

Сочетанное воздействие белка с амилоидными свойствами Bgl2p и других компонентов клеточных стенок дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* на состояние кожных покровов и поведение мышей

Т.С. Калебина¹, В.В. Рекстина¹, А.А. Горковский^{1*,2,3}, А.Г. Королев⁴, М.И. Ерещенко¹, Н.А. Моторин¹, О.С. Моренков⁵, А.Н. Иноземцев⁴

¹ Кафедра молекулярной биологии, биологический факультет, МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

² Лаборатория генетики и геномики, Центр микробной и растительной генетики, Лёвен, Бельгия

³ Лаборатория системной биологии, Центр микробиологии Лёвена, Биоинкубатор, Лёвен, Бельгия

⁴ Кафедра высшей нервной деятельности, биологический факультет, МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

⁵ Лаборатория культур клеток и клеточной инженерии, Институт биофизики клетки ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пущино, Россия

* Аффiliation автора на момент выполнения данной работы

The combined effect of protein with amyloid properties Bgl2p and other components of the cell walls of yeast *Saccharomyces cerevisiae* on the condition of the skin and the behavior of mice

T.S. Kalebina¹, V.V. Rekstina¹, A.A. Gorkovskiy^{1*,2,3}, A.G. Korolev⁴, M.I. Ereshchenko¹, N.A. Motorin¹, O.S. Morenkov⁵, A.N. Inozemtsev⁴

¹ Department of Molecular Biology, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

² Laboratory for Genetics and Genomics, Center of Microbial and Plant Genetics (CMPG), Leuven, Belgium

³ Laboratory for Systems Biology, VIB–KU Leuven Center for Microbiology, Bio-incubator, Leuven, Belgium

⁴ Department of Higher Nervous Activity, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

⁵ Laboratory of Cell Cultures and Cell Engineering, Institute of Cell Biophysics, FRC PSCBR RAS, Pushchino, Russia

* Affiliation of the author is at the time of this work

Аннотация

Целью исследования являлось проведение первичного скрининга изменений, происходящих в организме мышей в результате внутрибрюшинных инъекций суспензии клеточных стенок (КС) дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* и экстракта из КС, содержащих и не содержащих в своем составе белок с амилоидными свойствами Bgl2p. Исследования проводили на линиях мышей CFW и C57BL/6 с использованием КС дрожжей *S.cerevisiae* штамма дикого типа и штамма с делецией гена *BGL2*, кодирующего данный белок. О наличии белка Bgl2p в препарате для инъекций судили по данным иммуноблоттинга с антителами к данному белку. Способность к фибриллизации белка Bgl2p оценивали методами электронной микроскопии и флуоресцентного анализа с применением Тиофлавина Т. Показано, что во всех случаях, когда в инъекцируемом препарате присутствовал белок Bgl2p, у мышей разви-

Summary

The aim of the study was to carry out primary screening of changes occurring in the mice body as a result of intraperitoneal injections of a suspension of the cell walls (CW) of yeast *Saccharomyces cerevisiae* containing and not containing a protein with amyloid properties Bgl2p, and an extract from CW, in which the specified protein was present or removed. The studies were performed on CFW and C57BL/6 mouse lines using CW of wild-type strain of *S.cerevisiae* and a strain with the deletion of *BGL2* gene encoding this protein. The presence of Bgl2p in the injection preparation was assessed according to immunoblotting data with antibodies to this protein. The ability to Bgl2p fibrillation was evaluated by electron microscopy and fluorescence analysis using Thioflavin T. It was shown that in all cases when Bgl2p protein was present in the injected drug, mice developed skin disorders of varying severity. In the case of CW injection obtained from wild-type

вались нарушения кожного покрова различной степени тяжести. В случае инъекции КС, полученных из клеток дрожжей дикого типа и обработанных протеиназой К, наблюдались изменения в поведении животных, а именно, снижение параметров их исследовательской активности. Представлены данные, характеризующие способность белка Bgl2p формировать фибриллы различной морфологии после выделения из КС. Сделан вывод о токсичном воздействии Bgl2p на организм мышей, предполагается возможность индукции у животных амилоидоза, вызванного контактом с белком Bgl2p. Другие компоненты КС дрожжей, токсичные для животных, не выявлены, однако не исключается их усиливающее воздействие на проявление токсических свойств Bgl2p.

Ключевые слова

Дрожжи, клеточные стенки, амилоидоз, амилоиды, белки.

Введение

Клеточная стенка (КС) микроорганизмов – это многокомпонентная полифункциональная органелла, она является важным участником в процессах, обеспечивающих взаимоотношения клетки с окружающей средой. У многих микроорганизмов, в том числе у дрожжей, КС представляет собой компартмент, обогащенный белками с амилоидными свойствами [1, 2]. Исследования КС патогенных дрожжей *Candida albicans* [3] и пекарских дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* [4] явились одними из первых работ, в которых были частично охарактеризованы белки КС с амилоидными свойствами.

В последнее десятилетие в КС дрожжей *S. cerevisiae* был идентифицирован ряд новых амилоидных белков [5-8].

Число амилоидозов растет [9-14]. Данное заболевание, тем не менее, остаётся трудно диагностируемым, поскольку часто его клинические проявления неспецифичны независимо от того, какие органы или ткани оказываются поражёнными [15-17]. Развивающийся амилоидоз может имитировать симптомы рака лёгких [18]. Исследователи проявляют всё больший интерес к возможности индукции амилоидозов и нейродегенеративных заболеваний амилоидными белками бактерий [19-21] и дрожжей [22, 23], в том числе локализованных на поверхности их клеток. Увеличивается интенсивность исследований, направленных на анализ воздействия на организм человека белков с амилоидными свойствами, содержащихся в пищевых продуктах [24]. Очевидно, что существует необходимость в дальнейшем исследовании амилоидов, локализованных на поверхности микроорганизмов различной таксономической принадлежности, в том числе

yeast cells and treated with proteinase K, changes in animal behavior were observed, namely, a decrease in the parameters of their research activity. Data characterizing the ability of the Bgl2p protein to form fibrils of various morphologies after isolation from CW are presented. The conclusion is made about the Bgl2p toxic effect on the body of mice, the possibility of induction in animals of amyloidosis caused by contact with the Bgl2p protein is assumed. Other components of yeast CW toxic to animals have not been identified, however, their enhancing effect on the manifestation of toxic properties of Bgl2p is not excluded.

Keywords

Yeast, cell walls, amyloidosis, amyloids, proteins.

дрожжей, и их влияния на здоровье млекопитающих, включая человека.

Примерами хорошо охарактеризованных белков с амилоидными свойствами поверхности дрожжевых клеток являются белок Als C. *albicans* [25] и консервативный мажорный белок клеточной стенки дрожжей – глюканозилтрансглюкозилаза Bgl2p [4, 26-29].

Bgl2p присутствует в КС аскомицетных дрожжей и у грибов рода *Aspergillus* [27, 29]. Данный белок из разных видов дрожжей демонстрирует высокую степень гомологии, антитела к Bgl2p *S. cerevisiae* реагируют с Bgl2p *C. albicans* [26, 30]. Молекула Bgl2p *S. cerevisiae* имеет 19 сайтов для гидролиза трипсином и, тем не менее, этот белок в клеточных стенках устойчив к гидролизу этой протеиназой. В отличие от остальных нековалентно закрепленных белков КС Bgl2p не может быть экстрагирован из этой органеллы в процессе инкубации с 1% ДСН при 37°C [4], а будучи выделенным в воду при нагреве, способен образовывать структуры с фибриллярной морфологией [4, 28]. Нельзя исключить, что в формировании этих фибрилл могут принимать другие белковые компоненты КС [28]. Дополняет сказанное наличие свойств адгезина, обнаруженных у Bgl2p *C. albicans* [30]. Указанные свойства свидетельствуют об амилоидной природе структур, образуемых с участием Bgl2p как в КС, так и после выделения.

Вместе приведенные данные позволяют предположить, что контакт Bgl2p с клетками млекопитающих, в том числе человека, может стать причиной развития амилоидоза. Такой контакт может осуществляться при развитии кандидозов разной степени тяжести или другой инфекции, вызванной видами грибов, в КС которых содер-

жится данный белок. Число микозов растёт, как и число системных амилоидозов и нейродегенеративных болезней [12, 13, 31-33]. Другой путь, приводящий к возможности контактов белка Bgl2p с клетками млекопитающих, – попадание фрагментов КС, содержащих этот белок и/или самого белка, в корма, а в случае человека – в такие продукты как пищевые добавки и соусы, приготовленные с использованием разрушенных клеток дрожжей. В этом случае риск индукции развития системного амилоидоза в результате контакта клеток млекопитающих с амилоидными белками, содержащимися в КС дрожжей, может быть даже выше, поскольку применение этих микроорганизмов в качестве кормовой базы для сельскохозяйственных животных и их нетрадиционное использование в пищевой промышленности, например, в качестве компонентов фаст-фуд, имеет очевидную тенденцию к росту. Несмотря на сказанное, исследования влияния амилоидных белков, содержащихся в КС дрожжей, на организм млекопитающих, в том числе человека, практически отсутствуют.

В данной работе мы сделали попытку ответить на вопрос, является ли Bgl2p токсичным для млекопитающих компонентом КС дрожжей, а учитывая амилоидные свойства данного белка, – фактором риска развития амилоидоза и каков возможный вклад других компонентов КС в токсическое воздействие.

Материалы и методы

Штаммы дрожжей и условия их выращивания

В работе использовали штаммы дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* дикого типа – генотип *MAT α his3 Δ 1 lys2 Δ 0 ura3 Δ 0 leu2 Δ 0*, и *Δ bgl2* – генотип *MAT α his3 Δ 1 lys2 Δ 0 ura3 Δ 0 leu2 Δ 0 bgl2 Δ ::URA3*. Выращивание дрожжей на жидкой питательной среде YPD (1% дрожжевого экстракта, 2% бактопептона, 2% глюкозы) проводили в колбах объемом 750 мл с объемом среды культивирования 200 мл на качалке New Brunswick при 200 об/мин и температуре 30°C.

Выделение и частичная депротеинизация клеточных стенок

Клетки дрожжей (19 ч роста культуры) осаждали центрифугированием 10 мин при 1650g (центрифуга Eppendorf 5804R), дважды промывали 0,05М калий-фосфатным буфером pH 8,0 и разрушали на шейкере Heidolph с помощью стеклянных шариков баллотини (0,5 мм; Sigma), при охлаждении, далее проводили отмывку КС

от внутриклеточного содержимого как описано ранее [28]. Оптическую плотность суспензии КС определяли с помощью спектрофотометра Cary Eclipse (Varian Inc.) при длине волны 540 нм.

Препараты КС перед инъекцией мышам депротеинизировали одним из приведённых ниже способов, позволяющих оставить белки с амилоидными свойствами, в том числе Bgl2p в составе КС [4].

Депротеинизирование КС проводили протеиназой К (Sigma). Для удаления протеиназы К из препарата к КС добавляли аффинный сорбент бацитрацин аминсилохром, который затем удаляли центрифугированием при 1100g в течение 30 с, КС многократно промывали водой, осаждая при 12100g в течение 3 мин, и удаляли супернатант (центрифуга Eppendorf Minispin). Отсутствие протеолитической активности в суспензии КС определяли с использованием казеина в качестве субстрата. Препараты КС обоих штаммов использовали для инъекции мышам только после полного удаления протеиназы К.

Препараты КС также депротеинизировали 1% ДСН в течение 1 часа при 37°C, осаждали центрифугированием и промывали многократно 0,2 М натрий-ацетатным буфером pH 5,6, трижды смесью бутанол:вода в соотношении 1:1 и водой. КС, депротеинизированные с помощью 1% ДСН, использовали для получения экстрактов или обработки ультразвуком для инъекций мышам. Режим обработки 6 минут, 20 с импульс, 30 с пауза, 15% мощности (Branson Digital Sonifier 450, Emerson Industrial Automation) при охлаждении.

Получение экстрактов из КС

Экстракты из КС в 0,1 М Трис (Amresco), pH 9,8 и в 6 М гуанидингидрохлорид (Applichem), pH 5,6 получали как описано ранее с некоторыми модификациями [34], экстракт из КС в Трис нейтрализовали натрий-ацетатным буфером до значения pH раствора 5,6. Для инъекции мышам и проведения экспериментов с Твин-80 нейтрализованный таким образом препарат диализовали против 0,05 М натрий-ацетатного буфера, pH 5,6. Экстракт из КС в воду получали как описано ранее [4] с некоторыми модификациями, использовали инкубацию КС в воде (1 о.е. на 10 мкл, соответственно) на кипящей водяной бане в течение 5 мин.

Электрофорез белков в денатурирующих условиях в полиакриламидном геле и вестерн-блот анализ

Белки дрожжевых клеточных стенок анализировали с помощью электрофореза в денатурирующих условиях в полиакриламидном геле

(ПААГ) [35] с модификациями. Использовали маркер молекулярных весов, содержащий предварительно окрашенные белки (Fermentas). Белки в геле окрашивали Кумасси G-250 [36].

Для выявления полос Vgl2p проводили вестерн-блоттинг как описано в работе [28] с модификациями. Первичные поликлональные антитела против Vgl2p были получены у самцов мышей BALB/c в Институте биофизики клетки РАН, Пущино с использованием белка, очищенного в ПААГ (40 мкг на мышь). В качестве вторичных антител использовали поликлональные кроличьи антитела против IgG мыши, конъюгированные с пероксидазой хрена (Invitrogen). Визуализацию проводили, используя метод усиления хемилюминесценции с помощью системы ECL ThermoFisher Scientific.

Получение очищенного препарата Vgl2p

Для очистки Vgl2p использовали препарат белка, экстрагированного из КС дрожжей дикого типа, в воду. Очистку проводили с помощью препаративного электрофореза. Полосу ПААГ, содержащую Vgl2p, помещали в диализный мешок и проводили электроэлюцию белка из геля в течение 4-5 часов при напряжении 120 В и силе тока 10-30 мА. Элюированный из геля белок после диализа против воды концентрировали с использованием Сефадекс-25.

Эксперименты на лабораторных мышах

Было проведено три эксперимента по исследованию влияния препаратов, содержащих и не содержащих белок Vgl2p, на организм мышей.

В одном эксперименте 50 самок белых мышей линии CFW (возраст 13 недель) были разделены на 5 групп по 10 животных. Мышам внутрибрюшинно инъецировали по 0,2 мл суспензии КС в воде, доза КС составила 200 мкг/г. Животные контрольной группы получали эквивалентные объемы деионизованной воды (группа 1). Мышам из групп 2 и 3 вводили суспензии КС дрожжей штамма дикого типа, обработанных и не обработанных протеиназой К, соответственно. Мышам из групп 4 и 5 вводили суспензии КС дрожжей штамма *Δbgl2*, обработанных и не обработанных протеиназой К, соответственно. Препараты инъецировали мышам один раз в неделю на протяжении семи недель.

В другом эксперименте 44 самки белых мышей линии CFW (возраст 12 недель) были разделены на 4 группы по 11 животных. Мышам опытных групп внутрибрюшинно инъецировали по 0,1 мл экстрактов из КС в Трис в 0,05 М натрий-аце-

татном буфере, рН 5,6. Животные контрольной группы получали эквивалентные объемы 0,05 М натрий-ацетатного буфера, рН 5,6 (группа 1). Мышам из группы 2 вводили экстракт из КС в Трис дрожжей дикого типа. Животных из групп 3 и 4 инъецировали фильтратами экстракта из КС в Трис, полученными с использованием фильтра 0,22 мкм (Chromafil, Macherey-Nagel) и центрифужного фильтра с пределом отсечения 50 кДа (Amicon, Millipore), соответственно. Препараты инъецировали мышам один раз в неделю на протяжении трех недель.

Ещё в одном эксперименте 30 самок мышей линии C57BL/6 (возраст 12 недель) были разделены на 3 группы по 10 животных. Мышам опытных групп внутрибрюшинно инъецировали по 0,15 мл суспензии обработанных ультразвуком КС дрожжей штаммов дикого типа и *Δbgl2* в воде, доза КС составила 200 мкг/г. Животные контрольной группы получали эквивалентные объемы деионизованной воды. Препараты инъецировали мышам трижды с интервалом в 4 дня.

Животных содержали в стандартных условиях вивария со свободным доступом к пище и воде и соблюдением 12-ти часового светового режима дня (искусственное освещение с 9 до 21 ч). Алопецию у мышей линии CFW фиксировали после 40 суток после окончания процедуры инъекций, а у мышей линии C57BL/6 после 100 суток после окончания процедуры инъекций. Оценку двигательной активности и ориентировочно-исследовательского поведения проводили с использованием теста «норковая камера» [37]. Экспериментальная камера представляла собой ящик с передней стенкой из органического стекла размером 40x40x30 см. Пол камеры имел 13 круглых отверстий («норок») и был расчерчен на 9 квадратов. Арена камеры была равномерно освещена красным светом. При тестировании животное помещали в угол камеры и в течение 3-х минут визуально регистрировали следующие показатели:

- горизонтальную двигательную активность (пробег, число пройденных квадратов);
- вертикальную двигательную активность (стойки, число подъемов на задние лапы);
- число обследованных норок (число погружений головы в отверстие до уровня ушей);
- латентный период выхода из первого квадрата.

Обработку результатов производили с помощью пакета статистических программ «Statistica». Вычисляли средние значения, дисперсии и стандартные статистические отклонения массивов данных. Отличия между группами оценивали с помощью критерия ANOVA и

ANOVA-MANOVA методов, а также непараметрических критериев Фишера и χ^2 . Значимыми считались эффекты при $p < 0,05$.

Трансмиссионная электронная микроскопия

2 мкл раствора белка (экстракт из КС в Трис или высокоочищенный препарат Bgl2p) или раствора пептида VDSWNVLVAG (синтезирован ранее [28]) наносили на медные формваровые сеточки, укрепленные углеродом [28]. После инкубации во влажной камере анализировали препараты, используя для контрастирования 2% растворы уранилацетата или фосфорновольфрамовой кислоты (электронные микроскопы JEM-100B или JEM-1011, JEOL).

Динамика изменения параметра А и флуоресценции тиофлавина Т

Степень связывания с тиофлавином Т белков экстракта из КС в Трис или высокоочищенного препарата Bgl2p анализировали методом конфокальной микроскопии (Carl Zeiss Axiovert 200M LSM 510 META; Leica TCS SP2 AOBS) с использованием аргонового лазера, длина волны возбуждения которого – 458 нм.

Изучение динамики изменения флуоресценции тиофлавина Т, а также изменения экспонированности остатков триптофана (параметр А) проводили в присутствии повышающейся концентрации Твин-80. Флуоресценцию тиофлавина Т возбуждали при длине волны 450 нм и регистрировали при 485 нм [38], спектр собственной флуоресценции остатков триптофана белков возбуждали при длине волны 297 нм [39] (флуоресцентный спектрофлуориметр Cary Eclipse, Varian Inc.). Параметр А вычисляли как отношение интенсивностей собственной флуоресценции остатков триптофана при 320 и 365 нм.

Результаты и обсуждение

Из литературы известно, что введение в организм мышей посредством инъекций препаратов, содержащих амилоиды, может приводить к развитию у подопытных животных амилоидоза [40, 41].

На первом этапе работы нами были проведены эксперименты по изучению влияния, оказываемого инъекцией водной суспензии КС дрожжей *S. cerevisiae* дикого типа и штамма *Δbgl2*, обработанных и не обработанных протеиназой К, на организм мышей. Ранее нами было показано, что обработка протеиназой К позволяет частично депротеинизировать КС, сохраняя Bgl2p в ее составе, в то время как большинство остальных белков подвергается гидролизу в результате та-

кой протеолитической обработки как в случае дикого типа, так и штамма *Δbgl2*. Обработку протеиназой мы применили для облегчения контакта Bgl2p с клетками мышей.

В первую очередь, мы фиксировали визуальные различия между мышами, инъецированными различными препаратами. Было обнаружено, что внешний вид кожных покровов мышей, которым вводили суспензию КС дрожжей дикого типа, обработанных протеиназой К, отличался от внешнего вида кожных покровов мышей остальных групп. У мышей, инъецированных КС дрожжей дикого типа, обработанных протеиназой К (рис. 1А), в отличие от животных из контрольной (рис. 1В) и других групп (данные не приведены), шерсть на некоторых участках тела отсутствовала, а кожа на спине была нарушена.

Эксперимент дал основания предположить, что наблюдаемые изменения могут быть связаны с токсическим действием белка Bgl2p в составе КС, примененных для инъекции.

Ещё одним признаком токсичности препарата КС, содержащих Bgl2p, являлось снижение исследовательской активности подопытных животных. Данный критерий был изучен с применением теста «норковая камера» [37]. В процессе

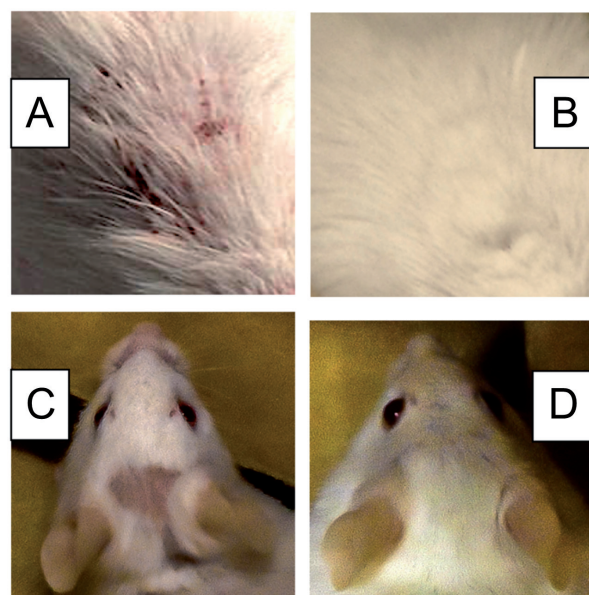


Рис. 1. Внешний вид кожных покровов мышей линии CFW, инъецированных суспензией клеточных стенок дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* штамма дикого типа, обработанных протеиназой К (А), деионизованной водой (В), экстрактом в Трис из клеточных стенок дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* штамма дикого типа (С) и фильтрованным экстрактом, освобожденным от Bgl2p (D).

эксперимента мы регистрировали следующие параметры: пробег – количество квадратов, пересеченных мышью за период наблюдения; латентный период до начала изучения новой обстановки; число стоек, сделанных мышью, и число норок, в которые мышь погрузила голову, за время наблюдения. Результаты эксперимента приведены на рисунке 2.

Приведенные данные свидетельствуют о незначительном снижении исследовательской активности у мышей, которым вводили КС дрожжей дикого типа, обработанных, а также необработанных протеиназой К. Как уже было сказано, оба препарата содержали белок Bgl2p. Данные факты также свидетельствуют в пользу того, что Bgl2p является наиболее токсичным для мышей компонентом КС.

Нами также были проведены эксперименты по воздействию КС штаммов дикого типа и *Δbgl2* на мышей другой линии, а именно C57BL/6. Для облегчения контакта белков КС с клетками мышей

суспензия КС перед проведением инъекции в данном эксперименте была обработана ультразвуком.

Данные, представленные на рисунке 3, с очевидностью демонстрируют, что, в отличие от контрольных мышей (рис. 3А), кожный покров мышей, инъецированных КС дрожжей *S. cerevisiae* штамма дикого типа, нарушен, шерсть выпадает и кожа обнажена на большой площади (рис. 3В-Д), чего не наблюдается у мышей, инъецированных КС дрожжей *S. cerevisiae* штамма *Δbgl2* (рис. 3Е). Можно заметить повреждения кожного покрова в облысевшей области (рис. 3Д).

Есть основания полагать, что первичный системный амилоидоз, обусловленный накоплением фибриллярной формы легких цепей иммуноглобулина, характеризуется тяжелым течением, но на ранней стадии заболевания дерматологические проявления могут быть единственным признаком заболевания, в отличие от поражения органов на более поздних стадиях [42-44].

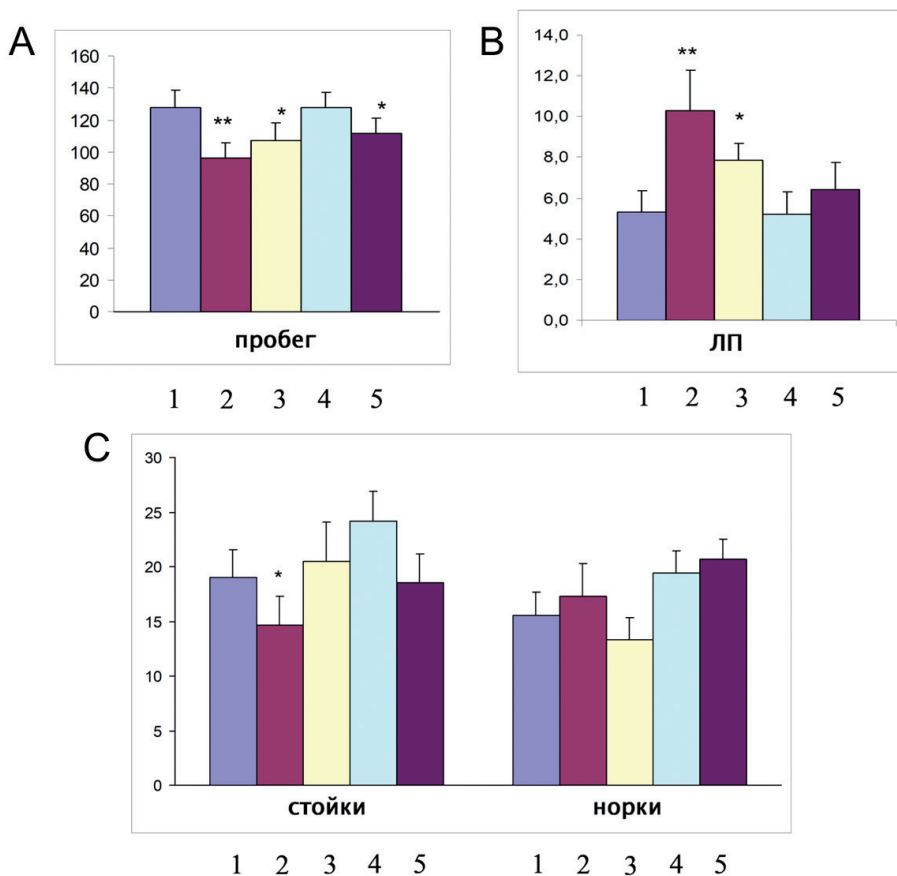


Рис. 2. Характеристика исследовательской активности подопытных мышей

А – пробег, число пройденных квадратов; В – латентный период, секунды; С – количество стоек и норок. Мыши были инъецированы водой (1), суспензией клеточных стенок дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* дикого типа, обработанных (2) и не обработанных (3) протеиназой К, либо суспензией клеточных стенок дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* штамма *Δbgl2* обработанных (4) и не обработанных (5) протеиназой К. Знаком (*) отмечены значения параметров, достоверно отличающиеся от контрольных при доверительной вероятности 95%, знаком (**) – отличающиеся от контрольных при доверительной вероятности 99%.

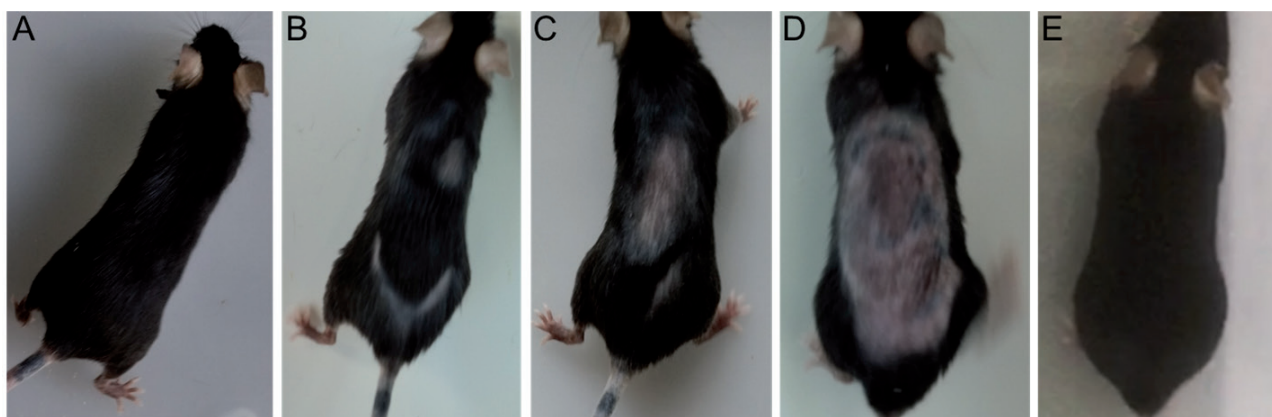


Рис. 3. Внешний вид мышей линии C57BL/6, инъецированных водой – контрольная группа (A), суспензией клеточных стенок дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* штаммов дикого типа (B-D) и $\Delta bgl2$ (E)

На основании полученных результатов мы сделали предположение о том, что токсическое воздействие на мышей препарата клеточных стенок дрожжей может быть вызвано присутствием в их составе белка Vgl2p с амилоидными свойствами и его способностью индуцировать у животных амилоидоз, проявлением которого является алопеция и нарушение кожных покровов. Указанные нарушения кожных покровов мы склонны рассматривать как признак развивающегося амилоидоза.

На следующем этапе работы нам представлялось важным выяснить, влияют ли другие компоненты КС на способность Vgl2p полимеризоваться и проявление токсических свойств этого белка.

Исходя из этого, далее мы проверили способность индуцировать указанные нарушения кожных покровов у мышей, инъецированных экстрактом из КС в Трис, содержащим преимущественно Vgl2p (рис. 4, дорожка 1), но, возможно, и другие компоненты, в частности, белки КС [34], а также экстрактом в Трис, освобожденным от Vgl2p в результате фильтрации. Из результатов, представленных на рис. 1 (рис. 1C, D) видно, что после инъекции экстрактом, содержащем Vgl2p, в отличие от таковой экстрактом, освобожденным от данного белка, у мышей развиваются нарушения кожных покровов. Следует оговориться, что нам не удалось получить препарат высокоочищенного белка Vgl2p в количестве, достаточном для проведения эксперимента по инъецированию мышей. Разработанный нами способ электрофоретической очистки белка с последующей электроэлюцией его из геля, явился единственным результативным подходом для выделения

Vgl2p в высокоочищенном виде, который, однако, не позволял накопить белок в достаточном количестве, вследствие чего в данной работе мы не изучали воздействие такого препарата на организм мышей. Это исследование проводится нами в настоящее время.

Недавно было показано, что в Трисовой фракции представлена только часть данного белка [28], в то время как другая его часть значительно прочнее закреплена в КС и может быть получена только с использованием в качестве экстрагента гуанидингидрохлорида [34]. Сравнительный анализ, проведенный в данной работе, показал, что интенсивной экстракции можно достичь, используя в качестве экстрагента воду в сочетании с нагревом до 100°C (рис. 4). Используя такой способ экстракции удаётся выделить большее количество Vgl2p, возможно большее, чем в Трис

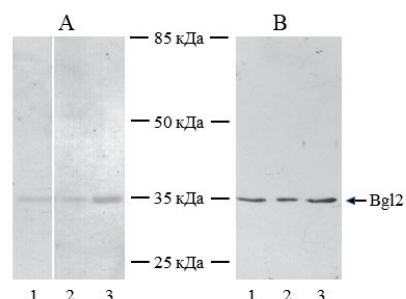


Рис. 4. Электрофорез в денатурирующих условиях, окрашивание Кумасси G-250 (A) и вестерн-блот анализ с использованием антител к Vgl2p (B) экстрактов из клеточных стенок дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* в 0,1 М Трис (дорожка 1), в 6 М гуанидингидрохлорид (дорожка 2), а также в воду (дорожка 3).

и гуанидингидрохлорид суммарно (рис. 4, А и В, дорожки 1, 2, 3). Данный способ экстракции был использован для получения высокоочищенного препарата Bgl2p с целью изучения его полимеризации.

Изучаемый белок активно фибриллизуется в высокоочищенном препарате (рис. 5 А-Д). В этом случае форма образуемых им фибрилл в значительной степени однородна, но сильно от-

личается от таковой, обнаруживаемой в экстракте в Трис. Синтезированный амилоидогенный пептид VDSWNVLVAG из последовательности Bgl2p, соответствующий номерам аминокислот 166-175 также демонстрирует способность образовывать фибриллы (рис. 6 А-Д). Аналогичная способность была показана нами ранее как для других амилоидогенных пептидов AEGFTIFVGV и VMANAFSYWQ, соответствующих номерам

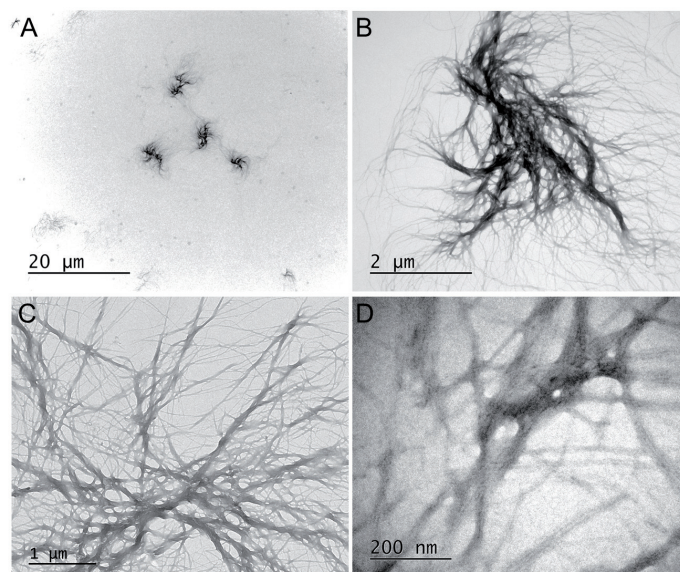


Рис. 5. Электронная микроскопия структур, формируемых Bgl2p, очищенным из водного экстракта из клеточных стенок дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* штамма дикого типа

А, В, С, D – различные увеличения

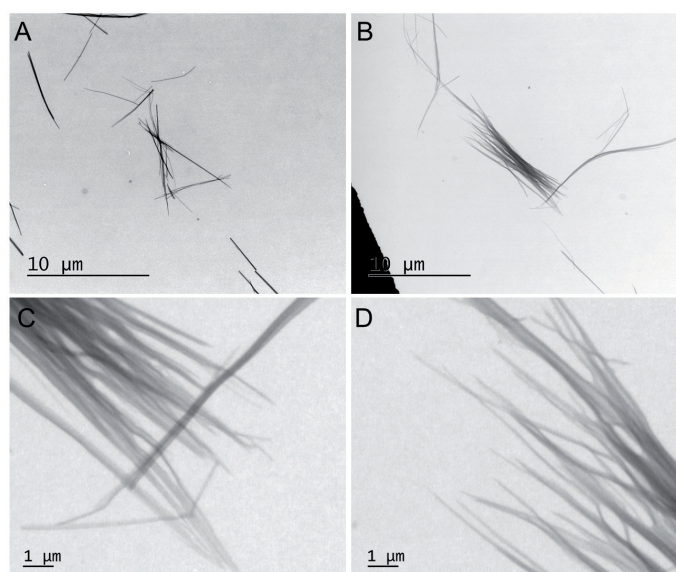


Рис. 6. Электронная микроскопия структур, формируемых в воде пептидом VDSWNVLVAG из последовательности Bgl2p, соответствующим номерам аминокислот 166-175

А и В – изображения с линейкой 10 μm; С и D – изображения с линейкой 1 μm

аминокислот 80-89 и 187-196 последовательно-сти Vgl2p, так и для данного пептида, однако в настоящей работе нам удалось полимеризовать пептид VDSWNVLVAG при значении рН 6,2, то есть более близком к таковому кровяного русла в отличие от условий полимеризации, использованных ранее [28]. Морфология фибрилл, образуемых пептидом, при данном значении рН также отличается.

Мы исходили из того, что при попадании в организм животного Vgl2p может оставаться полноразмерной молекулой, способной полимеризоваться с образованием фибрилл амилоидного типа независимо от остальных компонентов КС, также его полимеризация может быть обусловлена присутствием других компонентов КС (белковой и небелковой природы), в обоих случаях молекула Vgl2p в организме мышей может подвергаться воздействию протеолитических ферментов, что должно приводить к появлению

пептидов, также способных к полимеризации и индукции таковой белков животного.

С использованием трансмиссионной электронной микроскопии в экспериментах по сравнительному анализу наличия фибриллярного материала в экстрактах из КС штаммов дикого типа и $\Delta bgl2$ мы показали наличие массовой фибриллизации, в препарате, экстрагированном в Трис (рис. 7), в котором Vgl2p составляет основную долю белкового материала (рис. 4), но также присутствуют другие белки КС [34]. Форма фибрилл зависит от времени фибриллизации, что мы склонны связывать с различиями в концентрации мономерной и/или олигомерной формы Vgl2p на разных стадиях процесса.

Таким образом, все три сценария полимеризации Vgl2p в организме мышей после инъекции могут быть реализованы.

С целью понимания возможного механизма индукции амилоидоза с участием белка Vgl2p

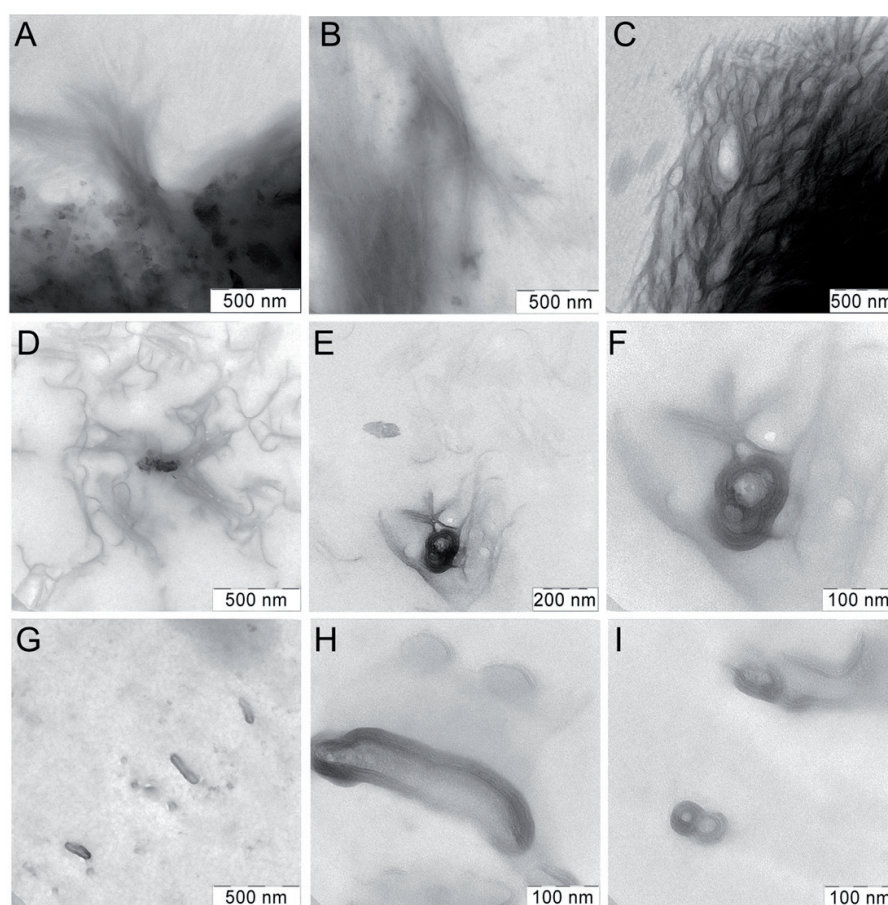


Рис. 7. Электронная микроскопия структур, формируемых после экстракции в Трис из клеточных стенок дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* штамма дикого типа: «поля фибрилл» (А-С), сплетения отдельных нитей (D-F) и «овальные структуры» (G-I). А и В – инкубация на сетке в течение 1 мин, С – инкубация на сетке в течение 4 часов. D-F – препарат разведён в 5 раз, инкубация в течение 5,5 часов. G-I – препарат разведён в 10 раз, инкубация в течение 5,5 часов.

и других компонентов КС дрожжей мы предприняли попытки выяснения условий, при которых такая полимеризация возможна и какие соединения могут способствовать большей ее эффективности.

Следует отметить, что фибриллизация как высокоочищенного препарата Bgl2p так и белка, полученного экстракцией в Трис, не сопровождалась быстрым, развивающимся в течение нескольких часов увеличением интенсивности флуоресценции тиофлавина Т по сравнению с контролем ни в экспериментах, проведенных с помощью флуориметрического анализа, ни с помощью конфокальной микроскопии (данные не приведены). Увеличение интенсивности флуоресценции тиофлавина Т свидетельствует о формировании β -складчатых слоёв в белке и является важным свидетельством того, что образуемые фибриллы могут иметь амилоидную природу [38].

Увеличение специфической флуоресценции тиофлавина Т нам удалось наблюдать после добавления мембранного миметика Твин-80 к экстракту Bgl2p в Трис (рис. 8). Такой экстракт мы использовали для инъекций мышам. Также мы наблюдали падение значения параметра А, свидетельствующего об изменении конформации и увеличении экспонированности остатков триптофана у белков, входящих в состав данного экстракта (рис. 9).

Поскольку практически единственным белком, детектируемым с помощью электрофореза в ПААГ в изучаемом экстракте является Bgl2p, а остальные белки, присутствующие в данном экстракте, могут быть выявлены только с помощью LC-MS/MS анализа [34], из полученных результатов можно сделать предположение о том, что именно Bgl2p может ускоренно ассоциировать с образованием фибрилл амилоидного типа в присутствии липидов. Такой контакт весьма вероятно может происходить в организме животных в тканях, насыщенных липидами. Аналогичных результатов при использовании электрофоретически очищенного препарата Bgl2p нами получено не было. Таким образом, наши эксперименты выявляют возможную роль других компонентов КС как катализаторов процесса фибриллообразования, механизм которого не изучен. В настоящее время мы ведем работы в данном направлении. В то же время экстракт белков из КС, экстрагированных в Трис, освобожденный от Bgl2p, не обладает способностью проявлять токсичность и вызванное ею облысение мышей. Следовательно, по всей вероятности, токсичным является именно этот белок.

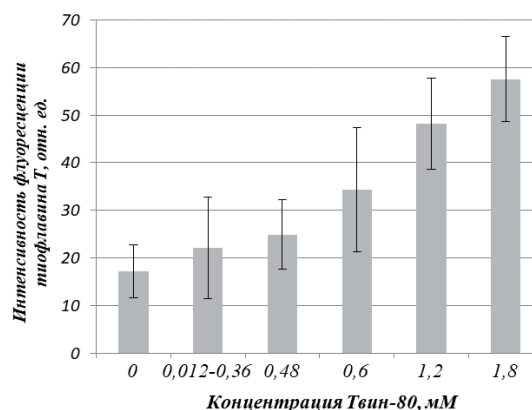


Рис. 8. Способность белка экстракта в Трис из клеточных стенок дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* штамма дикого типа связывать специфический к амилоидной структуре краситель тиофлавин Т в зависимости от концентрации Твин-80.

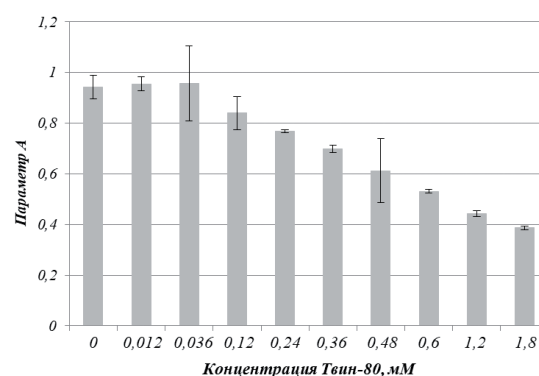


Рис. 9. Значение параметра А белка экстракта в Трис из клеточных стенок дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* штамма дикого типа в зависимости от концентрации Твин-80

Заключение

В проведенном исследовании продемонстрировано токсическое воздействие белка клеточной стенки дрожжей Bgl2p на мышей, проявляющееся в нарушении их кожных покровов, облысении и изменениях в поведении. Вывод сделан на основании того, что все указанные изменения наблюдались только в том случае, если в препарате клеточных стенок или экстракте из них, использованных для инъекции, присутствовал данный белок. Клеточные стенки, полученные из штамма дрожжей, у которых ген, кодирующий Bgl2p, был нарушен и белок отсутствовал, такого воздействия в условиях проведенных экспериментов не оказывали, равно как и экстракт из КС дикого типа, освобожденный от Bgl2p. Токсическое воз-

действие инъекций было сильнее в случае применения препаратов клеточных стенок и несколько слабее при инъекции экстракта в Трис из КС дрожжей дикого типа. Можно заключить, что другие компоненты клеточных стенок, которые сами по себе, по-видимому, не оказывают токсического воздействия, способны, тем не менее, усиливать таковое, проявляемое белком Bgl2p.

В работе также сделана попытка определить механизм токсического воздействия изучаемого белка. Представлены данные о способности Bgl2p фибриллизироваться как в виде полноразмерной молекулы в препарате высокой степени очистки, так и в препарате, возможно, содержащем некоторое количество других белков КС. Наряду с опубликованными ранее [4, 28] приведены новые данные о способности образовывать фибриллы амилоидогенным пептидом VDSWNVLVAG Bgl2p. Эти результаты в совокупности с данными об индуцирующем воздействии Твин-80 на процесс формирования β -структур в препарате белка, использованного для инъекций, позволило нам сделать предположение о том, что причиной обнаруженного токсического воздействия является способность

белка индуцировать развитие амилоидоза, которая в организме мышей может быть усилена его взаимодействием с липидами. Согласно данным литературы, нарушения кожных покровов и поведения могут являться признаками развивающегося амилоидоза [17, 42-44]. Динамика наблюдаемых проявлений, а именно их медленное развитие и проявление только после более чем месяца от окончания процедуры инъекции при полном отсутствии таковых на более ранних стадиях эксперимента, подтверждает высказанное предположение.

Благодарности

Авторы благодарят профессора Н.Г. Левицкую (кафедра физиологии человека и животных биологического факультета МГУ) за помощь в работе и консультации, а также электронно-микроскопический комплекс ЦКП МГУ за помощь в работе на электронном микроскопе и Университет г. Ростова за возможность работы на конфокальном микроскопе. Работа поддержана грантом РФФИ 20-04-01144 А. Исследование выполнено в рамках научного проекта государственного задания МГУ № 121032300088-6.

Литература

1. Gebbink M.F., Claessen D., Bouma B. et al. Amyloids – a functional coat for microorganisms. *Nat Rev Microbiol* 2005, 3(4): 333-41. doi: 10.1038/nrmicro1127.
2. Tartaglia G.G., Cafilisch A. Computational analysis of the *S. cerevisiae* proteome reveals the function and cellular localization of the least and most amyloidogenic proteins. *Proteins* 2007, 68(1):273-8. Doi: 10.1002/prot.21427
3. Otoo H.N., Lee K.G., Qiu W. et al. *Candida albicans* Als adhesins have conserved amyloid-forming sequences. *Eukaryot Cell* 2008, 7(5):776–82. doi: 10.1128/EC.00309-07
4. Kalebina T.S., Plotnikova T.A., Gorkovskii A.A. et al. Amyloid-like properties of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall glucantransferase Bgl2p: prediction and experimental evidences. *Prion* 2008, 2:91-6 doi: 10.4161/pri.2.2.6645.
5. Chan C.X.J, El-Kirat-Chatel S., Joseph I.G. et al. Force Sensitivity in *Saccharomyces cerevisiae* Flocculins. *mSphere* 2016, 1(4): e00128-16. doi: 10.1128/mSphere.00128-16.
6. Lipke P.N., Klotz SA, Dufrene Y.F. et al. Amyloid-Like β -Aggregates as Force-Sensitive Switches in Fungal Biofilms and Infections. *Microbiol Mol Biol Rev* 2017, 82(1): e00035-17. doi: 10.1128/MMBR.00035-17.
7. Ryzhova T.A., Sopova J.V., Zadorsky S.P. et al. Screening for amyloid proteins in the yeast proteome. *Curr Genet* 2018, 64(2): 469-478. doi: 10.1007/s00294-017-0759-7.
8. Sergeeva A.V., Sopova J.V., Belashova T.A. et al. Amyloid properties of the yeast cell wall protein Toh1 and its interaction with prion proteins Rnq1 and Sup35. *Prion* 2019, 13(1): 21-32. doi: 10.1080/19336896.2018.1558763.
9. Chiti F., Dobson C.M. Protein Misfolding, Amyloid Formation, and Human Disease: A Summary of Progress Over the Last Decade. *Annu Rev Biochem* 2017, 86: 27-68. doi: 10.1146/annurev-biochem-061516-045115.
10. Cohen O.C., Wechalekar A.D. Systemic amyloidosis: moving into the spotlight. *Leukemia* 2020, 34(5): 1215-1228. doi: 10.1038/s41375-020-0802-4.
11. Cuddy S.A.M., Falk R.H. Amyloidosis as a Systemic Disease in Context. *Review Can J. Cardiol* 2020, 36(3): 396-407. doi: 10.1016/j.cjca.2019.12.033.
12. Gertz M.A., Dispenzieri A. Systemic Amyloidosis Recognition, Prognosis, and Therapy: A Systematic Review. *JAMA* 2020, 324(1): 79-89. doi: 10.1001/jama.2020.5493.
13. Latif A., Lateef N., Razzaq F. et al. Fundamentals of Light Chain Cardiac Amyloidosis: A Focused Review. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets* 2020, 20(4): 274-283. doi: 10.2174/1871529X20666201130110036.
14. Picken M.M. The Pathology of Amyloidosis in Classification: A Review. *Acta Haematol* 2020, 143(4): 322-334. doi: 10.1159/000506696.
15. Ihne S., Morbach C., Sommer C. et al. Amyloidosis – the Diagnosis and Treatment of an Underdiagnosed Disease. *Dtsch Arztebl Int* 2020, 117(10): 159-166. doi: 10.3238/arztebl.2020.0159
16. Vaxman I., Dispenzieri A., Muchtar E. et al. New developments in diagnosis, risk assessment and management in systemic amyloidosis. *Blood Rev* 2020, 40: 100636. doi: 10.1016/j.blre.2019.100636.
17. Pinto M.V., Dyck P.J.B., Liewluck T. Neuromuscular amyloidosis: Unmasking the master of disguise. *Muscle Nerve* 2021, 64(1): 23-36. doi: 10.1002/mus.27150.
18. Fisch A.S., Fintelmann F.J., Garcia-Moliner M.L. Systemic Amyloidosis Mimicking Lung Cancer. *Am J Respir Crit*

- Care Med 2020, 201(1): 107-108. doi: 10.1164/rccm.201812-2261IM.
19. Dodiya H.B., Kuntz T., Shaik S.M. et al. Sex-specific effects of microbiome perturbations on cerebral A β amyloidosis and microglia phenotypes. *J Exp Med* 2019, 216(7): 1542-1560. doi: 10.1084/jem.20182386.
20. Sampson T.R., Challis C., Jain N. et al. A gut bacterial amyloid promotes α -synuclein aggregation and motor impairment in mice. *Elife* 2020, 9: e53111. doi: 10.7554/eLife.53111.
21. Werner T., Horvath I., Wittung-Stafshede P. Crosstalk between alpha-synuclein and other human and non-human amyloidogenic proteins: consequences for amyloid formation in Parkinson's disease. *J Parkinsons Dis* 2020, 10(3): 819-830. doi: 10.3233/JPD-202085.
22. Pisa D., Alonso R., Rábano A. et al. Different Brain Regions are Infected with Fungi in Alzheimer's Disease. *Sci Rep* 2015, 5: 15015. doi: 10.1038/srep15015.
23. Wu Y., Du S., Johnson J.L. et al. Microglia and amyloid precursor protein coordinate control of transient *Candida* cerebritis with memory deficits. *Nat Commun* 2019, 10(1):58. doi: 10.1038/s41467-018-07991-4.
24. Cao Y., Mezzenga R. Food protein amyloid fibrils: Origin, structure, formation, characterization, applications and health implications. *Adv Colloid Interface Sci* 2019, 269: 334-356. doi: 10.1016/j.cis.2019.05.002.
25. Garcia M., Lipke P., Klotz S. Pathogenic microbial amyloids: Their function and the host response. *OA Microbiol.* 2013, 1(1): 2.
26. Sarthy A.V., McGonigal T., Coen M., Frost D.J., Meulbroek J.A., Goldman R.C. Phenotype in *Candida albicans* of a disruption of the BGL2 gene encoding a 1,3-beta-glucosyltransferase. *Microbiology* 1997, 143(Pt 2): 367-376. doi: 10.1099/00221287-143-2-367.
27. Mouyna I., Hartland RP, Fontaine T, Diaquin M, Simenel C, Delepierre M, Henrissat B, Latge JP. 1998. A 1,3-beta-glucantransferase isolated from the cell wall of *Aspergillus fumigatus* is a homologue of the yeast Bgl2p. *Microbiology* 144(Pt 11):3171-3180. doi: 10.1099/00221287-144-11-3171.
28. Bezsonov E.E., Groenning M., Galzitskaya O.V. et al. Amyloidogenic peptides of yeast cell wall glucantransferase Bgl2p as a model for the investigation of its pH-dependent fibril formation. *Prion* 2013, 7(2): 175-84. doi: 10.4161/pri.22992.
29. Mouyna I., Hartl L., Latgé J.P. β -1,3-glucan modifying enzymes in *Aspergillus fumigatus*. *Front Microbiol* 2013, 17;4:81. doi: 10.3389/fmicb.2013.00081.
30. Jeng H.W., Holmes A.R., Cannon R.D. Characterization of two *Candida albicans* surface mannoprotein adhesins that bind immobilized saliva components. *Med Mycol* 2005, 43(3): 209-17. doi: 10.1080/13693780410001731637.
31. Gunaydin S.D., Arikan-Akdagli S., Akova M. Fungal infections of the skin and soft tissue. *Curr Opin Infect Dis* 2020, 33(2): 130-136. doi: 10.1097/QCO.0000000000000630.
32. Segrelles-Calvo G., Araújo G.R.S., Frases S. Systemic mycoses: a potential alert for complications in COVID-19 patients. *Future Microbiol* 2020, 15: 1405-1413. doi: 10.2217/fmb-2020-0156.
33. Липницкий А.В., Половец Н.В., Суркова Р.С. и др. Актуальные проблемы особо опасных микозов. *Иммунопатология, аллергология, инфектология* 2021, 1: 57-63. doi: 10.14427/jipai.2021.1.57.
34. Rekestina V.V., Sabirzyanova T.A., Sabirzyanov F.A. et al. The Post-Translational Modifications, Localization, and Mode of Attachment of Non-Covalently Bound Glucantransferases of Yeast Cell Wall as a Key to Understanding their Functioning. *Int J Mol Sci* 2020, 21(21): 8304. doi: 10.3390/ijms21218304.
35. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970, 227, 680-685, doi:10.1038/227680a0.
36. Peisker K. Application of Neuhoff's optimized Coomassie Brilliant Blue G-250/ammonium sulfate/phosphoric acid protein staining to ultrathin polyacrylamide gels on polyester films. *Electrophoresis* 1988, 9, 236-238, doi:10.1002/elps.1150090510.
37. Kelley A.E., Cadore M., Stinus L. Exploration and Its Measurement. In *Psychopharmacology* 1989, 13: 95-144.
38. Hudson S.A., Ecroyd H., Kee T.W. et al. The thioflavin T fluorescence assay for amyloid fibril detection can be biased by the presence of exogenous compounds. *FEBS J* 2009, 276(20): 5960-72. doi: 10.1111/j.1742-4658.2009.07307.x.
39. Пермьяков Е.А. Метод собственной люминесценции белка. М.: Наука, 2003, 189 с.
40. Johan, K., Westermark, G., Engstrom, U., Gustavsson, A., Hultman, P. and Westermark, P. Acceleration of amyloid protein A amyloidosis by amyloid-like synthetic fibrils. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998, 95: 2558-2563. doi: 10.1073/pnas.95.5.2558.
41. Lundmark, K., Westermark, G. T., Olsen, A. and Westermark, P. Protein fibrils in nature can enhance amyloid protein A amyloidosis in mice: Cross-seeding as a disease mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005, 102, 6098-6102. doi: 10.1073/pnas.0501814102.
42. Horvat A.T., Trčko K., Jurčić V. et al. Primary systemic amyloidosis with skin and cardiac involvement: a case report. *Acta Dermatovenerol Alp Pannonica Adriat* 2018, 27(1): 45-47.
43. Renker T., Haneke E., Röcken C. et al. Systemic Light-Chain Amyloidosis Revealed by Progressive Nail Involvement, Diffuse Alopecia and Sicca Syndrome: Report of an Unusual Case with a Review of the Literature. *Dermatology* 2014, 228(2), 97-102. doi: 10.1159/000354262.
44. Ledesma F.L., Castelli J.B. Autopsy findings in a patient with primary systemic AL (kappa light chain) amyloidosis. *Autops Case Rep* 2021, 11: e2021273. doi: 10.4322/acr.2021.273.

Сведения об авторах:

Калебина Т.С. - д.б.н., профессор, ведущий научный сотрудник кафедры молекулярной биологии биологического факультета МГУ им.М.В.Ломоносова, 119234, Россия, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12, тел: +79166232195, эл. почта: kalebina@gmail.com. Автор для переписки.

Рекстина В.В. - мастер ТСП кафедры молекулярной биологии биологического факультета МГУ им.М.В.Ломоносова, тел: +79772686231, эл. почта: vrexina@gmail.com

Горковский А.А. - на время выполнения работы аспирант кафедры молекулярной биологии биологического факультета МГУ им.М.В.Ломоносова, тел: +32492103684, эл. почта: anton85ster@gmail.com

Королёв А.Г. - инженер первой категории кафедры высшей нервной деятельности биологического факультета МГУ им. М.В.Ломоносова, тел: +79037576897, эл. почта: korolevpost@gmail.com

Ерещенко М.И. - аспирант кафедры молекулярной биологии биологического факультета МГУ им.М.В.Ломоносова, тел: +79104484610, эл. почта: mary.kay97@mail.ru

Моторин Н.А. - студент кафедры молекулярной биологии биологического факультета МГУ им.М.В.Ломоносова, тел: +79852568535, эл. почта: motorin_n@inbox.ru

Моренков О.С. - д.б.н., заведующий лабораторией культур клеток и клеточной инженерии Института биофизики клетки ФИЦ ПНЦБИ РАН. Директор Института. 142290, Московская область, г. Пущино, ул. Институтская, 3. Тел.: +74967739479, эл. почта: morenkov_o@mail.ru

Иноземцев А.Н. - д.б.н., ведущий научный сотрудник кафедры высшей нервной деятельности биологического факультета МГУ им.М.В.Ломоносова, тел: +79037576897, эл. почта: a_inozemtsev@mail.ru

Статья принимает участие в конкурсе научных публикаций по медицинской микологии, объявленном Академией Микологии в 2021 году