

МЕХАНИЗМЫ МОДИФИКАЦИОННОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ

© А. А. Рубель^{1,2}, В. В. Коржова¹,
А. Ф. Сайфитдинова¹,
К. С. Антоненц¹, С. Г. Инге-
Вечтомов^{1,2}, А. П. Галкин^{1,2}

УДК 576.385.322

БЕЛОК PrP И ПЕПТИД АМИЛОИД БЕТА ВЗАИМОДЕЙСТВУЮТ В ДРОЖЖАХ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

¹ Санкт-Петербургский государственный университет; ² Санкт-Петербургский филиал института общей генетики им. Вавилова РАН

✿ Исследована возможность взаимодействия белка PrP с пептидом амилоид бета в живых клетках дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* методами флуоресцентной микроскопии. Используя метод FRET, было показано, что пептид амилоид бета и белок PrP взаимодействуют в дрожжевых клетках. В дальнейшем, дрожжевая модель может быть использована для изучения тонких механизмов этого взаимодействия с использованием методов флуоресцентной микроскопии.

✿ **Ключевые слова:** Prion Protein; пептид амилоид бета; амилоидозы; прионы; болезнь Альцгеймера; FRET; дрожжи.

ВВЕДЕНИЕ

Амилоидозы — группа заболеваний, связанных с аномальной пространственной укладкой и агрегацией белков, в норме являющихся растворимыми. Наиболее известными амилоидозами человека являются — болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, хорей Хантингтона и прионные заболевания. Болезнь Альцгеймера — самый распространённый из амилоидозов, а также самая частая причина развития старческого слабоумия. Этой болезни больше всего подвержены люди старшего возраста (старше 60 лет), в возрасте старше 80 лет от неё страдает каждый третий, а у 90-летних заболеваемость достигает 50% (по: Prusiner, 2001). Болезнь Альцгеймера связана с накоплением в тканях головного мозга нейротоксичных агрегатов пептида амилоид-бета (Aβ) (Morishima-Kawashima et al., 2002; Bayer and Wirths, 2010).

Инфекционным агентом в случае прионных болезней является олигомерная изоформа в норме растворимого белка PrP (от Prion Protein), устойчивая к воздействию температуры, химических агентов и протеолитических ферментов. Такая аномальная конформация белка обеспечивает передачу заболевания за счет автокаталитической трансформации вновь синтезируемых молекул с использованием олигомерной формы PrP как матрицы (Prusiner, 1998).

Интересной особенностью белка PrP и пептида Aβ является их способность к взаимодействию: белок PrP в мономерной изоформе специфично связывает олигомеры пептида амилоид-бета, то есть является его рецептором, и, таким образом, способен влиять на проявление болезни (Gunther and Strittmatter, 2009). Недавние исследования также показали, что процессы, связанные с неправильной укладкой одного из этих белков, являются серьезным фактором риска для индукции агрегации другого (Mogales et al., 2010). На основании этих данных представляется перспективным изучение возможности взаимодействия и взаимного влияния агрегатов PrP и Aβ. В этой работе была исследована возможность взаимодействия пептида Aβ человека и белка PrP мыши в дрожжах *Saccharomyces cerevisiae* методами флуоресцентной микроскопии.

Несмотря на то, что связывание белком PrP олигомеров пептида Aβ, уже описано, остаётся целый ряд вопросов, на которые пока нет ответов:

- Какие именно участки белка PrP и пептида Aβ ответственны за их взаимодействие?
- Способны ли взаимодействовать между собой агрегированные формы белков?
- Специфично ли взаимодействие PrP с олигомерами пептида Aβ, может ли данный белок связывать *in vivo* и другие амилоидные белки?

Получить ответы на эти вопросы, используя трансгенных животных крайне сложно, поскольку эксперименты на модельных животных требуют больших материальных затрат и, как минимум, двух—трёх лет рабо-

Поступила в редакцию 29.11.2011
Принята к публикации 16.03.2012

Таблица 1

Плазмиды, использованные в работе

Название плазмиды	Тип плазмиды/дрожжевой маркер	Промотор/экспрессионная кассета
pRS425	2 μ /LEU2	
pSP-CFP	CEN/URA3	PCUP1-SUP35NSC-SUP35MCPM-CFP
pSP-YFP	CEN/URA3	PCUP1-SUP35NSC-SUP35MCPM-YFP
pcDNA3-1-3F4	CEN/None	Prnp
PGPD-PrP-GFP(URA3)	2 μ /URA3	PGPD-PrP-GFP
pGPD-Ab-YFP(URA3)	2 μ /LEU2	PGPD-Ab-YFP
pGPD-Ab-CFP(LEU2)	2 μ /URA3	PGPD-Ab-CFP
pGPD-PrP-YFP(URA3)	2 μ /LEU2	PGPD-PrP-YFP
pGPD-PrP-CFP(LEU2)	2 μ /LEU2	PGPD-PrP-CFP
pGPD-YFP(URA3)	2 μ /LEU2	PGPD-YFP
PGPD-Ab-YFP(LEU2)	2 μ /LEU2	PGPD-Ab-YFP
PGPD-PrP-YFP(LEU2)	2 μ /LEU2	PGPD-PrP-YFP

Таблица 2

Праймеры, использованные в работе

Название праймера	Последовательность 5'-3'
FPrP23	CCCGGATCCTATATGTCTAAAAAGCGGCCAAAGCCTGGAGGGT
RPrP231	CATCCGCGGGCTGGATCTTCTCCCGTCGTAATAGGCCT
FA β	GGGTCCACGGATCCTATATGTCTGATGCAGAATTCCGACAT
RA β	GTATAAAGGATCCGACAACACCCGCCACCAT

ты. Использование культур нервных клеток в данном случае невозможно, так как олигомеры PrP и A β нейротоксичны. Исходя из этого, дрожжи являются уникальным объектом для исследования взаимодействий амилоидных белков млекопитающих.

Дрожжевая модель предоставляет следующие преимущества: PrP и A β формируют в цитоплазме дрожжей амилоидные агрегаты практически сразу после начала экспрессии соответствующих конструкций. В экспериментах с трансгенными млекопитающими образование амилоидных агрегатов происходит как минимум через пол года. Агрегаты PrP и A β не токсичны для дрожжей, что позволяет исследовать их свойства и взаимодействие. Эксперименты на дрожжах намного дешевле, чем эксперименты, проводимые на модельных животных. Дрожжи, как наиболее простой и изученный объект генетических исследований, позволяют легко и быстро проводить эксперименты, связанные с исследованием эффектов экспрессии чужеродных последовательностей. Целью данной работы являлась проверка адекватности дрожжевой модели для исследования взаимодействия PrP и A β .

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Штаммы, среды и условия культивирования. В работе использовали штамм дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* BY4742 (*MATa his3 Δ 1 leu2 Δ lys2 Δ ura3*)

(«Invitrogen», США). Для амплификации плазмидной ДНК использовали штамм бактерии *Escherichia coli* DH5 α (*supE44; lacU169; (ϕ 80lacZ Δ M15) hsdR17; recA1; endA1; gyrA96; thi-1; elA1*) (Hanahan, 1985). Бактерии культивировали при температуре 37°C на жидкой и твердой средах Luria-Bertani (LB) с добавлением ампициллина (50 мкг/мл) (Sambrook et al., 1989). Дрожжи культивировали при 30°C на твердой и жидкой среде YAPD, а также на синтетических средах, содержащих необходимые витамины, микроэлементы, аминокислоты и азотистые основания (Захаров и др., 1984; Kaiser et al., 1994).

Микробиологические и молекулярно-генетические методы. В работе применяли стандартные методы, используемые при работе с дрожжами *S. cerevisiae* (Инге-Вечтомов, 1971, Захаров и др., 1984) и бактериями *E. coli* (Sambrook et al., 1989).

Трансформацию дрожжей проводили по методике с использованием ацетата лития (Rose et al., 1990). Получение компетентных клеток *E. coli* и трансформацию бактерий осуществляли по методике (Inoue et al., 1990). Выделение плазмидной ДНК из *E. coli* в препаративных количествах проводили методом щелочного лизиса (Sambrook et al., 1989). В работе использовали стандартные методы геномной инженерии (Маниатис и др., 1984).

Плазмиды. Плазмиды, использованные в ходе работы, описаны в таблице 1. Все плазмиды, за исключе-

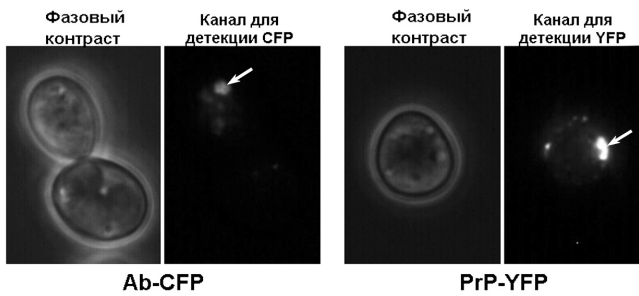


Рис. 1 Флуоресцентный анализ белков: PrP-YFP и Ab-CFP в дрожжах *Saccharomyces cerevisiae*. Стрелками обозначены наиболее крупные агрегаты.

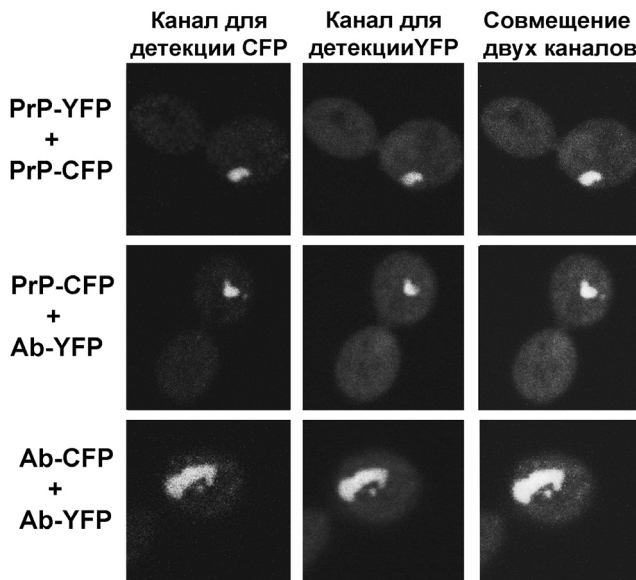


Рис. 2 Флуоресцентный анализ пар белков в дрожжах *S. cerevisiae*. Верхний ряд – PrP-YFP + PrP-CFP; средний ряд – PrP-CFP + Ab-YFP; нижний ряд – Ab-CFP + Ab-YFP.

нием рсDNA3-1-3F4, являются челночными векторами способными к поддержанию в клетках *S. cerevisiae* и *E. coli*. Вектор рRS425 (Sikorski and Hieter, 1989). Плазмиды рSP-YFP и рSP-CFP (неопубликованы), любезно предоставлены С. П. Задорским (Санкт-Петербургский государственный университет). Плазмида рсDNA3-1-3F4 (Narwa and Harris, 1999) содержит мышинный ген *Prnp*, модифицированный для распознавания моноклональными антителами 3F4. Плазмида рGPD-YFP(URA3) получена на базе плазмиды рGPD-PrP-GFP(URA3) (Рубель и др., 2008) путем замещения фрагмента *SacII-SacI*, содержащего гибридный ген *PrP-GFP* (1,2 т.п.н.), на фрагмент *SacII-SacI*, содержащий ген *YFP* (0,7 т.п.н.), из плазмиды рSP-YFP. Плазмида рGPD-PrP-YFP(URA3) получена в два этапа. На первом этапе полноразмерный ген *Prnp* был амплифицирован с плазмиды рсDNA3-1-3F4, используя праймеры FPrP23 и RPrP231, описанные в таблице 2.

Праймеры для амплификации *Prnp* содержали сайты для эндонуклеаз рестрикции *BamHI* и *SacII*. Для того чтобы уменьшить деградацию белка PrP-GFP дрожжевыми протеазами, в праймер FPrP23, после ATG была добавлена последовательность, кодирующая серин (см. Ma and Lindquist, 1999). На втором этапе амплифицированную последовательность *Prnp* гидролизовали с помощью эндонуклеаз рестрикции *BamHI-SacII* и встроили в плазмиду рGPD YFP (URA3), гидролизованную по тем же сайтам. Плазмида рGPD Ab YFP(URA3) получена путем инсерции последовательности, кодирующей пептид амилоид бета с 1 по 40 аминокислоту в плазмиду рGPD YFP(URA3), гидролизованную с помощью эндонуклеаз рестрикции *BamHI-SacII*. Последовательность, кодирующая человеческий пептид амилоид бета была амплифицирована с помощью реакции обратной транскрипции из мРНК выделенной из мозга. Праймеры для амплификации пептида Аβ (FAβ и RAβ) содержали сайты для эндонуклеаз рестрикции *BamHI* или *SacII*. Для получения плазмид рGPD Ab YFP(LEU2) и рGPD-PrP-YFP(LEU2) последовательности, содержащие $P_{GPD}-Ab-YFP$ и $P_{GPD}-PrP-YFP$, были гидролизованы эндонуклеазами рестрикции *HindIII-SacI* из плазмид рGPD-Ab-YFP(URA3), рGPD-PrP-YFP(URA3) и встроены в полилинкер вектора рRS425. Плазмиды рGPD PrP CFP(LEU2) и рGPD Ab CFP(LEU2) сконструированы путем замещения фрагмента *SacII-SacI*, содержащего последовательность *YFP* (0,7 т.п.н.) из плазмид рGPD-Ab-YFP(LEU2) и рGPD PrP YFP(LEU2) на фрагмент *SacII-SacI*, содержащий ген *CFP* (0,7 т.п.н.) из плазмиды рSP CFP.

Флуоресцентная микроскопия. Колокализацию флуоресцентных белков, а также эксперименты по измерению эффективности FRET, проводили при помощи лазерного сканирующего конфокального микроскопа Leica TCS SP5 «Leica Microsystems GmbH» (Германия) и программного обеспечения «LAS AF Application Wizard Version 1.7.0» «Leica Microsystems GmbH» (Германия), на базе центра коллективного пользования «Хромас» (СПбГУ). Для детекции CFP или CFP содержащих белков, использовали аргоновый лазер с длиной волны 458 нм, сигнал детектировали в пределах 461–510 нм, для детекции YFP или YFP содержащих белков, использовали аргоновый лазер с длиной волны 514 нм, сигнал детектировали в пределах 518–580 нм.

Для проведения экспериментов по измерению эффективности FRET использовали предметные стекла «Polysine slides» фирмы «Gerhard Menzel GmbH» (Германия). Для приготовления препаратов дрожжевые клетки растворяли в капле стерильной воды и равномерно распределяли по поверхности стекла. После высыхания препарат заключали в среду «VECTASHIELD Mounting Media» фирмы «Vector

Laboratories Inc.» (США) и накрывали покровным стеклом. Излишки среды удаляли с помощью фильтровальной бумаги, после чего края покровного стекла заклеивали лаком для ногтей.

Измерение эффективности FRET проводили, используя метод фотовыжигания акцептора (Acceptor Photobleaching). Эффективность передачи и, соответственно, степень взаимодействия белков, оценивали при сравнении интенсивности флуоресценции донора в присутствии и в отсутствии акцептора.

На первом этапе анализа препаратов, находили клетки, в которых наблюдалась колокализация белков, содержащих CFP и YFP. На изображении, полученном с помощью конфокального микроскопа, выделяли интересующую область. В этой области измеряли флуоресценцию донора (CFP) до и после фотовыжигания акцептора. Для фотовыжигания акцептора использовали аргоновый лазер с длиной волны 514 нм при максимальной интенсивности светового потока. Время выжигания составляло 10 сек. Эффективность FRET (FRETeff) рассчитывали по формуле:
$$\text{FRETeff} = \frac{D_{\text{post}} - D_{\text{pre}}}{D_{\text{post}}}$$

D_{post} — это флуоресценция донора после фотовыжигания акцептора,

D_{pre} — флуоресценция донора до фотовыжигания акцептора.

Статистическая обработка. Стандартную ошибку среднего рассчитывали по стандартной формуле (Гланц, 1999, С. 41.).

РЕЗУЛЬТАТЫ

PrP и A β слитые с флуоресцентными белками формируют агрегаты в дрожжах. Белок PrP и пептид амилоид бета (A β) формируют амилоидные агрегаты в дрожжевой клетке, однако видимого фенотипического проявления такая агрегация не имеет (Ma and Lindquist, 1999; Рубель, 2008; Коржова и др., 2010; Bharadwaj et al., 2010). Для визуализации агрегации PrP и A β мы получили химерные конструкции, в которых PrP и A β слиты с репортерными последовательностями. В качестве репортерных последовательностей мы использовали YFP (желтый флуоресцирующий белок) и CFP (синий флуоресцирующий белок), позволяющие визуализировать агрегацию белков методами флуоресцентной микроскопии. Мы получили дрожжи *S. cerevisiae*, продуцирующие пептид амилоид бета и/или белок PrP слитый с одним из флуоресцирующих белков CFP или YFP (рис. 1).

Как было показано ранее (Caine et al., 2007; Рубель и др., 2008; Mallik et al., 2010), а также в ходе данной работы, продукция в дрожжах A β - и PrP-содержащих флуоресцентных белков, приводит к формированию в цитоплазме флуоресцирующих агрегатов. Выявляемые в клетках агрегаты PrP можно разделить

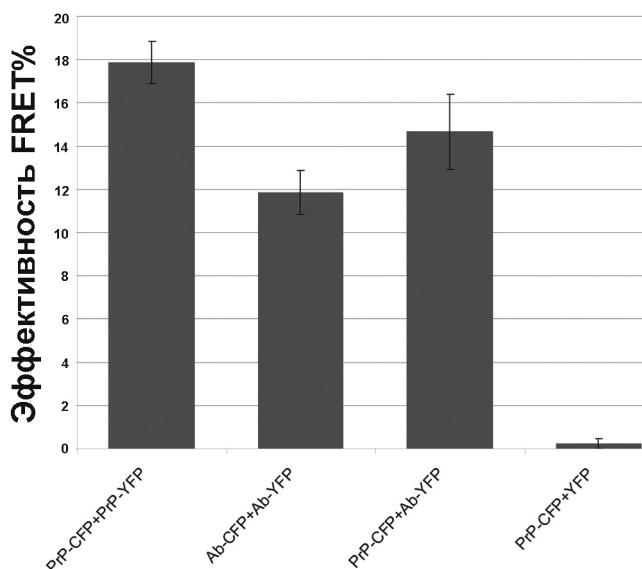


Рис. 3 Гистограмма средних значений эффективности FRET для разных пар белков

по размеру и форме на несколько типов: небольшие агрегаты — «точки», крупные глобулярные структуры, агрегаты в виде колец или лентовидных структур. При культивировании дрожжей в жидкой селективной среде количество клеток с агрегатами и тип агрегатов сильно варьировали в зависимости от стадии роста клеточной культуры. Наибольшее количество клеток с агрегатами, было выявлено в логарифмической фазе роста культуры (0,5–1 OD₅₉₅), при этом встречались преимущественно «точки» и комбинации «точек» и глобулярных структур, тогда как в стационарной фазе роста культуры доля клеток с агрегатами была заметно снижена, и в основном выявлялись клетки, содержащие крупные глобулярные структуры. В нескольких клетках вне зависимости от фазы роста культуры были обнаружены кольцевые или лентовидные структуры. В дрожжах, продуцирующих A β -содержащие флуоресцентные белки, количество клеток, содержащих флуоресцентные агрегаты, было сравнительно небольшим (6–10%), в большинстве клеток, на фоне диффузного распределения белка в цитоплазме, выявлялся один или несколько небольших агрегатов глобулярной формы.

Агрегаты A β и PrP колокализуются в клетках дрожжей-сахаромицетов. Для исследования возможности взаимодействия белков A β и PrP, были получены дрожжи, продуцирующие пару химерных белков: A β -YFP/PrP-CFP, а также для контроля пары: A β -YFP/A β -CFP, PrP-YFP/PrP-CFP. Из дрожжевых клеток были сделаны микропрепараты и проанализированы методами флуоресцентной микроскопии (рис. 2). Как и следовало ожидать, при продукции пар белков A β -YFP/A β -CFP и PrP YFP/PrP CFP в дрож-

жевых клетках, выявлялись флуоресцентные гранулы, в подавляющем большинстве которых (80–90%) наблюдалась колокализация сигналов YFP и CFP (рис 2). При продукции гибридных белков A β -YFP/PrP-CFP, также в более чем 80% наблюдалась колокализация флуоресцентных агрегатов. В тоже время, встречались клетки, в которых агрегаты флуоресцентных белков не колокализовались. Полученные данные являются свидетельством в пользу возможности взаимодействия белков A β и PrP в дрожжевых клетках. Однако, наблюдение колокализации агрегатов само по себе не является доказательством их физического взаимодействия, так как совпадение сигналов флуоресцентных агрегатов может быть следствием их близкого расположения.

Анализ взаимодействия между PrP и A β в живых клетках дрожжей *S. cerevisiae*. Для исследования физического взаимодействия между белком PrP и пептидом A β был использован метод FRET, широко применяемый для исследования взаимодействия белков *in vivo* (Kargova et al., 2003; Cui et al., 2009). FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) — это физическое явление, обусловленное передачей энергии между двумя хромофорами, находящимися на расстоянии не больше 10 нм с помощью безызлучательного диполь-дипольного спаривания. Для FRET используют конструкции, в которых изучаемые молекулы слиты: одна — с донором, а другая — с акцептором, в качестве которых выступают флуоресцирующие белки. При использовании белков CFP и YFP, CFP является донором, а YFP — акцептором, так как пик эмиссии CFP совпадает с пиком поглощения YFP. Если исследуемые белки тесно взаимодействуют, происходит эффективная передача энергии (Swift et al., 2004).

В данной работе мы использовали метод выжигания акцептора (Acceptor Photobleaching). Эффективность передачи и, соответственно, степень взаимодействия белков в этом методе оценивали при сравнении интенсивности флуоресценции донора в присутствии и в отсутствие акцептора (при фотовыжигании акцептора при условии явления FRET донор флуоресцирует сильнее).

Для исследования физического взаимодействия между PrP и пептидом A β мы использовали дрожжи, продуцирующие пару флуоресцентных белков PrP-CFP и A β -YFP.

В качестве отрицательного контроля оценивали эффективность FRET между агрегатами PrP-CFP и растворимым белком YFP. Было сделано 15 измерений и произведен расчет эффективности FRET. В 14 из сделанных измерений данный показатель равнялся 0, в одном из измерений эффективность FRET составила 3,49%. С учётом стандартной ошибки среднего эффективность FRET в негативном контроле не отличается от нуля. Полученные данные подтверждают отсутствие явления FRET в случае, когда флуоресцент-

ные белки слиты с невзаимодействующими белками, и отсутствие какого-либо фона флуоресценции, который мог бы вносить ошибку в измерения.

В качестве положительного контроля рассчитывали эффективность FRET между парами белков PrP-CFP/ PrP-YFP и A β -CFP/ A β -YFP. Эффективность FRET между белками PrP-CFP и PrP-YFP составила $17,9 \pm 0,97\%$ ($n=111$), а между белками A β -CFP/ A β -YFP $11,8 \pm 1,03\%$ ($n=30$).

В опыте, эффективность FRET между белками PrP-CFP и A β -YFP составила $14,7 \pm 1,73\%$ ($n=80$) (см. рис. 3).

Стоит отметить, что в некоторых случаях (примерно 20%) колокализация агрегатов не сопровождалась физическим взаимодействием белков, как в опыте, так и в положительных контролях.

Таким образом, полученные данные говорят о том, что между белками PrP-CFP и A β -YFP происходит передача энергии флуоресценции за счет резонанса, что свидетельствует о физическом взаимодействии этих белков в дрожжевых клетках.

ОБСУЖДЕНИЕ

Большое количество работ убедительно доказывает, что дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* представляют собой адекватную модель для исследования амилоидных белков млекопитающих (Outeiro and Muchowski, 2004; Галкин и др., 2006). Важной особенностью использования дрожжевых моделей является возможность визуализировать агрегацию белков с помощью создания химерных конструкций, в которых изучаемый белок слит с репортерной последовательностью, например, с флуоресцирующими белками, широко используемыми сейчас в молекулярно-биологических исследованиях.

В ряде работ показано, что продукция в дрожжах *S. cerevisiae* белков, A β -GFP и PrP-GFP, приводит к формированию в клетках высокомолекулярных агрегатов. Эти агрегаты обладают свойствами, характерными для агрегатов белков A β и PrP, выявляемых в мозге больных млекопитающих (Caine et al., 2007; Рубель, 2008; Mallik et al., 2010; Коржова и др., 2010). Агрегаты как PrP, так и пептида A β , не токсичны для дрожжей (Рубель, 2008; Коржова и др., 2010). В данной работе, с помощью методов флуоресцентной микроскопии (исследование колокализации и измерения эффективности FRET), мы показали, что белки PrP и A β физически взаимодействуют в дрожжевых клетках.

В дальнейшем, предложенная нами модель позволит более подробно изучать механизмы этого взаимодействия, искать домены белков, важные для взаимодействия, и факторы, которые могут на него влиять. Отметим, что метод FRET не позволяет разделить взаимодействие агрегатов и мономеров белков, поэтому

необходимо привлечение дополнительных методов для определения взаимодействующих внутри агрегатов единиц. Важным вопросом остается исследование специфичности взаимодействия амилоидных полимеров, особенно в свете появившихся недавно данных о возможности взаимодействия мономеров PrP с различными бета-складчатыми белками (Resenberger et al., 2011). Одним из вариантов изучения этого вопроса является исследование возможности колокализации и измерение эффективности FRET при совместной продукции в дрожжевых клетках пептида A β или PrP и дрожжевых прионов, например, [PSI⁺] — агрегированной формы белка Sup35.

Таким образом, в работе было показано взаимодействие пептида A β и белка PrP в гетерологичной дрожжевой модели. В дальнейшем дрожжи сахаромицеты могут быть использованы как модель для изучения тонких механизмов взаимодействия PrP и A β : выявления участков белка PrP и пептида A β , ответственных за взаимодействие, выявления аминокислот критичных для взаимодействия, выяснения специфичности взаимодействия белков PrP и A β .

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность Сергею Павловичу Задорскому за предоставленные плазмиды pSP-YFP и pSP-CFP и Дэвиду Харрису за плазмиду pсDNA3-1-3F4. Работа выполнена при поддержке ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 годы, программы президиума РАН, ФНМ «Поиск белков, контролируемых амилоидогенез при болезни Альцгеймера», а также за счет средств тематического плана НИР СПбГУ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Галкин А. П., Миронова Л. Н., Журавлева Г. А., 2006. Прионы дрожжей, амилоидозы млекопитающих и проблема протеомных сетей. Генетика. Т. 42. №11. С. 1–13.
2. Гланц С., 1999. Медико-биологическая статистика. Пер. с англ. М., Практика, 459 с.
3. Захаров И. А., Кожин С. А., Кожина Т. Н., и др., 1984. Сборник методик по генетике дрожжей-сахаромицетов. Л.: Наука. 143 с.
4. Инге-Вечтомов С. Г., 1971. Идентификация некоторых групп сцепления у Петергофских генетических линий дрожжей // Генетика. Т. 7. С. 113–124.
5. Коржова В. В., Антонец К. С., Галкин А. П. и др., 2010. Использование методов флуоресцентной микроскопии для анализа взаимодействия пептида A β и Prion Protein в дрожжах *Saccharomyces cerevisiae* // Труды Томского государственного университета. Фундаментальные и прикладные аспекты современной биологии. Изд-во Томского ун-та. 2010. Сер. Биологическая. Т. 275. С. 360–362.
6. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Д., 1984. Молекулярное клонирование: Перевод с англ. М: Мир. 479 с.
7. Рубель А. А., 2008. Исследование прионных свойств белка PrP в дрожжах *Saccharomyces cerevisiae*. Автореф. дис. ... канд. биол. наук. СПб, 19 с.
8. Рубель А. А., Сайфитдинова А. Ф., Лада А. Г. и др., 2008. Дрожжевой шаперон Hsp104 регулирует экспрессию генов на посттранскрипционном уровне // Мол. биол. Т. 42. №1. С. 123–130.
9. Bayer T. A., Wirths O. Intracellular accumulation of amyloid-Beta - a predictor for synaptic dysfunction and neuron loss in Alzheimer's disease // Front Aging Neurosci. 2010 Vol. 2: 8.
10. Bharadwaj P., Martins R., Macreadie I., 2010. Yeast as a model for studying Alzheimer's disease. MS Yeast Res. Vol. 10. N8. P. 961–969.
11. Caine J., Sankovich S., Antony H., et al., 2007. Alzheimer's A β fused to green fluorescent protein induces growth stress and a heat shock response // FEMS Yeast Res. Vol. 7. N8. P. 1230–1236.
12. Cui Z., Ke Zhang K., Zhang Z., et al., 2009. Visualization of the dynamic multimerization of human Cytomegalovirus pp65 in punctuate nuclear foci // Virology. 2009 Vol. 392. N2. P. 169–177.
13. Gunther E. C., Strittmatter S. M., 2009. Beta-amyloid oligomers and cellular prion protein in Alzheimer's disease // J Mol Med (Berl). Vol. 88. N4. P. 331–338.
14. Hanahan D., 1985. Techniques for Transformation of E. coli, DNA cloning: a practical approach. Glover, D. M., ed., IRL Press Limited, Oxford, England. P. 109–135.
15. Inoue H., Nojima H., Okayama H., 1990. High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids // Gene. Vol. 96. P. 23–28.
16. Kaiser C., Michaelis S., Mitchell A. Methods in yeast genetics. N.Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press. 1994. 234 p.
17. Karпова Т. С., Baumann C. T., He L., et al., 2003. Fluorescence resonance energy transfer from cyan to yellow fluorescent protein detected by acceptor photobleaching using confocal microscopy and a single laser. J. Microsc.-Oxf. Vol. 209. P. 56–70.
18. Ma J., Lindquist S., 1999. De novo generation of a PrP^{Sc}-like conformation in living cells // Nat Cell Biol. Vol. 1. P. 358–361.
19. Mallik S., Yang W., Norstrom E. M. et al., 2010. Live cell fluorescence resonance energy transfer predicts an altered molecular association of heterologous PrP^{Sc} with PrP^C // J Biol Chem. Vol. 285. N12. P. 8967–8975.
20. Morales R., L. D. Estrada R. Diaz-Espinoza D. et al., 2010. Molecular cross talk between misfolded proteins in animal models of Alzheimer's and prion diseases // J. of Neuroscience Research. Vol. 30. P. 4528–4535.

21. *Morishima-Kawashima M., Ihara Y.*, 2002. Alzheimer's disease: beta-Amyloid protein and tau // *J Neurosci Res.* Vol. 70. N3. P. 392–401.
22. *Narwa R., Harris D. A.*, 1999. Prion proteins carrying pathogenic mutations are resistant to phospholipase cleavage of their glycolipid anchors // *Biochemistry.* Vol. 38. P. 8770–8777.
23. *Outeiro T.F., Muchowski P.J.*, 2004. Molecular genetics approaches in yeast to study amyloid diseases // *J Mol Neurosci.* Vol. 23. N1-2. P. 49–60.
24. *Prusiner S. B.* Shattuck lecture-neurodegenerative diseases and prions // *N Engl J Med.* 2001. Vol. 344. N20. P. 1516–1526.
25. *Prusiner S. B.*, 1998. Prions // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* Vol. 95. N23. P. 13363–13383.
26. *Resenberger U. K., Harmeier A., Woerner A. C.*, et al., 2011. The cellular prion protein mediates neurotoxic signalling of β -sheet-rich conformers independent of prion replication // *EMBO J.* Vol. 30. N10. P. 2057–2070.
27. *Rose M. D., Winstone F., Hieter P.*, 1990. Methods in yeast genetics. CSHL Press. 198 p.
28. *Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T.*, 1989. Molecular cloning. A laboratory manual New York: Cold Spring Harbor Lab. Press. 1626 p.
29. *Sikorski R. S., Hieter P.*, 1989. A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae* // *Genetics.* Vol. 122. P. 19–27.
30. *Swift E. J. Jr, Miguez P. A., Barker M. L.* et al., 2004. Three-week clinical trial of a 14% hydrogen-peroxide, strip-based bleaching system // *Compend Contin Educ Dent.* (8 Suppl 2) P. 27–32.

PRION PROTEIN AND AMYLOID BETA PEPTIDE INTERACT IN THE YEAST SACCHAROMYCES CEREVISIAE

Rubel A. A., Korzhova V. V., Saifitdinova A. F., Antonez K. S., Inge-Vechtomov S. G., Galkin A. P.

✿ **SUMMARY:** The possibility of interaction between Prion Protein and amyloid beta peptide in living cells of yeast *Saccharomyces cerevisiae* have been investigated by fluorescence 3D microscopy. Using the FRET technique, it was shown that amyloid beta peptide and PrP interact in yeast cells. In the future, the yeast model can be used for investigation of the fine mechanisms of this interaction by fluorescence microscopy.

✿ **KEY WORDS:** Prion Protein; amyloid beta peptide; amyloidosis; prions; Alzheimer's disease; FRET; yeast.

✿ Информация об авторах

Рубель Александр Анатольевич — к. б. н., н. с. СПбФ ИОГен РАН, в. н. с. СПбГУ. 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7/9. E-mail: arubel@mail.ru.

Коржова Виктория Валерьевна — студент СПбГУ. 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7/9.

Сайфитдинова Алсу Фаритовна — к. б. н., с. н. с. СПбГУ. 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7/9. E-mail: saifitdinova@mail.ru.

Антонец Кирилл Сергеевич — студент СПбГУ. 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7/9.

Инге-Вечтомов Сергей Георгиевич — акад. РАН, проф., д. б. н., зав. кафедрой генетики и селекции СПбГУ, директор СПбФ ИОГен РАН. 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7/9. E-mail: ingevectomov@gmail.com.

Галкин Алексей Петрович — к. б. н., зам. директора СПбФ ИОГен РАН, старший преподаватель СПбГУ. 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7/9. E-mail: apgalkin@mail.ru.

Rubel Aleksander Anatol'evich — Ph.D., senior researcher. Saint Petersburg state university. 7-9, Universitetskaya nab., St.Petersburg, 199034, Russia. E-mail: arubel@mail.ru.

Korzhova Viktoria Valer'evna — student. Saint Petersburg state university. 7-9, Universitetskaya nab., St.Petersburg, 199034, Russia.

Saifitdinova Alsu Faritovna — Ph.D., senior researcher. Saint Petersburg state university. 7-9, Universitetskaya nab., St.Petersburg, 199034, Russia. E-mail: saifitdinova@mail.ru.

Antonez Kirill Sergeevich — student. Saint Petersburg state university. 7-9, Universitetskaya nab., St.Petersburg, 199034, Russia.

Inge-Vechtomov Sergey Georgievich — Academician of the RAS, D.Sc., Prof., Head of the Dep. of Genetics and Breeding Saint Petersburg state university. 7-9, Universitetskaya nab., St.Petersburg, 199034, Russia. Director of St. Petersburg Branch of N. I. Vavilov Institute of General Genetics of the RAS. 7-9, Universitetskaya nab., St.Petersburg, 199034, Russia. E-mail: ingevectomov@gmail.com.

Galkin Alexey Petrovich — Ph.D., associate professor of St. Petersburg State University deputy chief of St. Petersburg Branch of N. I. Vavilov Institute of General Genetics of the RAS. 7-9, Universitetskaya nab., St.Petersburg, 199034, Russia. E-mail: apgalkin@mail.ru.