных пигментов представляет несомненный научный и практический интерес, поскольку природные пигменты не только обеспечивают окраску организмов, но и выполняют важнейшие функции. Например, каротиноиды участвуют в переносе кислорода и фоторецепции, хиноны (переносчики электронов) и нафтохиноновые грибы обеспечивают антибактериальную защиту, меланины защищают от активных форм кислорода и УФ-излучения (Britton, 1983; Liu, Nizet, 2009). Пигменты могут потенциально использоваться как лекарственные и профилактические вещества. Например, бета-каротин применяют при профилактике эритропоэтической протопорфирии, астаксантин — для уменьшения окислительного стресса при различных заболеваниях, красный пигмент из гамма-протеобактерии *Hahella chejuensis* — в качестве противоопухолевого и иммуносупрессорного агента (Bayerl, 2008; Kim et al., 2008; Kidd, 2011). Кроме того, пигменты используются в промышленности как красители и пищевые добавки.

Красный пигмент дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* относится к группе N-гетероциклических соединений, в которую входят пурины, птерины и их производные. Культивирование в аэробных условиях клеток дрожжей *S. cerevisiae*, у которых инактивирован ген *ADE1* или *ADE2*, приводит к накоплению в цитоплазме клеток 5-аминоимидазолриботида (АИР), который, как полагают, транспортируется в вакуоли (глутатионзависимо) и в результате полимеризации и модификаций превращается в красный пигмент (Smirnov et al., 1967; Fisher, 1969; Sharma et al., 2003). В результате колонии мутантов *ade1* и *ade2* приобретают красную окраску. Структура красного пигмента точно не установлена, однако показано, что в его состав входят имидазол, рибоза и аминокислоты и что он не содержит фосфата. На основании этого была постулирована структура пигмента (рис. 1), который образуется в результате полимеризации 5-аминоимидазолриботида (АИРЗ) (образования связей между вторым и четвертым атомами имидазольного ядра мономеров) и последующей модификации полимера, заключающейся в присоединении аминокислот к аминогруппам полимера (Смирнов, 1967).

Ранее нами было показано снижение общего уровня амилоидов в клетках *S. cerevisiae*, накапливающих крас-

ный пигмент (по сравнению с белыми изогенными штаммами). Кроме того, мы установили, что пигмент влияет на кинетику образования фибрилл инсулина *in vitro*, вероятно в результате связывания красного пигмента с фибриллами, что препятствует их росту и влияет на образование агрегатов (Михайлова и др., 2011; Nevzglyadova et al., 2011, 2012).

Цель настоящей работы состояла в дальнейшем изучении красного пигмента и установлении химической структуры полимеров, обладающих потенциальной антиамилоидной активностью. Для этого наряду с препаратом природного пигмента мы получили препараты кислотных гидролизатов красного пигмента, не содержащие рибозы, синтезировали искусственный пигмент, не содержащий рибозы и аминокислот, и изучили антиамилоидную активность этих препаратов.

Материал и методика

В работе использовали проназу (Sigma, США), DEAE-целлюлозу (GE Healthcare, Великобритания), бычий инсулин (Sigma, США), тиофлавин Т (Fluka, США) и сефадекс G-25 (GE Healthcare, Великобритания). Для культивирования дрожжевых клеток использовали традиционную полную питательную среду (Sherman et al., 1986).

Синтез искусственного пигмента Р (Me AI). К 20 мг N¹-метил-4-этоксикарбонил-5-аминоимидазола (Аленин и др., 1987) добавляли 150 мкл 2 М NaOH, смесь перемешивали в течение приблизительно 15 мин на кипящей водяной бане до полного растворения и выдерживали при 100 °С в течение 90 мин. Значение pH полученного и охлажденного раствора доводили до 5 с помощью 2 М уксусной кислоты и инкубировали при 60 °С 30 мин. Полученный раствор N¹-метил-5-аминоимидазола (MeAI) полимеризовали в течение 2 ч при комнатной температуре, перемешивая на качалке и оставляли полученную смесь на 2—3 сут при комнатной температуре. Раствор, который приобрел красно-коричневую окраску, наносили на колонку с сефадексом G-25 (диаметр колонки 1.8 см, высота геля 6 см) и элюировали водой. Первой выходит красно-коричневая фракция, а затем желтая. Полученную красно-коричневую фракцию, называемую в дальнейшем Р(MeAI), использовали в качестве образца для масс-спектрометрии и в других экспериментах.

Выделение и очистка природного красного пигмента (P1) и получение его дериватизированных производных P2a и P2c. Супернатант грубых лизатов, выделенных из клеток штамма 74-D694 (*MATa ade1-14 ura3 his3 trp1 leu 2*), содержащий красный пигмент, получали из механически разрушенных дрожжевых клеток (Nevzglyadova et al., 2011). Затем проводили его депротенинизацию смесью хлороформа с метанолом (3 : 7) с последующим выдерживанием при 0 °С в течение 10 мин и центрифугированием при 1000 g в течение 5 мин. После двух депротенинизаций, удаления органических растворителей и высушивания при комнатной температуре пигмент выдерживали с проназой (1 мг/мл) в Трис-HCl (0.1 М, pH 8.0) в течение 20 ч при 37 °С (концентрация пигмента при этом составляла около 20 мг/мл). После инкубации пигмент еще дважды депротенизировали той же смесью хлороформа с метанолом.

Очищенную фракцию красного пигмента делили на две части, одна из которых подвергалась кислотному гидролизу (1 М HCl, 100 °С, 2 ч). Гидролизат нейтрализова-

ли NaOH, после чего центрифугировали при 1000 g в течение 10 мин. Полученный супернатант, содержащий красный пигмент (далее P2), как и красный пигмент, не прошедший гидролиза (далее P1), дополнительно очищали при помощи колоночной хроматографии, как описано ранее (Nevzglyadova et al., 2010, 2012).

В процессе хроматографии гидролизата P2 на колонке с DEAE-целлюлозой были получены две окрашенные фракции: первой элюировалась фракция, называемая в дальнейшем P2a, второй — фракция, называемая в дальнейшем P2c.

Все полученные препараты красного пигмента, называемые в дальнейшем соответственно P1, P2a и P2c, после обессоливания на колонке с сефадексом G-25 высушивали при комнатной температуре и непосредственно перед экспериментами растворяли в деионизированной воде до требуемой концентрации.

Качественный метод определения рибозы. Рибозу в пробах пигмента определяли орциновым методом в модификации (Smirnov et al., 1967). К 1 мл пробы, содержащей 300 мкг пигмента, добавляли 1 мл орцинового реактива (раствор 6 мг перекристаллизованного орцина и 1 мг CuSO₄ · 5H₂O в 10 мл 11 М HCl). Пробу инкубировали при 100 °С в течение 15 мин. О наличии рибозы в пробе судили по развивающейся зеленой окраске.

Аминокислотный анализ. Анализ аминокислот, входящих в состав красного пигмента, проводили с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Красный пигмент гидролизовали (6 М HCl) в течение 18 ч при 110 °С, после чего проводили реакцию с фенилизотиоционатом для получения производных свободных аминокислот. Полученный раствор высушивали под вакуумом, растворяли в небольшом количестве дистиллированной воды, фильтровали и вводили в систему ВЭЖХ. Хроматографию проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе (Shimadzu, Япония), включающем в себя дегазатор DGU-20A3, насос с клапаном для создания градиента низких давлений LC-6AD, колоночный термостат CTO-20A и фотодиодный детектор сигнала SPD-M20A. Хроматографическое разделение проводили в колонке Supelcosil LC-18 (250×4.6 мм, размер частиц 5 мкм).

Масс-спектрометрический анализ (TOF-MALDI). Смесь 1—2 мкл раствора матрицы (3, 5-диметокси-4-гидроксикоричной кислоты) с раствором анализируемого красного пигмента (при соотношении объемов 1 : 1) наносили на стальную плашку-мишень и высушивали на воздухе. Растворы матриц (в концентрации 10 мг/мл) готовили в смеси 60%-ного ацетонитрила с 0.1%-ным водным раствором трифторуксусной кислоты (при соотношении объемов 1 : 2). Спектры MALDI регистрировали на времяпролетном приборе Reflex IV компании Bruker Daltonics, оборудованном азотным лазером с рабочей длиной волны 337 нм при положительной полярности в линейном режиме. Для получения хорошего сигнала мощность лазера устанавливали на минимальном уровне. Для калибровки прибора в диапазоне молекулярных масс использовали стандартный набор фирмы Sigma — ProteoMass Protein MALDI-MS Calibration Kit.

Получение фибрилл инсулина. Растворяли 2 мг бычьего инсулина в 1 мл буфера (20 % CH₃COOH и 100 мМ NaCl, pH 2) и смесь инкубировали в течение 24 ч при 37 °С и постоянном перемешивании. Концентрацию фибрилл инсулина оценивали спектрофотометрически при длине волны 365 нм.

Для оценки влияния препаратов пигмента на рост фибрилл к раствору инсулина добавляли препараты пигмента разной концентрации и измеряли оптическую плотность раствора фибрилл (при длине волны 365 нм) через 24 ч после начала опыта.

Измерение интенсивности флуоресценции (ИФ). Для изучения зависимости ИФ тиофлавина Т, связанного с амилоидными фибриллами инсулина, от концентрации красного пигмента сначала определяли концентрацию всех форм пигмента, выровненных по оптической плотности ($A_{490} = 4.5$): нормализованные по массе растворы высушивали, взвешивали и снова растворяли в равных объемах воды. Разные аликвоты (от 1 до 30 мкл) препаратов Р1, Р2а, Р2с и Р(МеАИ) добавляли к 30 мкл суспензии амилоидов (концентрация белка 2 мкг/мкл). К пробам добавляли по 30 мкл раствора тиофлавина Т при концентрации 10^{-3} М и объем пробы доводили до 1 мл водой. ИФ тиофлавина Т измеряли при длинах волн возбуждения и эмиссии 435 и 486 нм соответственно. ИФ самих пигментов (рН 7) измеряли при длине волны возбуждения 450 нм. Все измерения проводили на флуоресцентном спектрофотометре Cary Eclipse (Varian Inc., США). Для обработки данных использовали программы Cary Eclipse Scan Application v. 1.1 и Exel (Microsoft, США).

Трансмиссионная электронная микроскопия (ТЭМ). Медные сетки (300 mesh; Sigma, США) покрывали коллодиевой пленкой с угольным напылением. Суспензии выросших фибрилл инсулина разбавляли в 30 раз деионизированной водой, после чего суспензию фибрилл по 10 мкл наносили на сетки. Через 1 мин избыточную влагу удаляли фильтровальной бумагой, а сетки помещали на каплю 1%-ного раствора уранил-ацетата. Через 2 мин избыточную влагу удаляли и сетки высушивали. Препараты изучали при помощи электронного микроскопа LIBRA 120 (Carl Zeiss, Германия). Для разделения фибрилл инсулина (перед нанесением на сетки) их обрабатывали ультразвуком (30 кГц) в течение 1—4 мин на лабораторном диспергаторе Labsonic M (Sartorius stedum, Германия).

Атомно-силовая микроскопия. Исследования методом атомно-силовой микроскопии (АСМ) проводили на приборе Ntegra Aura (ЗАО «НТ-МДТ», г. Зеленоград). Измерения проводили в форвакууме (10^{-2} мбар), а также в условиях остаточного форвакуума (10 мбар) при комнатной температуре. Применяли стандартные полуконтактные зонды NSG11 с характерным радиусом закругления окончания 10—20 нм.

Методы статистической обработки. Для оценки и анализа полученных данных применяли стандартные методы. Каждый эксперимент повторяли не менее 3 раз. Для выбора критерия оценки значимости парных различий проверяли соответствие формы распределения нормальному по критерию Колмогорова—Смирнова, а также контролировали равенство генеральных дисперсий с помощью F-критерия Фишера. При нормальном распределении рассчитывали среднюю арифметическую величину и среднее отклонение, а оценку разности между средними проводили с помощью *t*-критерия Стьюдента (Гланц, 1999).

Результаты и обсуждение

Структурная характеристика разных препаратов красного пигмента. Анализ природного красного пигмента (в наших опытах обозначенного

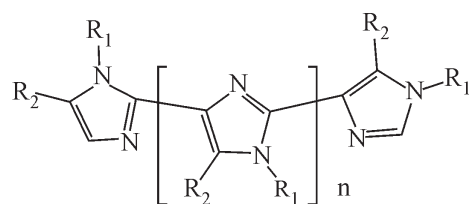


Рис. 1. Гипотетическая структурная формула красного пигмента. R₁ — рибозильный остаток; R₂ — аминогруппа или аминокислота, связанная амидной связью с аминокислотой (Смирнов, 1967).

Р1), выделенного из клеток мутанта *adel* (Смирнов, 1967), показал, что пигмент содержит рибозу, имидазол, а также аминокислоты и, вероятно, представляет собой продукт полимеризации N¹-(β-D-рибофуранозил)-5-аминоимидазола (АИРЗ). Верхний предел мол. массы полимера не превышал 10 кДа. Смирновым была предложена структурная формула (рис. 1), в соответствии с которой полимеризация идет за счет образования химических связей между вторым и четвертым атомами углерода мономеров (Smirnov et al., 1967). Образовавшиеся полимеры дополнительно модифицируются (образуются амидные связи между аминогруппами полимера и карбоксильными группами аминокислот). Приведенная на рис. 1 структура не подтверждена экспериментально, и, следовательно, точная структура пигмента к настоящему моменту не установлена.

Для выяснения структуры красного пигмента (Р1) нами получены его дерибозилированные производные (Р2а и Р2с) и синтетический пигмент Р(МеАИ), для синтеза которого *in vitro* в качестве мономера использовали

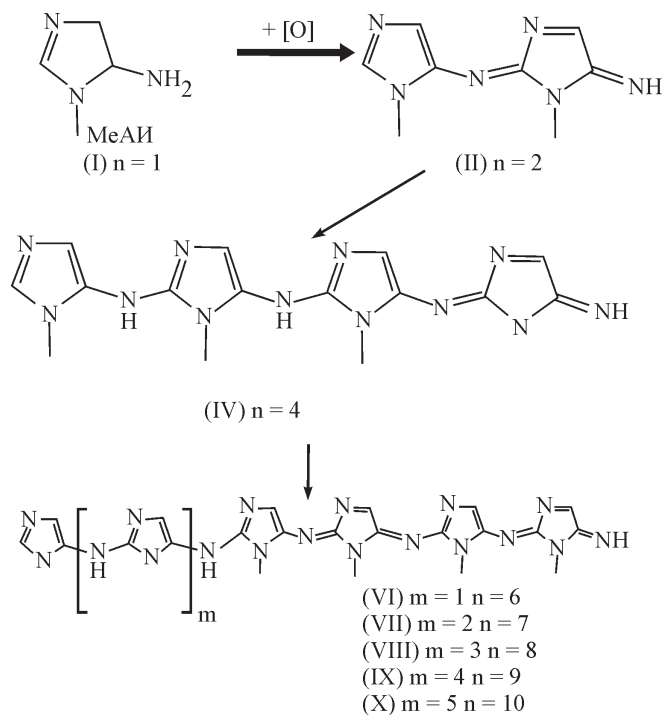


Рис. 2. Схема окислительной полимеризации N¹-метил-4-аминоимидазола (МеАИ), полученная на основе данных масс-спектрометрии.

Римскими цифрами обозначены соединения, которые идентифицированы в препарате Р(МеАИ) с помощью масс-спектрометрии (см. рис. 7, з); *n* — общее число мономеров в молекуле полимера ($n = m + 5$, где *m* — дополнительное число мономеров, включенных в полимер).

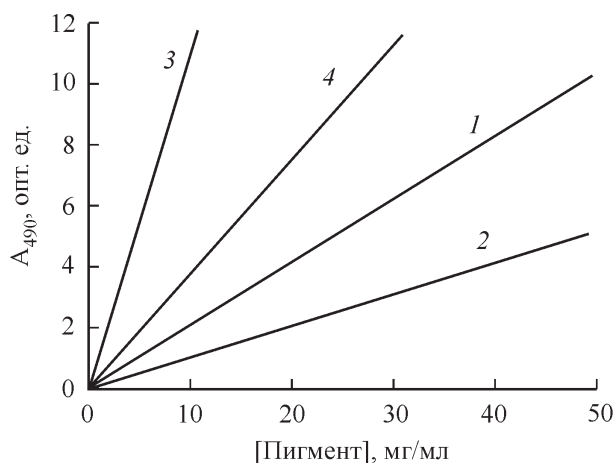


Рис. 3. Зависимость оптической плотности растворов пигментов при длине волны 490 нм (A_{490}) от концентрации препарата пигмента (мг/мл).

Кривые: 1 — P1, 2 — P2a, 3 — P2c, 4 — P(МеАИ).

N^1 -метил-5-аминоимидазол — структурный аналог природного мономера АИРЗ. Структуру P(МеАИ) удалось установить с помощью масс-спектрометрии (рис. 2).

Кислотный гидролиз красного пигмента P1 приводит к образованию соединений, которые при прохождении колонки с DEAE-носителем разделяются на две окрашенные фракции — P2a и P2c. Они различаются по распределению заряда: P2a выходит первой с DEAE-колонки, что свидетельствует о большем количестве положительно заряженных остатков.

Для сравнения разных форм пигмента по структуре и по активности их взаимодействия с амилоидами препараты P1, P2a, P2c и P(МеАИ) высушивали, растворяли в деионизированной воде и строили графики зависимости оптической плотности растворов (A_{490}) от их концентрации (рис. 3). Пользуясь полученными данными, мы могли в дальнейшем выравнивать растворы разных форм пигмента по количеству вещества.

Так как в пигменте P1 ранее было показано наличие рибозы и аминокислотных остатков (Smirnov et al., 1967), мы оценили, как различаются препараты пигментов, полученные нами, по содержанию рибозы и аминокислот. Качественная реакция на рибозу позволяет видеть, что кислотный гидролиз приводит к отщеплению рибозы как от полимера P2a, так и от полимера P2c (рис. 4).

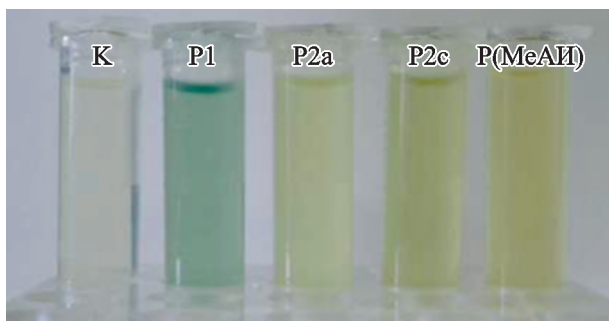


Рис. 4. Качественный тест, позволяющий оценить содержание рибозы в препаратах красного пигмента P1, P2a, P2c и синтетическом P(МеАИ).

Препарат P1 наиболее сильно отличается от контрольного препарата К, не содержащего рибозы.

Аминокислотный анализ препаратов пигмента (см. таблицу) выявил преобладание отрицательно заряженных (при нейтральном pH) аминокислот — аспарагиновой и глутаминовой, что соответствует данным, представленным в литературе (Smirnov et al., 1967). Кроме того, в препарате P1 преобладают глицин и пролин, в P2a — глицин и лизин, а в P2c — пролин. Можно предположить, что присутствие значительного количества лизина в P2a приводит к повышению общего положительного заряда, что и обеспечивает быструю элюцию пигмента P2a с DEAE-колонки (по сравнению с пигментами P1 и P2c).

Исследование пигментов с помощью спектроскопии в видимой области спектра показало, что только P(МеАИ) имеет характерный максимум поглощения в области 490 нм; максимумы поглощения пигментов P1, P2a и P2c не проявляются, по-видимому из-за высокого поглощения в коротковолновой области (рис. 5).

Так как красный пигмент обладает собственной флуоресценцией (Weisman et al., 1987), мы оценили интенсивность собственной флуоресценции у всех препаратов пигмента. Полученные данные представлены на рис. 6. Максимумы ИФ у препаратов, полученных на основе природного пигмента, находятся в области 440—460 нм; при этом гидролизованные формы, в особенности P2c, имеют более высокие значения ИФ, чем P1. Синтетический пигмент P(МеАИ) имеет два максимума, и основной пик ИФ заметно смещен в коротковолновую область.

С помощью масс-спектрометрии мы предприняли попытку идентифицировать полимеры, входящие в состав препаратов P1, P2a, P2c и P(МеАИ). Данные масс-спектроскопического анализа этих препаратов приведены на рис. 7.

Как следует из данных, представленных на рис. 7, препарат природного красного пигмента P1 (рис. 7, а) содержит набор полимеров, мол. масса которых колеблется

Относительное содержание аминокислот в разных препаратах пигмента

Аминокислоты	Содержание аминокислоты, %			
	P1	P2a	P2c	P1 (Smirnov et al., 1967)
Аспарагиновая и аспарагин	14.1	26.7	30.4	15.60
Аргинин	0.3	0.4	0.2	—
Аланин	1.4	2.6	3.1	3.16
Валин	1.0	3.1	0.5	2.93
Глицин	8.4	7.1	1.6	21.90
Гистидин	0.8	0.9	0.5	0.92
Глутаминовая и глутамин	14.4	7.3	3.9	33.90
Изолейцин	0.8	1.4	0.6	1.42
Лейцин	0.8	2.1	0.7	1.19
Лизин	1.4	22.2	0.4	1.47
Метионин	1.1	0.7	1.5	—
Оксипролин	0.2	0.2	0.1	—
Пролин	45.3	9.0	50.4	3.89
Серин	3.4	4.3	0.7	2.93
Треонин	4.8	9.0	1.8	2.43
Тирозин	0.4	0.4	0.5	0.92
Фенилаланин	0.4	1.8	0.7	0.55
Цистин+цистеин	1.0	0.7	1.9	6.87

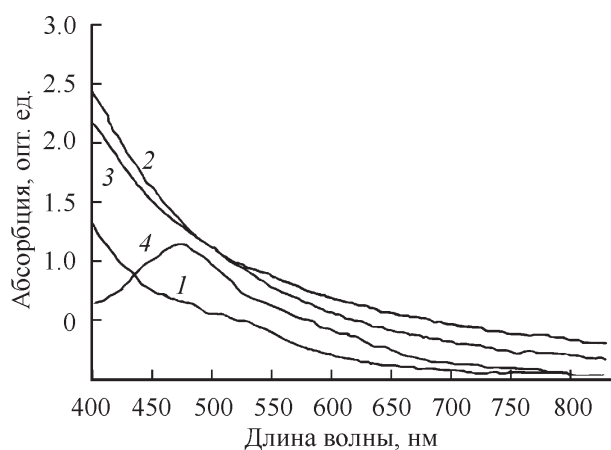


Рис. 5. Спектры поглощения пигментов P1, P2a, P2c и P(MeAI) при pH 6 в видимой области спектра.

Кривые: 1 — P1, 2 — P2a, 3 — P2c, 4 — P(MeAI).

в диапазоне 2—10 кДа, в то время как препараты P2a (рис. 7, б) и P2c (рис. 7, в), полученные в результате кислотного гидролиза P1, имеют значительно меньшую мол. массу (в среднем 1—2 кДа). Однако для пигментов P1, P2a и P2c не удалось идентифицировать пики, которые указывали бы на регулярную структуру этих полимеров. Мы полагаем, что отсутствие регулярности обусловлено тем, что мономеры, входящие в состав указанных полимеров, могут иметь различный аминокислотный состав. Масс-спектрометрический анализ полимера P(MeAI),

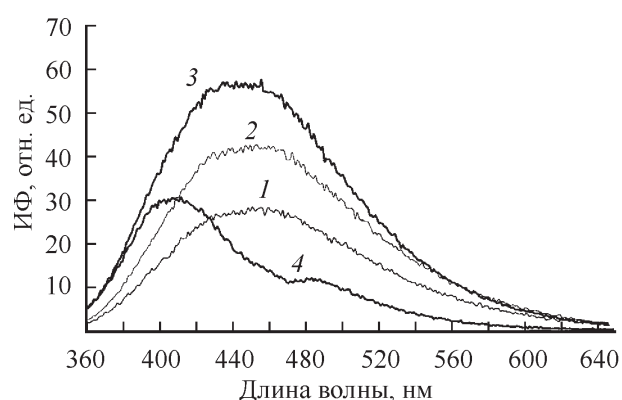


Рис. 6. Спектры флуоресценции препаратов пигментов (pH 7) при длине волны возбуждения 450 нм.

Кривые: 1 — P1, 2 — P2a, 3 — P2c, 4 — P(MeAI). ИФ — интенсивность флуоресценции.

образующегося из мономеров, не содержащих аминокислот, подтверждает наше предположение. На рис. 7, з можно видеть пики, соответствующие полимерам, состоящим из 4, 6, 7, 8, 9 и 10 структурных единиц.

Влияние разных форм красного пигмента на инкорпорацию красителя тиофлавина Т в амилويدы. Тиофлавин Т — флуоресцентный краситель, специфически связывающийся с белками в амилонидной форме. Как было показано ранее, красный пигмент, который также связывается с амилонидными бел-

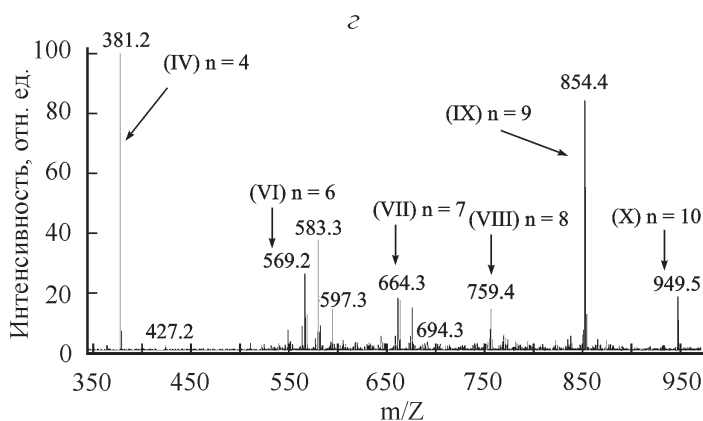
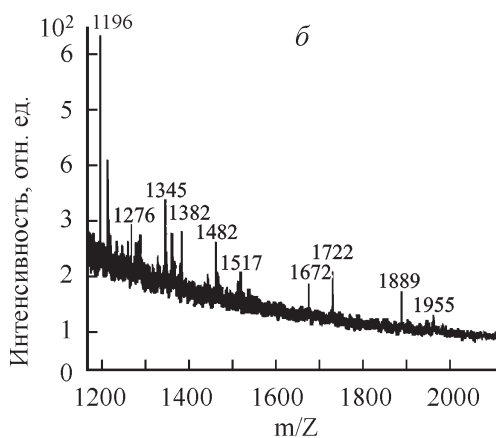
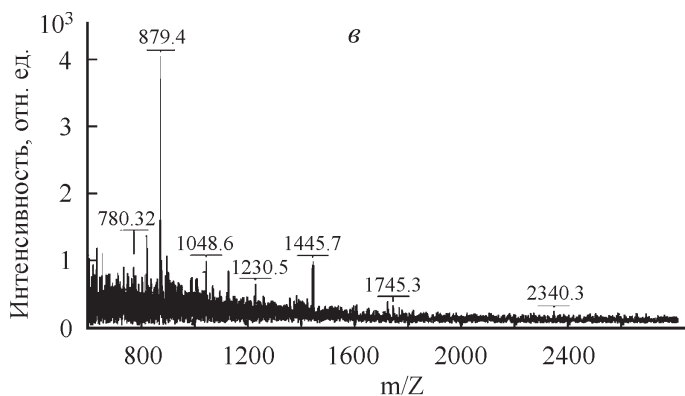
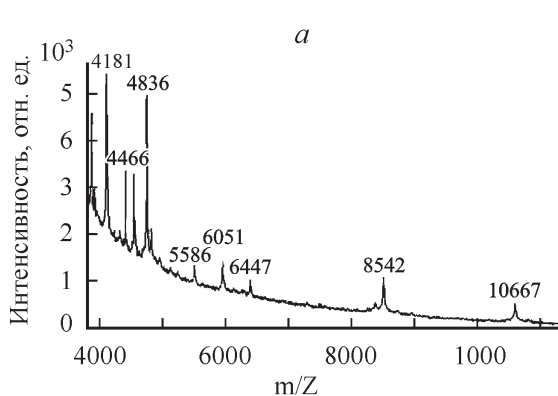


Рис. 7. Спектры TOF-MALDI препаратов красного пигмента P1 (а), P2 (б), P2c (в) и P(MeAI) (г).

г — отмечены пики, соответствующие полимерам с разным количеством мономеров (n) в цепи, структура которых приведена на рис. 2.

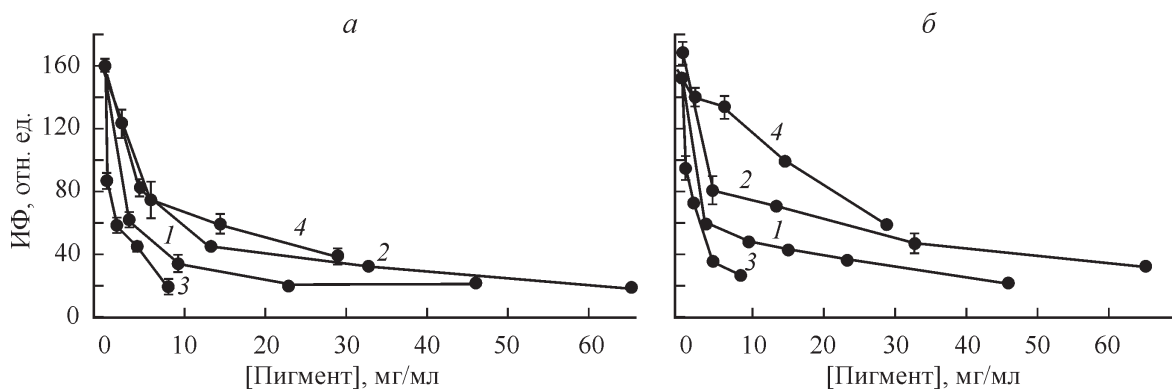


Рис. 8. Зависимость интенсивности флуоресценции тиофлавина Т, инкорпорированного в фибриллы инсулина, от концентрации пигмента.

a — добавление пигмента предшествует добавлению тиофлавина; *б* — добавление тиофлавина Т предшествует добавлению пигмента. Кривые: 1 — P1, 2 — P2a, 3 — P2c, 4 — P(MeAI).

ками, конкурирует с тиофлавином Т за сайты связывания в молекуле белка и вызывает подавление ИФ этого красителя (Nevzglyadova et al., 2011). Для каждого препарата красного пигмента были получены зависимости ИФ тиофлавина Т, инкорпорированного в амилоиды инсулина, от концентрации пигментов (рис. 8).

Как следует из графиков, представленных на рис. 8, *a*, разные формы пигмента с разной эффективностью конкурируют с тиофлавином Т за связывание с фибриллами. Так, например, в контроле, когда амилоиды образуются в отсутствие пигмента, ИФ составляет около 180 отн. ед., добавление пигмента P2c в концентрации 8 мг/мл приводит к падению ИФ примерно до 20 (рис. 8, *a*, кривая 3), пигмента P1 — до 40 (рис. 8, *a*, кривая 1), P2a — до 60 (рис. 8, *a*, кривая 2), P (MeAI) — до 70 (рис. 8, *a*, кривая 4) отн. ед. Это дает основание считать, что P2c является самым конкурентоспособным из изученных нами препаратов пигмента, если его добавлять к фибриллам непосредственно перед тиофлавином Т. При изменении порядка добавления (сначала тиофлавин Т, а потом препарат пигмента) можно проследить за тем, насколько эффективно разные формы пигмента вытесняют уже связавшийся с фибриллами тиофлавин Т (рис. 8, *б*). Оказалось, что при разном порядке добавления пигментов сравни-

тельная эффективность изученных препаратов пигмента практически не изменяется: P2c остается наиболее эффективным антиамилоидным препаратом пигмента (рис. 8, *б*, кривая 3).

Влияние разных форм пигмента на образование амилоидов инсулина. Мы также исследовали, как связывание разных форм красного пигмента с фибриллами инсулина сказывается на их росте. С этой целью фибриллы выращивали в течение 1 сут в соответствующем буфере в присутствии препаратов пигмента (опыт) и без пигмента (контроль) и измеряли оптическую плотность (A) при длине волны 365 нм в начальной (A_0) и конечной (A_{24}) временных точках. Содержание фибрилл (C) в контроле (C_K) и опыте ($C_{оп}$) рассчитывали по формуле $C = (A_{24} - A_0)/A_{24}$. Затем строили зависимости величины подавления роста амилоидов в % ($100 \cdot C_{оп}/C_K$) от концентрации пигментов (мг/мл), которые приведены на рис. 9.

На основании полученных данных можно полагать, что P2c эффективнее других препаратов подавляет рост фибрилл при сравнительно низких концентрациях. Синтетический пигмент P(MeAI) подавляет амилоидизацию инсулина слабее, чем P1, P2a и P2c.

Данные электронной микроскопии позволяют визуализировать влияние препаратов пигмента на рост фибрилл инсулина. Рис. 10 дает представление о том, как выглядят амилоиды инсулина через 24 ч при формировании в буфере (контрольный образец) (рис. 10, *a*), а также в присутствии в буфере препаратов пигмента P1 (рис. 10, *в*), P2a (рис. 10, *д*), P2c (рис. 10, *ж*) и P(MeAI) (рис. 10, *и*). Так как инсулиновые фибриллы объединяются в более крупные агрегаты, мы подвергали их действию ультразвука (в течение 1 мин) в режиме, достаточном для разрушения агрегатов в контрольном образце (ср. на рис. 10 *a* и *б*). При этом оказалось, что агрегаты, образующиеся в присутствии пигментов, в этих условиях не распадаются (ср. на рис. 10: *в* и *г*, *д* и *е*, *ж* и *з*). Исключение составляют амилоиды, полученные в присутствии P(MeAI), которые распадаются, хотя, возможно, в меньшей степени, чем в контрольном образце (ср. на рис. 10 *и* и *к*). Можно предположить, что P1, P2a и P2c вызывают «склеивание» фибрилл инсулина, что и обеспечивает повышенную устойчивость агрегатов. При увеличении экспозиции ультразвука в 4 раза, когда контрольные фибриллы не просто разделялись, но и распались на отдельные мелкие фрагменты, амилоиды, полученные

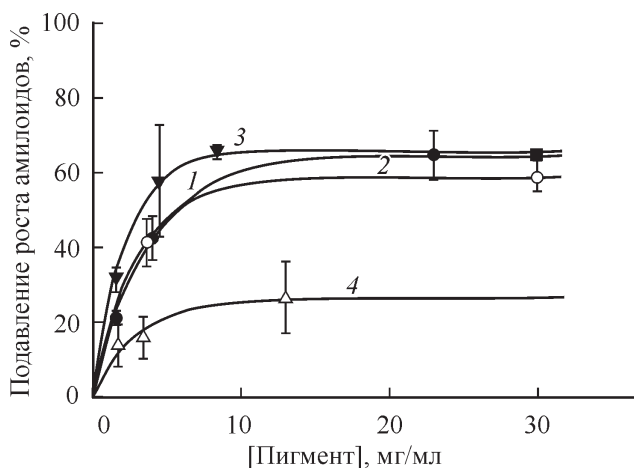


Рис. 9. Подавление образования амилоидов инсулина в присутствии разных препаратов пигмента.

Кривые: 1 — P1, 2 — P2a, 3 — P2c, 4 — P(MeAI).

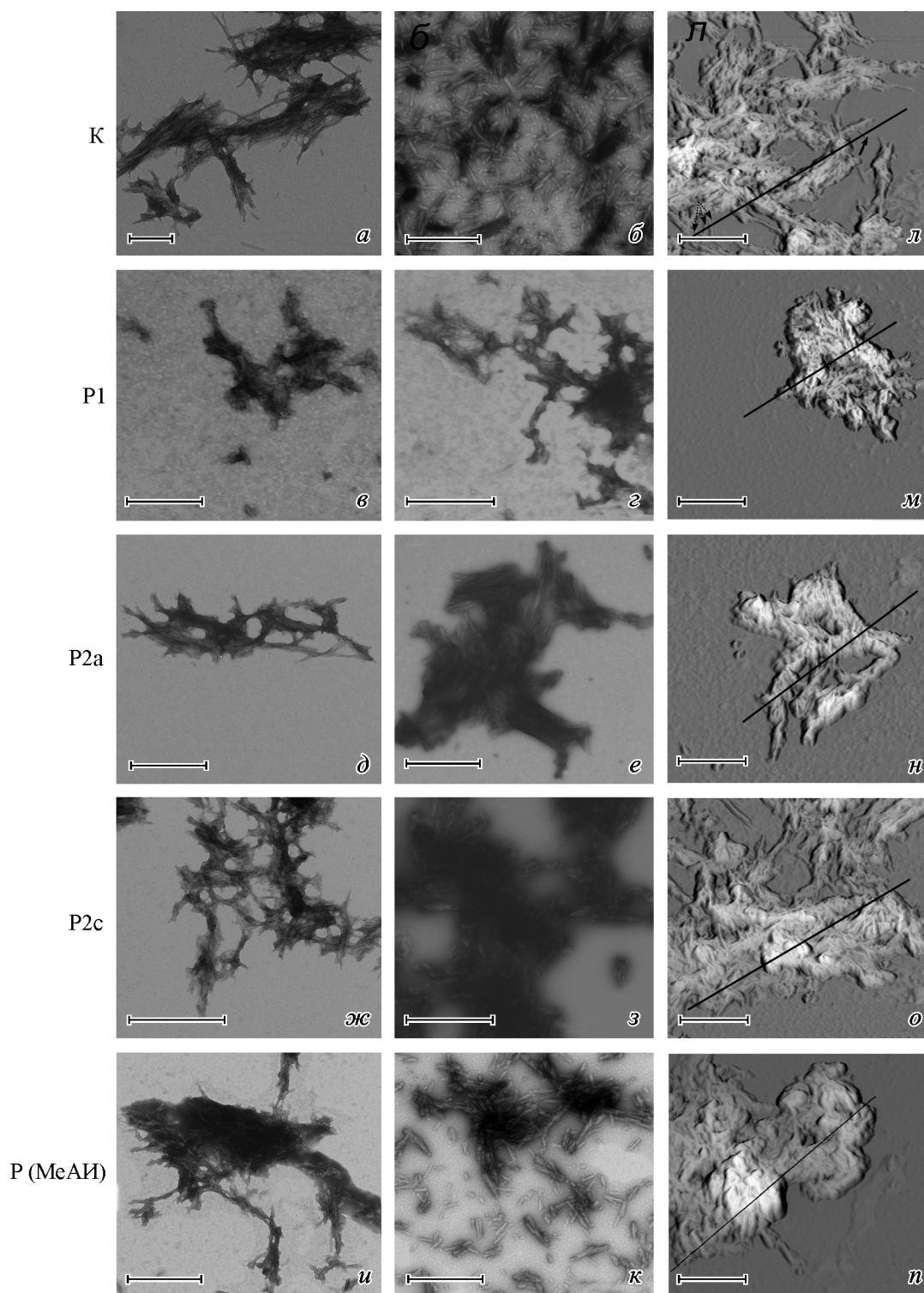


Рис. 10. Электронная и атомно-силовая микроскопия препаратов инсулиновых фибрилл, выращенных в отсутствие и присутствии красного пигмента.

Электронные микрофотографии амилоидов инсулина: *a* — выращены без пигмента (контроль, К); *б* — выращены без пигмента и обработаны ультразвуком (контроль); *в*, *д*, *ж*, *и* — выращены в присутствии препаратов красного пигмента P1, P2a, P2c и P(MeAI) соответственно; *з*, *е*, *з*, *к* — выращены в присутствии препаратов пигмента P1, P2a, P2c и P(MeAI) соответственно после действия ультразвука. 8000 \times . Масштабные отрезки — 500 нм. Атомно-силовая микроскопия препаратов инсулиновых фибрилл: *л* — выращены без пигмента (контроль); *м*, *н*, *о*, *п* — выращены в присутствии препаратов пигмента P1, P2a, P2c и P(MeAI) соответственно. Сплошной линией показаны конгломераты амилоидов. Масштабные отрезки — 500 нм.

в присутствии пигментов P1, P2a и P2c, по-прежнему оставались крупными агрегатами (данные не показаны).

Данные атомно-силовой микроскопии позволили нам подтвердить и уточнить результаты, полученные с помощью электронной микроскопии. В контроле, где амилоиды инсулина формировались без добавления пигментов, вся поверхность препарата покрыта сетью агрегированных фибрилл (рис. 10, л). В то же время в препаратах инсулина, полимеризованного в присутствии пигментов, фибриллы объединяются в отдельные крупные конгломераты (рис. 10 м—п). Если в контрольном препарате легко различимы как отдельные фибриллы, так и пучки параллельно лежащих фибрилл, то в препаратах амилоидов, выросших в присутствии пигментов, линейные структуры встречаются значительно реже.

С помощью атомно-силовой микроскопии и спектроскопии в работе (Smith et al., 2006) анализировали кинетику роста индивидуальных фибрилл инсулина. Авторы показали, что присоединение мономеров в самоорганизующуюся полимерную цепь требует свободных концов, которые образуются спонтанно каждые 47 мин при разрывах фибрилл, достигающих длины 10 мкм. Учитывая эти и полученные нами данные, можно предположить, что в результате слипания у фибрилл образуется меньше свободных концов, или же концы менее доступны для присоединения новых мономеров, или действуют оба фактора. Таким образом, слипание фибрилл под воздействием разных форм красного пигмента, по-видимому, является причиной того, что рост фибрилл инсулина в присутствии пигмента оказывается сниженным.

Суммируя полученные результаты, можно сделать следующее заключение. Препарат природного красного пигмента P1 содержит набор полимеров, мол. масса которых колеблется в диапазоне 2—10 кДа. Препараты (P2a и P2c), полученные в результате кислотного гидролиза P1, имеют значительно меньшую мол. массу (в среднем 1—2 кДа) в результате как отщепления рибозы, так и, по-видимому, в результате частичного отщепления аминокислот или фрагментации полимерных цепей под действием кислоты. В состав полимеров всех форм природного пигмента входят различные аминокислоты. Масс-спектрометрия позволила выявить регулярную организацию синтетического красного пигмента P(MeAI), который состоит из мономеров, не содержащих ни рибозы, ни аминокислот. При сравнении способности разных препаратов красного пигмента взаимодействовать с амилоидами пигмент P2c оказывается наиболее эффективным. Он же эффективнее всего тормозит полимеризацию инсулина, т. е. рост инсулиновых фибрилл. Атомно-силовая микроскопия препаратов фибрилл, выращенных в присутствии разных форм красного пигмента, выявила слипание фибрилл, которое приводит к образованию устойчивых к ультразвуку конгломератов.

Статья была подготовлена при финансовой поддержке Минобрнауки России на оборудовании ЦКП «Аналитический центр нано- и биотехнологий ГОУ СПбГПУ» на базе ФГБОУ ВПО «СПбГПУ».

Список литературы

- Аленин В. В., Костикова Т. Р., Домкин В. Д. 1987. Обнаружение продуктов N-карбоксилирования N¹-замещенных 5-аминоимидазолов в водных растворах бикарбоната калия. Журн. общей химии. 57 (3) : 692—701.
- Гланц С. 1999. Медико-биологическая статистика. М.: Практика. 459 с.
- Михайлова Е. В., Артемов А. В., Снигиревская Е. С., Артамонова Т. О., Ходорковский М. А., Сойдла Т. Р., Невзглядова О. В. 2011. Влияние красного пигмента *Saccharomyces cerevisiae* на образование инсулиновых фибрилл in vitro. Цитология. 53 (10) : 808—814.
- Смирнов М. Н. 1967. Изучение красного пигмента аденин-зависимого мутанта дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*: Автореф. канд. дис. Обнинск. 129 с.
- Bayerl Ch. 2008. Beta-carotene in dermatology: does it help? Acta Dermatovenerol. Alp. Panonica Adriat. 17 : 160—166.
- Britton G. 1983. The biochemistry of natural pigments. Cambridge Univ. Press. 422 p.
- Fisher C. R. 1969. Enzymology of the pigmented adenine-requiring mutants of *Saccharomyces* and *Schizosaccharomyces*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 34 : 306—310.
- Kidd P. 2011. Astaxanthin, cell membrane nutrient with diverse clinical benefits and anti-aging potential. Altern. Med. Rev. 16 : 355—364.
- Kim D., Kim J., Joung Han Yim. 2008. Red to red — the marine bacterium *Halobacterium salinarum* and its product prodigiosin for mitigation of harmful algal blooms. J. Microbiol. Biotechnol. 18 : 1621—1629.
- Liu G. Y., Nizet V. 2009. Color me bad: microbial pigments as virulence factors. Trends Microbiol. 17 : 406—413.
- Невзглядова О. В., Кuzнетsoва И. М., Михайлова Е. В., Артамонова Т. О., Артемов А. В., Миттенберг А. Г., Костылева Е. И., Туреров К. К., Ходорковский М. А., Сойдла Т. Р. 2011. The effect of red pigment on amyloidization of yeast proteins. Yeast. 28 : 505—526.
- Невзглядова О. В., Михайлова Е. В., Артемов А. В., Миттенберг А. Г., Кuzнетsoва И. М., Туреров К. К., Ходорковский М. А., Сойдла Т. Р. 2012. The effect of yeast red pigment on amyloid fibrils in vivo and in vitro. In: Amyloids. New York, Huppauge: Nova Sci. Publ. 1—32.
- Sharma K. G., Kaur R., Bachhawat A. K. 2003. The glutathione-mediated detoxification pathway in yeast: an analysis using the red pigment that accumulates in certain adenine biosynthetic mutants of yeasts reveals the involvement of novel genes. Arch. Microbiol. 180 : 108—117.
- Смирнов М. Н., Смирнов В. Н., Будовский Е. И., Инге-Вехтомов С. Г., Серебряков Н. Г. 1967. Red pigment of adenine-deficient yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2 : 299—304.
- Smith J. F., Knowles T. J. P., Dobson C. M., MacPhee C. E., Welland M. E. 2006. Characterization of the nanoscale properties of individual amyloid fibrils. PNAS. 103 : 15 806—15 811.

COMPARATIVE STRUCTURAL AND FUNCTIONAL CHARACTERISTICS OF DIFFERENT FORMS OF *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* RED PIGMENT AND ITS SYNTHETIC ANALOGUE

T. R. Amen,¹ E. V. Mikhailova,^{2,*} V. V. Alenin,¹ A. V. Artyomov,² P. A. Dementyev,³ M. A. Khodorkovskii,⁴ T. O. Artamonova,⁴ I. M. Kuznetsova,² T. R. Soidla,² O. V. Nevzglyadova²

¹ St. Petersburg State University, ² Institute of Cytology RAS,

³ A. F. Ioffe Physical Technical Institute RAS, St. Petersburg, and ⁴ St. Petersburg State Polytechnical University;

* e-mail: mikhailovaev@list.ru

Structural and functional characteristics of the yeast red pigment (product of polymerization of N¹-(β-D-ribofuranosyl)-5-aminoimidazole), isolated from *adel 1* mutant cells of *Saccharomyces cerevisiae*, its deribosylated derivatives (obtained by acid hydrolysis) and its synthetic pigment analogue (product of polymerization of N¹-methyl-5-aminoimidazole *in vitro*) has been obtained. Products of *in vitro* polymerization were identified using mass spectrometry. The ability of these pigments to inhibit amyloid formation using insulin fibrils was compared. The entire compounds studied were able to interact with amyloids and inhibit their growth. Electron and atomic force microscopy revealed a common feature inherent in the insulin fibrils formed in presence of these compounds — they were merged into conglomerates that were more stable and resistant to the effects of ultrasound in comparison with insulin aggregates grown without pigments. We speculate that all these compounds can cause coalescence of fibrils, partially block their loose ends and, thereby, inhibit the attachment of new monomers to growing fibrils.

Key words: insulin, amyloid, prion, Thioflavine T, red pigment, *Saccharomyces cerevisiae*, 5-aminoimidazole-ribotide (AIR).