

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ ОБЩЕЙ ГЕНЕТИКИ ИМ. Н.И. ВАВИЛОВА РОССИЙСКОЙ
АКАДЕМИИ НАУК (ИОГЕН РАН)

На правах рукописи

Андрейчук Юлия Вячеславовна

**ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ АМИЛОИДИЗАЦИИ БЕЛКОВ НА
СТАБИЛЬНОСТЬ ГЕНЕТИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА У ДРОЖЖЕЙ
*SACCHAROMYCES CEREVISIAE***

Научная специальность: 1.5.7 – генетика

Диссертация на соискание
Учёной степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:
д. б. н., профессор, академик РАН,
научный руководитель СПб филиала ИОГен
Инге-Вечтомов Сергей Георгиевич

г. Москва
2023 г.

ОГЛАВЛЕНИЕ:

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	5
ВВЕДЕНИЕ	6
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	13
1.1 Матричный принцип в биологии. Матрицы I и II рода (линейные и пространственные матрицы)	13
1.2 Амилоиды и прионы	19
1.3 Прионы низших эукариот	23
1.4 Функциональные амилоиды	27
1.5 Объекты и модели изучения взаимодействия амилоидогенеза и процессов, участвующих в контроле стабильности генома	29
1.6 Амилоиды и эффективность репарации	33
1.7 Амилоиды и геномные мутации	34
1.8 Роль амилоидогенеза в канцерогенезе	37
1.9 Подходы, применяемые для решения задачи исследования	41
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	44
2.1 Штаммы дрожжей <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , использованные в работе	44
2.2 Среды и условия культивирования	45
2.3 Плазмиды	46
2.4 Индукция прионизации Sup35	46
2.5 Флуоресцентная микроскопия	46
2.6 Определение частоты прионизации	47
2.7 Стандартные методы генетики дрожжей	47
2.8 Трансформация дрожжевых клеток плазмидной ДНК	47
2.9 Трансформация дрожжевых клеток лизатом клеток, содержащим прион	48
2.10 Альфа-тест	49
2.11 Определение частоты прямых мутации устойчивости к канаванину в гене <i>CAN1</i>	51
2.12 Определение частоты полиплоидизации	52
2.13 Определение частоты совместного возникновения приона [<i>PSI</i> ⁺] и прямых мутаций в гене <i>CAN1</i>	53
2.14 Проточная цитометрия	53
2.15 Выделение геномной ДНК из клеток дрожжей <i>S. cerevisiae</i>	54

2.16	Полногеномное секвенирование	55
2.17	Статистические методы	55
3	РЕЗУЛЬТАТЫ	56
3.1	ОЦЕНКА ПАРАМЕТРОВ МУТАГЕНЕЗА У ШТАММОВ С $[PSI^+]$ И $[PIN^+]$ ИЗ КОЛЛЕКЦИИ КАФЕДРЫ ГЕНЕТИКИ И БИОТЕХНОЛОГИИ СПбГУ	56
3.1.1	Фенотипическая характеристика штаммов с прионом $[PSI^+]$	56
3.1.2	Фенотипическая характеристика штаммов с прионом $[PIN^+]$	57
3.2	ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ПРИОНА $[PSI^+]$ НА ЧАСТОТУ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ РАЗЛИЧНЫХ ТИПОВ	58
3.2.1	Создание коллекции штаммов $[PSI^+]$ и их фенотипическая характеристика	58
3.2.2	Параметры спонтанного и индуцированного УФ-мутагенеза штаммов $[PSI^+]$ с измененным значением частоты «незаконной» гибридизации	61
3.2.3	Спектр генетических изменений, учитываемых в альфа-тесте у штаммов $[PSI^+]$ - 2-5 и 127	64
3.2.4	Проверка прямого влияния приона $[PSI^+]$ на стабильность генетического материала	65
3.3	ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ В ШТАММАХ $[PSI^+]$	68
3.3.1	Генетические изменения, обнаруженные в штаммах $[PSI^+]$ с измененными параметрами мутагенеза	68
3.3.2	Генетический анализа штаммов $[PSI^+]$ с- 127 и $[PSI^+]$ - 2-5	71
3.4	ВЛИЯНИЕ ПРИОНА $[PSI^+]$ НА ЧАСТОТУ ДУПЛИКАЦИИ ГЕНОМА	74

3.5 ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ НАРУШЕНИЯ МЕХАНИЗМОВ, УЧАСТВУЮЩИХ В ПОДДЕРЖАНИИ СТАБИЛЬНОСТИ ГЕНОМА НА ЧАСТОТУ ПРИОНИЗАЦИИ Sup35	75
3.5.1 Влияние ингибирования синтеза предшественников ДНК дНТФ на частоту прионизации Sup35	77
3.5.2 Результаты исследования влияния дизрупции гена <i>RAD52</i> на частоту возникновения приона [<i>PSI</i> ⁺]	78
3.6 ЧАСТОТА ОДНОВРЕМЕННОГО ПОЯВЛЕНИЯ ПРИОНА [<i>PSI</i> ⁺] И ИЗМЕНЕНИЙ ГЕНОМА	80
3.6.1 Частота появления клонов с измененными параметрами мутагенеза при прионизации белка Sup35	80
3.6.2 Частота одновременного появления приона [<i>PSI</i> ⁺] и мутаций в гене <i>CANI</i>	83
4 ОБСУЖДЕНИЕ	86
5 ЗАКЛЮЧЕНИЕ	91
6 ВЫВОДЫ	92
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	93

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ:

АП-сайт – апуриновый/апиримидиновый сайт

АФК – активные формы кислорода

БА – болезнь Альцгеймера

БАС – боковой амиотрофический склероз

БГШШ – болезнь Гершмана-Штройслера-Шейнкера

БКЯ – болезнь Кройцфельда-Якоба

БП – болезнь Паркинсона

БХ – болезнь Хантингтона

ГГХ – гидрохлорид гуанина

ГМ – гидроксимочевина

ДМСО – диметилсульфоксид

ДТТ - дитиотреитол

МП – матричный процесс

МП I – матричные процессы I рода

МП II – матричные процессы II рода

мтДНК – митохондриальная ДНК

ПЭГ - полиэтиленгликоль

СД – синдром Дауна

СФБ – семейная фатальная бессонница

ТЕ – Трис-ЭДТА

УФ – ультрафиолетовый свет

ЦД – центральная догма

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

8-OHdG – 8-оксо-2'-дезоксогуанозин

8-OHG – 8-оксогуанозин

A β – амилоид β

BER – base excision repair (эксцизионная репарация оснований))

BSE – bovine spongiform encerphalopathy (губчатая энцефалопатия крупного рогатого скота)

CR – Congo red (Конго красный)

DDR – DNA damage response (активация механизмов ответа клетки на повреждения ДНК)

LiAc – lithium acetate (ацетат лития)

MD – minimal dextrose (минимальная среда с глюкозой)

MMR – mismatch repair (репарация неспаренных оснований)

QN-домен – домен белков, обогащённый глутамином (Q) и аспарагином (N)

OD – optical density (оптическая плотность)

SDS – sodium dodecyl sulfate (додецилсульфат натрия)

YEPD – yeast extract peptone dextrose (полная среда для роста дрожжей)

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы

Передача и реализация генетической информации в живых организмах происходит посредством зависимо от матрицы синтеза линейных полимерных молекул (нуклеиновых кислот и белков) из мономеров (нуклеотидов и аминокислот) в ходе матричных процессов I рода (МП I) – репликации, транскрипции, трансляции. При этом путь передачи наследственной информации представляет собой: ДНК \leftrightarrow РНК \rightarrow Белок (Crick, 1958; Crick, 1970). Молекулы белков никогда не являются матрицами в линейных матричных процессах. Помимо линейных матричных процессов в клетках реализуются матричные процессы II рода (МП II), характерные только для белков (амилоидогенез и прионизация). В ходе матричных процессов II рода воспроизводится пространственная структура белковых молекул, при этом информация о пространственной укладке передается от одной белковой молекулы к другой. Белковые молекулы, способные передавать информацию о пространственной структуре другим молекулам, принято называть конформационными матрицами (см. Инге-Вечтомов, 2015а). Конформационные матрицы возникают в результате спонтанных изменений пространственной укладки или в присутствии другой молекулы белка с уже измененной пространственной структурой, при этом происходит обогащение белковой молекулы β -слоями. Молекулы белка с измененной структурой становятся центрами полимеризации, стимулируя изменение пространственной структуры все большего числа белковых молекул, которые, взаимодействуя друг с другом, образуют нерастворимые агрегаты с особой упорядоченной структурой (амилоиды). Амилоидные агрегаты представляют собой фибриллы, состоящие из множества обогащенных β -слоями белковых молекул, в амилоидной фибрилле молекулы белка связаны между собой межмолекулярными водородными связями, образуемыми между β -складками, ориентированными перпендикулярно оси фибриллы (Chatani et al., 2021).

Передача информации о пространственной структуре от одной молекулы белка другой белковой молекуле может происходить не только в одной клетке или организме, но и между особями одного или разных видов. В этом случае говорят об инфекционных свойствах амилоидов, когда носителями наследственной информации являются прионы (инфекционные амилоиды), а способом передачи наследственной информации выступают МП II. Открытие прионов связано с изучением нейродегенеративных заболеваний человека и животных (Prusiner, 1982а). У человека прионы вызывают такие заболевания как куру, обнаруженное у представителей обитающего в Папуа-Новой Гвинее племени Форе, практиковавших ритуальный каннибализм, болезнь Гершмана-Штройслера-Шейнкера (БГШШ), болезнь Кройцфельда-Якоба (БКЯ) и семейную фатальную бессонницу (СФБ) (см. обзор Geschwind, 2015). Все эти

заболевания вызывают необратимую деграцию тканей мозга, что в конечном итоге приводит к смерти, сегодня эти заболевания являются неизлечимыми. У млекопитающих, крупного и мелкого рогатого скота, оленей, мышей, крыс, хомяков и др. прионы также вызывают губчатые энцефалопатии (см. Windl and Dawson, 2012). У одноклеточных организмов, таких как *S. cerevisiae* и *Podospora anserina*, прионы могут передаваться в ходе клеточных делений, в этом случае говорят о «белковой» наследственности (в обзоре Wickner, 2016).

Долгое время образование амилоидов считалось исключительно патологическим процессом, однако в последние годы обнаруживают все больше примеров функциональных амилоидов – белков, которые выполняют свою физиологическую функцию, находясь в амилоидном состоянии (Нижников и др. 2015; Otzen and Reik, 2019). Функциональные амилоиды обнаружены почти во всех основных систематических группах организмов. Функциональные амилоиды участвуют в следующих процессах: формирование биопленок у бактерий (Taglialegna et al., 2016), регуляция биогенеза и структуры клеточной стенки у дрожжей (Kalebina et al., 2008; Sergeeva et al., 2019; Калебина и Рекстина, 2019), участие в контроле оогенеза и сперматогенеза у позвоночных и беспозвоночных животных (Hewetson et al., 2017), регуляция долговременной памяти (Majumdar et al., 2012), контроль полимеризации меланина у животных (Watt et al., 2013) и др. Следует полагать, что список функциональных амилоидов в будущем будет пополняться новыми примерами.

Матричные процессы I и II рода протекают в клетках параллельно, а значит, неизбежно должны взаимодействовать между собой. Влияние линейных МП I на пространственную структуру белков известно: пространственная структура белковых молекул предопределена преимущественно линейной последовательностью аминокислот, которая закодирована в виде последовательности азотистых оснований в кодирующем этот белок гене. Влияние же пространственных МП (МП II) на линейные МП (МП I) изучено не так хорошо, но о существовании такого влияния свидетельствует ряд фактов. Многие прионы дрожжей являются факторами транскрипции или трансляции. Кроме того, к настоящему времени в литературе накопилось достаточно данных, указывающих на то, что амилоиды прямо или косвенно способны оказывать влияние на процессы, участвующие в поддержании стабильности генома (Andreychuk et al., 2020).

Из литературы известно, что при некоторых амилоидных заболеваниях в клетках пациентов возрастает частота различных типов изменений ДНК. Например, в мозге людей, страдавших при жизни БА, обнаружены окислительные повреждения ДНК, одно- и двунитевые разрывы ДНК, повышена частота клеток с анеуплоидным и полиплоидным набором хромосом,

повышена частота клеток с признаками нарушения клеточного цикла. Известно, что некоторые амилоидные белки могут связываться с компонентами цитоскелета, что, вероятно, может приводить к нарушению расхождения хромосом в митозе (Nieznanski et al., 2006; Dong et al., 2008).

Существуют данные, указывающие на связь амилоидогенеза с развитием раковых опухолей. Раковые заболевания так же, как и нейродегенеративные амилоидные заболевания ассоциированы с возрастом. Неотъемлемым признаком раковых заболеваний является повышение уровня дестабилизации генома, и как следствие повышение синтеза aberrantных белков и нарушение механизма гомеостаза протеома. Кроме того, описано непосредственное участие амилоидных белков в развитии раковых заболеваний (Navalkar et al., 2022). Так, некоторые мутации в гене, кодирующем белок p53, приводят к появлению мутантных белков с амилоидными свойствами, что ведёт к развитию рака у носителей такой мутации, а также в экспериментах *in vivo* было показано, что синтез фрагментов белка p53 дикого типа приводит к образованию амилоидного белка, влияющего на экспрессию генов, находящихся под промотором p53-индуцируемого гена (Navalkar et al., 2021). Амилоидные свойства также показаны для белка Rad51, одного из ключевых белков, участвующих в гомологичной рекомбинации и устранении двунитевых разрывов ДНК (Kachkin et al., 2022). Эти факты указывают на несомненную связь между механизмами поддержания стабильности генома и протеома.

Цель и задачи:

Целью работы является изучение взаимодействия амилоидогенеза белка Sup35 и механизмов, участвующих в поддержании стабильности генетического материала у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*.

В соответствии с данной целью будут решены следующие задачи:

1. Исследовать влияние прионов [*PSI*⁺] и [*PIN*⁺] на частоту возникновения генетических нарушений разных типов: генных, хромосомных и геномных мутаций.
2. Идентифицировать генетические изменения в штаммах с прионом [*PSI*⁺] и измененными параметрами мутагенеза.
3. Изучить влияние нарушений механизмов поддержания стабильности генома, индуцированных гидроксимочевинной, ингибитором синтеза предшественников ДНК, или

делецией гена рекомбинационной репарации *RAD52* на частоту прионизации Sup35 в клетках *S. cerevisiae*.

4. Оценить частоту совместного возникновения приона [*PSI*⁺] и мутаций в гене *CAN1*.
5. Определить частоту возникновения штаммов с измененным уровнем мутагенеза среди клонов [*PSI*⁺], полученных *de novo*.

Степень разработанности темы исследования

Несмотря на то, что сам факт взаимовлияния процессов мутагенеза и амилоидогенеза к настоящему времени получил экспериментальное подтверждение, механизмы, посредством которых может осуществляться взаимное влияние этих процессов друг на друга, а также их совместный вклад в контроль стабильности генома остаются невыясненными. Успешному решению этой задачи может способствовать тот факт, что в отдельности механизмы мутагенеза и амилоидогенеза исследованы довольно глубоко, особенно на модели дрожжей *S. cerevisiae*. С использованием дрожжей-сахаромицетов были детально изучены пути репарации, репликации и рекомбинации ДНК, нарушения работы которых приводят к возникновению наследуемых генных, хромосомных и геномных мутаций, а также исследованы молекулярные механизмы мутагенного действия экзогенных химических и физических факторов. Благодаря обнаружению прионов у низших эукариот, в частности у *S. cerevisiae*, у которых прионы представлены в виде нехромосомных цитоплазматических факторов, были подробно исследованы молекулярные механизмы амилоидогенеза, выявлены генетические факторы, влияющие на эффективность прионизации, а также подробно изучена структура амилоидных агрегатов. Дрожжи используют в качестве модели для изучения амилоидов млекопитающих, а также для выявления потенциальных амилоидов у других организмов и поиска антиамилоидных препаратов. Таким образом, дрожжи-сахаромицеты представляют собой удобный эукариотический модельный объект, позволяющий быстро и эффективно изучить принципиальные механизмы взаимного влияния клеточных систем, контролирующей стабильность генома и амилоидогенез.

Имеющийся методический и теоретический задел позволяет приступить к экспериментальному изучению взаимодействия амилоидогенеза и процессов, участвующих в поддержании стабильности генома.

Научная новизна

Изучение взаимодействия амилоидогенеза и процессов, участвующих в поддержании стабильности генома, находится на стадии накопления данных и формирования гипотез о возможных типах связи между нарушением гомеостаза протеома и дестабилизацией генома.

Существует ряд работ, посвященных исследованию отдельных аспектов такого взаимодействия. Примеры таких работ приведены в обзорах (Andreychuk et al., 2020 и Ainslie et al., 2021) и более подробно рассмотрены в разделе обзор литературы. Данная работа направлена на исследование тех аспектов взаимодействия амилоидогенеза и мутагенеза, которые еще не были детально изучены, в частности, на установление причинно-следственной связи между возникновением приона и генетических изменений в геноме дрожжей *S. cerevisiae*. Для этого необходимо исследовать, каким образом прионы влияют на частоту различных генетических изменений и как нарушение работы систем, участвующих в поддержании стабильности генома, влияет на частоту возникновения приона.

Научно-практическая значимость

Результаты, полученные в данной работе, имеют значение как для фундаментальной науки, так и для практических исследований в области медицины. Изучение механизмов взаимодействия МП I и II необходимы в виду важности этой проблемы для глубокого понимания механизмов наследственной и модификационной изменчивости, а также механизмов развития целого ряда социально-значимых заболеваний. К числу наиболее актуальных проблем относится вопрос о механизмах взаимовлияния мутагенеза, изменений кариотипа (анеуплоидии) и амилоидогенеза в раковых клетках, и о совместном вкладе этих процессов в “эволюцию” раковых опухолей. Во всестороннем изучении нуждаются факторы, влияющие на дестабилизацию генома на фоне амилоидогенеза белков у пациентов с БА.

Положения, выносимые на защиту

1. Частота одновременного возникновения приона [PSI^+] и генетических изменений в клетке дрожжей *S. cerevisiae* превышает теоретически ожидаемую частоту в случае их независимого появления.
2. Генетические изменения, возникающие в клетке дрожжей *S. cerevisiae* одновременно с прионом [PSI^+], представляют собой мутации разных типов: генные, хромосомные и геномные мутации.
3. Наличие в клетке дрожжей *S. cerevisiae* стабильных вариантов приона [PSI^+], наследуемых в ходе митотических делений, не влияет на стабильность генома.
4. Дестабилизация генома, вызванная нарушением рекомбинационной репарации посредством инактивации гена *RAD52* или воздействием на клетки гидроксимочевинной, не приводит к возрастанию частоты прионизации Sup35.
5. Совместное появление приона [PSI^+] и изменений генома в клетке, вероятно, опосредовано действием неизвестного фактора (предположительно окислительного

стресса), оказывающего влияние одновременно на геном и протеом клетки и стимулирующего таким образом мутагенез и амилоидогенез.

Личный вклад автора

Автор принимал непосредственное участие во всех основных этапах выполнения работы, включая планирование и выполнение экспериментов, обработку и интерпретацию результатов, написание тезисов докладов и статей. Полногеномное секвенирование геномов дрожжей было выполнено в ресурсном центре СПбГУ «Развитие молекулярных и клеточных технологий», биоинформатический анализ данных секвенирования следующего поколения и проточной цитометрии осуществила Анна Сергеевна Жук. Работа была выполнена при участии сотрудников и студентов лаборатории мутагенеза и генетической токсикологии СПб филиала ИОГен РАН: Степченковой Елены Игоревны, Задорского Сергея Павловича, Жук Анны Сергеевны, Тараховской Елены Роллановны и Богдановой Дарьи Николаевны.

Степень достоверности и апробация результатов

По теме диссертации опубликованы следующие работы в научных изданиях, отвечающих требованиям ВАК:

1. Андрейчук Ю. В., Ширяева А. А., Жук А. С., Степченкова Е. И., Инге-Вечтомов С. Г. (2015) Влияние прионизации белка Sup35 [*PSI*⁺] на частоту генетических нарушений, учитываемых в альфа-тесте у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* // *Экологическая генетика*. Т. 13, № 4, С. 22-24.
2. Андрейчук Ю. В., Задорский С. П., Жук А. С., Степченкова Е. И., Инге-Вечтомов С. Г. (2020) Связь матричных процессов I и II рода: амилоиды и стабильность генома // *Молекулярная биология*. Т. 54. № 5. С. 750-775.
3. Andreychuk Y. V., Zhuk A. S., Tarakhovskaya E. R., Inge-Vechtomov S. G., Stepchenkova E. I. (2022) Rate of spontaneous polyploidization in heterothallic yeast *Saccharomyces cerevisiae* // *Biological communications*. Vol. 67. Is. 2. P.88-96.
4. Степченкова Е. И., Андрейчук Ю. В., Афанасова Д. В., Задорский С. П., Инге-Вечтомов С. Г. (2023) NM-тест – усовершенствованная версия альфа-теста для дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, обладающая более высокой чувствительностью по отношению к генотоксическим факторам // *Генетика*. Т. 59. № 1. С. 18-25.
5. Zhuk A. S., Shiriaeva A. A., Andreychuk Y. V., Kochenova O. V., Tarakhovskaya E. R., Bure V. M., Pavlov Y. I., Inge-Vechtomov S. G., Stepchenkova E. I. (2023) Detection of primary DNA lesions by transient changes in mating behavior in yeast *Saccharomyces cerevisiae* using the alpha-test // *International Journal of Molecular Sciences*. V. 24. No. 15:12163.

Результаты работы были представлены на пяти научных конференциях:

1. Международный конгресс «VII съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров, посвященный 100-летию кафедры генетики СПбГУ, и ассоциированные симпозиумы», 18-22 июня 2019 г., Санкт-Петербург, СПбГУ.
2. VIII Всероссийский Молодежный Научный Форум «Open Science 2021», 17-19 ноября 2021г., Гатчина, ПИЯФ.
3. Всероссийская конференция по естественным и гуманитарным наукам с международным участием «Наука СПбГУ – 2021», 28 декабря 2021 г., Санкт-Петербург, СПбГУ.
4. Всероссийская конференция по естественным и гуманитарным наукам с международным участием «Наука СПбГУ – 2022», 21 ноября 2022 г., Санкт-Петербург, СПбГУ.
5. 31^я международная конференция «Генетика и молекулярная биология дрожжей» (31st International conference on yeast genetics and molecular biology - ICYGM31), 20-25 августа 2023 г., Флоренция, Италия.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Матричный принцип в биологии.

Матрицы I и II рода (линейные и пространственные матрицы)

Идея о том, что живые организмы могут происходить только от живых организмов, утвердилась в науке еще в середине XIX века, когда Рудольф Вирхов высказал свое знаменитое высказывание «*omnis cellula e cellula*», «каждая клетка от клетки» (Вирхов, 1871). В следующие десятилетия идея Вирхова о непрерывности живого получила развитие: вскоре после появления утверждения «каждая клетка от клетки», появились утверждения «каждое ядро от ядра», «каждая хромосома от хромосомы», а также «каждая митохондрия от митохондрии». В конечном итоге развитие принципа непрерывности живого закономерно привело к появлению идеи о матричном воспроизведении наследственных молекул (см. Инге-Вечтомов, 2003). Впервые матричный принцип (МП) воспроизведения хромосом был изложен Н. К. Кольцовым в 1927 г. на III-м Всесоюзном совещании зоологов, анатомов и гистологов в Ленинграде в докладе «Физико-химические основы морфологии» в виде тезиса «*omnis molecula ex molecula*» (каждая молекула от молекулы), подразумевающего, что сложные молекулы не могут появиться в клетке заново, а только при наличии уже готовой молекулы (Кольцов, 1936). Как и многие ученые того времени, Кольцов предполагал, что наследственными молекулами являются белки, а не нуклеиновые кислоты, поэтому он считал, что генетическая информация закодирована в длинной белковой молекуле наследственности – геноме, а гены представляют собой боковые аминокислотные радикалы, расположенные вдоль геномы. Также он предложил и механизм редупликации наследственной молекулы. Он предположил, что новая дочерняя наследственная молекула образуется вдоль старой молекулы путем кристаллизации вещества (консервативная модель воспроизведения), при этом боковые радикалы (гены) в новой молекуле располагаются строго в соответствии с расположением радикалов в старой молекуле. При достижении предела роста генома расщепляется продольно, таким образом при делении клетки в каждую дочернюю клетку попадают идентичные копии наследственных молекул. Несмотря на то, что гипотеза о механизме редупликации и природе наследственной молекулы Кольцова оказалась ошибочной, он предугадал основные положения, касающиеся организации и принципа воспроизведения наследственного материала, подтвержденные позднее экспериментально: гены в наследственной молекуле расположены линейно, дочерняя наследственная молекула строится на основе материнской молекулы.

К середине 40-х годов прошлого века было установлено, что наследственными молекулами, обеспечивающими непрерывность наследственной информации, служат молекулы

нуклеиновых кислот – ДНК и РНК (Avery et al., 1944), а в 1953 г. была расшифрована структура молекулы ДНК (Watson and Crick, 1953). Расшифровав структуру ДНК, Уотсон и Крик предположили и механизм воспроизводства новых молекул ДНК, поскольку матричный принцип воспроизводства наследственной молекулы подсказывала сама структура двойной спирали ДНК. Это научное открытие стало важнейшим событием не только для генетики, но и для всей биологии. С этого момента стало очевидно, что наследственность тесно связана с МП. Дальнейшие научные открытия, позволившие расшифровать генетический код и выяснить механизм синтеза белков, привели к установлению центральной роли МП (а именно МП I - репликации, транскрипции и трансляции) в хранении, передаче и реализации генетического материала (см. Инге-Вечтомов, 2015а). Роль МП I была суммирована Ф. Криком в центральной догме молекулярной биологии (Рисунок 1А) (Crick, 1958; Crick, 1970). На рисунке 1 изображены разрешённые пути передачи генетической информации: в нуклеиновых кислотах генетическая информация закодирована в виде линейной последовательности мономеров – азотистых оснований, последовательность мономеров в нуклеиновых кислотах в свою очередь кодирует линейную последовательность аминокислот в белках. Сами белки не выступают в роли линейных матриц для воспроизводства дочерних молекул. Стоит отметить, что ЦД молекулярной биологии, сформулированная Ф. Криком, постулирует, что передача генетической информации происходит строго от нуклеиновых кислот к белкам. Ф. Крик допускал существование механизма, обеспечивающего синтез белка на матрице ДНК, однако такой механизм до сих пор не найден. Под термином «передача информации» Ф. Крик имел в виду в первую очередь порядок копирования молекул, поскольку передача информации от белков к нуклеиновым кислотам существует в виде регуляции синтеза молекул (Инге-Вечтомов, 2013).

Все МП I (репликация, транскрипция, трансляция), в ходе которых происходит копирование носителей генетической информации, обладают общими характеристиками. Все МП I происходят в три этапа – инициация, элонгация (копирование) и терминация. Неотъемлемым свойством всех МП I служат их неоднозначность и возможность репарации (коррекции) поврежденных носителей информации. Впервые свойство неоднозначности МП I, а именно воспроизведение генетического материала с изменениями, было сформулировано в 30-х гг. XX в. Н. В. Тимофеевым-Ресовским в принципе «конвариантной редупликации», который был предложен для описания появления мутаций в процессе воспроизводства генетического материала (Timofeeff-Resovsky et al., 1935), а также М. Е. Лобашевым, в его физиологической гипотезе мутационного процесса, которая связала понятия «мутация» и «репарация» (Лобашев, 1947). М. Е. Лобашев рассматривал мутации как результат нетождественной репарации генов, содержащих предмутационные повреждения. Сейчас мы

знаем, что предмутационные первичные повреждения в ДНК могут приводить не только к неоднозначному копированию поврежденного участка ДНК и вызывать мутации по типу замены оснований и сдвига рамки считывания, но и превращаться в другие формы первичных повреждений, а также стимулировать рекомбинацию, и хромосомные перестройки (Chatterjee and Walker, 2017; Zhuk et al., 2023).

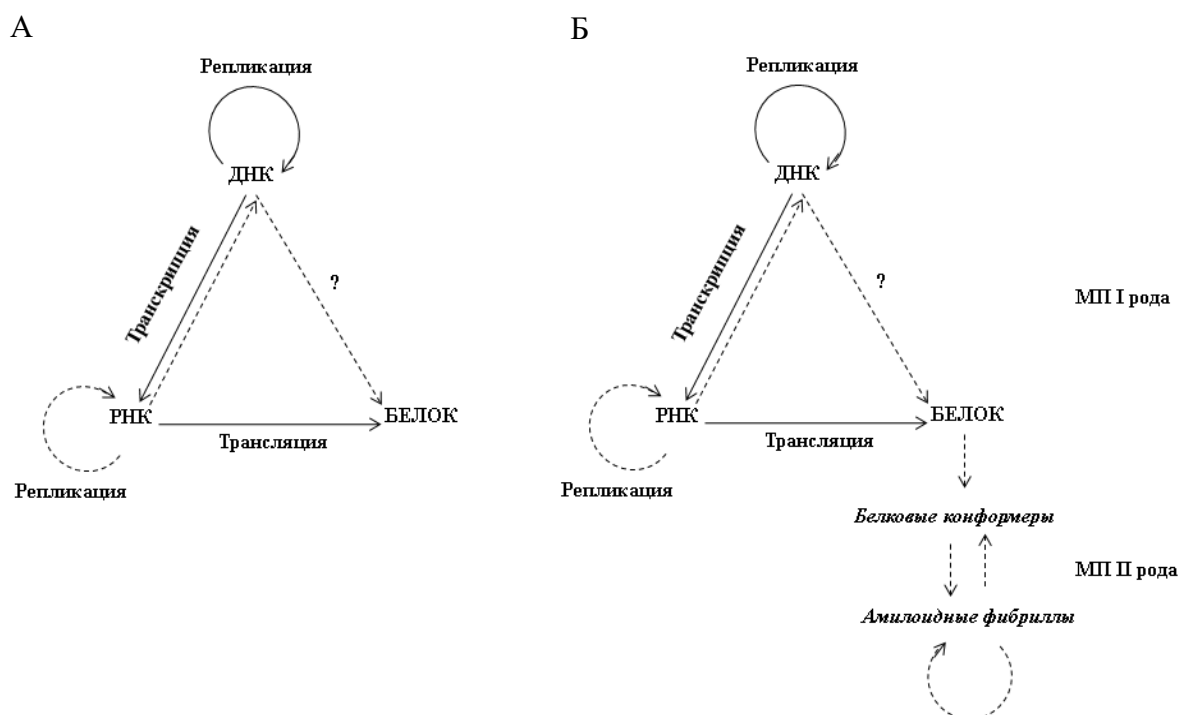


Рисунок 1 - Центральная догма молекулярной биологии (Crick, 1958, Crick, 1970) (А); соотношение МП I и II рода (Б) (см. Инге-Вечтомов, 2015b).

Неоднозначность и способность к коррекции свойственны всем МП I, они находятся под генетическим контролем, а значит, существующий уровень неоднозначности каждого МП I у живых организмов был оптимизирован в процессе эволюции. Из всех механизмов, обеспечивающих точность воспроизведения дочерних молекул в МП, наиболее изучены механизмы, обеспечивающие точность репликации. Точность синтеза ДНК обеспечивается комплексной работой нескольких механизмов: контроль концентрации и соотношения предшественников ДНК – дНТФ (дАТФ, дЦТФ, дГТФ, дТТФ) (Kumar et al., 2010); осуществление репликации ДНК репликативными ДНК-полимеразы, обладающими высокими процессивностью и точностью синтеза ДНК, и работой входящего в состав комплекса ДНК-полимеразы 3'-5'-эндонуклеазного домена, осуществляющего удаление неправильно вставленного нуклеотида (Bebenek and Ziuzia-Graczyk, 2018); пострепликативное удаление неспаренных оснований (mismatch repair – MMR) (Kunkel and Erie, 2015). Благодаря слаженной

работе этих механизмов частота ошибок при репликации ДНК составляет примерно 1×10^{-9} на каждое деление клетки на одно основание. Мутации в генах, кодирующих ферменты репликации, часто обладают мутаторным фенотипом. В лабораторных условиях получают также мутантов со сниженной частотой мутагенеза (Schaarper, 1998), что свидетельствует о том, что высокая физиологическая точность репликации ДНК не является максимально возможной. Таким образом, спонтанный уровень мутагенеза представляет собой оптимальную частоту появления новых вариантов генов, из которых затем в результате естественного отбора закрепляются варианты, повышающие общую приспособленность популяции, и устраняются варианты, снижающие приспособленность.

На фоне господства ЦД молекулярной биологии, устанавливающей роль нуклеиновых кислот в наследственности, идея о белковой природе инфекционного агента, вызывающего губчатые энцефалопатии у человека и других млекопитающих, была немыслимой, поэтому для объяснения инфекционной природы этих заболеваний была предложена гипотеза «медленных вирусов» (Sigurdsson, 1954). Губчатые энцефалопатии, такие как болезнь скрепи у овец, болезни куру, БКЯ и БГШШ у человека имеют ряд сходных черт: поражение нервной системы, длительный инкубационный период, отсутствие воспалительных процессов, характерных для вирусных заболеваний, присутствие в пораженных тканях белковых тяжей. Длительное время не удавалось выделить инфекционный агент нуклеиновой природы, кроме того, инфекционные частицы обладали устойчивостью к повреждающим ДНК агентам, таким как УФ и ионизирующее излучение, в то время как белки устойчивы к воздействию этих факторов (Prusiner, 1982a). В 1982 году Стэнли Прузинер привел доказательства белковой природы инфекционного агента и предложил гипотезу «только белок», а также ввел термин прион (**Proteiinatious infection») для обозначения белковых инфекционных частиц (Prusiner, 1982b). В ходе длительных исследований, удалось определить, что все эти инфекции вызваны именно белковыми частицами, за что в 1997 г. Прузинер был удостоен Нобелевской премии (Prusiner, 1998).**

Прузинеру удалось выделить инфекционный белок PrP (от **prion protein), основной компонент белковых тяжей в пораженных тканях мозга, и описать его свойства. Оказалось, что инфекцию вызывает особая обогащенная β -слоями инфекционная форма этого белка PrP^{sc} (**scrapi), которая, в отличие от растворимой формы белка PrP^c (**cell), образует нерастворимые агрегаты. В присутствии инфекционной молекулы PrP^{sc} растворимые клеточные молекулы белка PrP^c претерпевают конформационные изменения, превращаясь в новые молекулы PrP^{sc}. Таким образом, инфекционные молекулы PrP^{sc} являются матрицами для воспроизводства новых инфекционных молекул из уже существующих молекул PrP^c. Переход из растворимой формы******

белка в инфекционную осуществляется за счет изменения пространственной структуры молекулы без изменения аминокислотной последовательности.

Открытие прионов и связанного с ними явления белковой наследственности, привело к необходимости добавить в ЦД МП II рода (Рисунок 1Б) – оперирующих не с линейными, а с пространственными (белковыми) матрицами (Инге-Вечтомов, 2003). Следует отметить, что существование белковых матриц не нарушает ЦД молекулярной биологии, поскольку такие пространственные матрицы передают информацию о пространственной структуре уже существующим молекулам белка.

В прионизованной форме белок полимеризуется и образует амилоидные агрегаты (Рисунок 2). Такие амилоидные агрегаты обладают особой упорядоченной структурой: прионизованные молекулы мономеров расположены в линейной полимерной фибрилле так, что β -слои, входящие в состав молекул, направлены перпендикулярно к оси фибриллы (Рисунок 3) (Sawaya et al., 2007). Такие полимеры при фрагментации образуют новые центры полимеризации, что лежит в основе инфекционных свойств таких амилоидов – прионов. Схожие структуры образуют не обладающие инфекционными свойствами амилоиды.

Здесь хочется снова вспомнить Кольцова и предложенный им принцип воспроизводства наследственных молекул (Кольцов, 1936). Кольцов предполагал, что наследственная молекула имеет белковую природу, а редупликация происходит путем кристаллизации вещества вокруг молекулы наследственности, при этом необходимым условием для редупликации является наличие затравки. Несмотря на то, что реальный механизм воспроизводства ДНК оказался другим, предположенный Кольцовым механизм редупликации подходит для описания способа воспроизводства новых амилоидных молекул в МП II рода.

Основные характеристики МП I рода справедливы и для МП II рода. Жизненный цикл амилоидных агрегатов можно условно разделить на три стадии: инициация – образование затравки, элонгация – рост амилоидных агрегатов за счёт присоединения новых мономеров, и терминация – формирование зрелой фибриллы. МП II обладают также и своеобразными неоднозначностью и способностью к коррекции (Инге-Вечтомов, 2015b). Неоднозначность МП II проявляется в том, что один белок может быть представлен в виде различающихся по пространственной структуре вариантов (штаммов) укладки входящих в амилоидные агрегаты молекул. Даже в одной клетке амилоид может существовать в виде нескольких конформеров (Bateman and Wickner, 2013; Bartz, 2016), как правило только один из конформеров является доминирующим (коррекция), по-видимому, в клетках большую роль в этих процессах играют

шапероны, отвечающие за формирование и воспроизведение конформеров белков, образующих амилоиды (Borchsenius et al., 2006; Matveenko et al., 2018; Barbitoff et al., 2017), поскольку искусственно синтезированные пептиды *in vitro* формируют гораздо более широкий спектр вариантов укладки, чем количество вариантов, формируемых *in vivo* (Shoup and Priola, 2023).

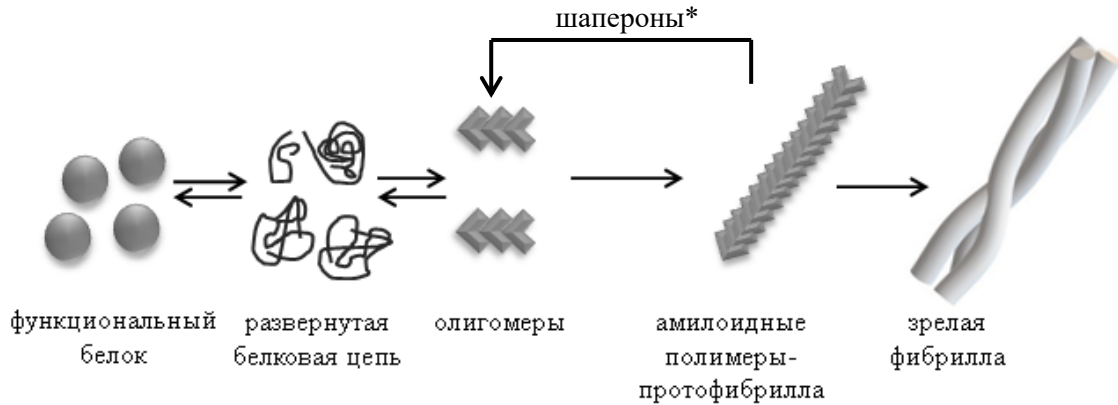


Рисунок 2 – Схема формирования амилоидных агрегатов из растворимого белка. (Andreychuk et al., 2020)

* - дробление амилоидной фибриллы обеспечивает формирование новых центров полимеризации и обуславливает инфекционные свойства прионов, участие шаперонов в этом процессе показано только для прионов дрожжей.

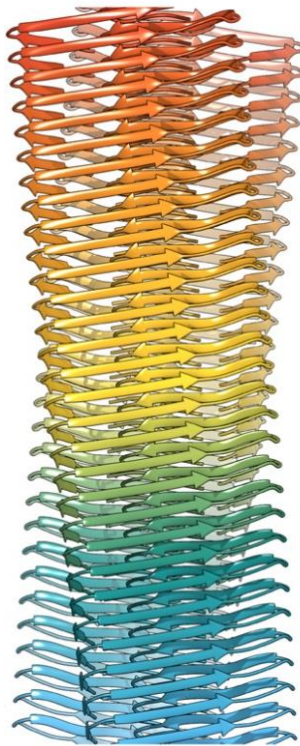


Рисунок 3 – Модель амилоидной фибриллы согласно результатам криоэлектронной микроскопии (Gremer et al., 2017). Молекулы белка, обогащенные β – слоями, соединены между собой водородными связями.

Очевидно, что МП I и II рода неизбежно должны взаимодействовать между собой. Например, по результатам биоинформатического анализа у эукариот среди белков, содержащих амилоидогенные домены, преобладают РНК- или ДНК-связывающие белки, выполняющие функции факторов транскрипции и трансляции (Angarica et al., 2013).

1.2 Амилоиды и прионы

Амилоиды – белковые фибриллярные агрегаты, состоящие из множества соединённых между собой водородными связями белковых молекул и обладающие особой кросс-β структурой. Исторически амилоидами называли крахмалсодержащие структуры, окрашиваемые йодом, в норме присутствующие в клетках растений. Позднее Рудольф Вирхов применял этот термин для описания некоторых аномальных структур тканей, также окрашиваемых йодом, ошибочно полагая, что эти структуры состоят из крахмалоподобного вещества. Впоследствии было показано, что патологические отложения в тканях состоят из специфических белков, а окраска йодом обусловлена присутствием в отложениях протеогликанов и глюкозаминогликанов (см. обзор Нижников и др., 2015). Согласно современным представлениям, амилоидные агрегаты – это упорядоченные белковые структуры, представляющие собой агрегаты, обогащенные β-слоями. Амилоидные полимеры растут за счёт присоединения к амилоидному олигомеру новых молекул белка, которые изменяют свою конформацию в соответствии с конформацией мономеров в составе амилоидного олигомера. Растущие амилоидные полимеры объединяются в фибриллы и крупные нерастворимые амилоидные агрегаты диаметром 7-10 нанометров и до нескольких микрометров в длину. Амилоидные агрегаты имеют упорядоченную структуру благодаря межмолекулярным водородным связям, возникающим между одними и теми же последовательностями взаимодействующих мономеров (Kajava et al., 2010). Благодаря своей упорядоченной структуре амилоидные агрегаты устойчивы к ионным детергентам, такими как додецилсульфат натрия (sodium dodecyl sulfate, SDS), протеазам, действию повышенных температур и др. воздействиям (см. Нижников и др., 2015; Bleem and Daggett, 2017).

Появление методов электронной микроскопии во второй половине 20-го века дало толчок к изучению структуры и биохимических особенностей амилоидов. Амилоиды окрашиваются амилоид-специфическими красителями (Bennhold, 1922), в частности, анилиновым красителем Конго красным (CR – Congo Red). Результатом связывания амилоидов с CR является двойное лучепреломление в поляризованном свете, дающее в зависимости от свойств фибрилл свечение различных цветов (синее, зеленое, желтое, красное и др.) (Howie, 2019; Yakupova et al., 2019). Другими специфическими к амилоидным фибриллам красителями являются флуоресцентные

красители тиофлавин-Г и тиофлавин-С. При связывании тиофлавина-Г с амилоидными фибриллами происходит смещение спектра излучения в красную область, а в случае тиофлавина-С происходит усиление флуоресценции в зелёной области без сдвига спектра (LeVine, 1999).

Методы изучения амилоидов развиваются и совершенствуются. Хотя раньше амилоиды, как правило, обнаруживали случайно, сейчас широко применяют методы компьютерного предсказания амилоидных свойств белков на основе аминокислотной последовательности, а недавно были разработаны методы выявления амилоидов *in vivo* в масштабе протеома (Ryzhova et al., 2018; Chandramowlishwaran et al., 2018).

Некоторые амилоиды способны стабильно поддерживаться в ходе клеточных делений, что обусловлено дроблением амилоидных агрегатов на олигомеры, которые служат центрами образования (так называемые «затравки», или «семена») новых амилоидных агрегатов. Такие амилоиды обладают инфекционными свойствами и относятся к прионами (Галкин и др., 2018).

Процесс размножения (дробления) прионных агрегатов подробно изучен у *S. cerevisiae*. Ключевую роль в этом процессе играют шапероны (система Hsp104/Hsp70/Hsp40), преимущественно дезагрегаза – шаперон Hsp104 (Kushnirov and Ter-Avanesyan, 1998). При делеции гена *HSP104* дробление амилоидных полимеров и образование инфекционных «затравок» невозможно, поэтому прионы теряются после нескольких делений дрожжевой клетки (Chernoff et al., 1995; Kushnirov and Ter-Avanesyan, 1998; Liebman and Chernoff, 2012). Различные варианты приона [*PSI*⁺], в отличие от остальных дрожжевых прионов, эффективно элиминируются также при сверхпродукции Hsp104 (Chernoff et al., 1995), так как при сверхпродукции Hsp104 эффективно разбирает амилоидные агрегаты, но не амилоидные фибриллы (Kushnirov et al., 2021). В случае неинфекционных амилоидов происходит только образование амилоидных агрегатов *de novo* и их рост, при этом фрагментации амилоидных фибрилл и образования из них новых «затравок», способных осуществлять инфекцию, не происходит.

С момента открытия явления белковой наследственности и амилоидов, интенсивно ведутся исследования, направленные на выявление факторов, предопределяющих способность белков к формированию амилоидных агрегатов. Накопление экспериментальных данных позволило определить, что вклад в амилоидогенез белков вносят не только аминокислотная последовательность самих белков, но и внешние факторы, такие как физико-химические параметры среды, и функционирование специальных молекулярных систем, отслеживающих правильную укладку белков (Tyedmers et al., 2010; Houck and Cyr, 2012).

Известно, что пространственная структура белков главным образом зависит от аминокислотной последовательности, например, некоторые аминокислоты более характерны для α -спиралей, другие аминокислоты более представлены в β -слоях (Fujiwara et al., 2012). Амилоидогенезу подвержены белки, в состав которых входят специфические амилоидогенные домены, у дрожжей эти домены как правило обогащены глутаминовыми и аспарагиновыми аминокислотными остатками (Chiti and Dobson, 2006). Хотя эти амилоидогенные домены у различных белков не являются гомологичными, они имеют ряд общих характеристик, благодаря чему удалось создать биоинформатические алгоритмы, позволяющие предсказывать амилоидные свойства белков (Sarkar and Dubey, 2012), к сожалению, эти алгоритмы применимы для только в отношении коротких полипептидов *in vitro*, тогда как предсказывать с их помощью амилоидные свойства полноразмерных белков *in vivo* нужно с осторожностью. В дальнейшем было обнаружено, что для амилоидогенеза недостаточно наличия амилоидогенного домена, имеет значение также контекст, а именно в каком положении находятся амилоидогенные последовательности – экспонированы на поверхности или расположены внутри молекулы белка; также важны соседние аминокислотные последовательности: неструктурированные пептидные участки способствуют амилоидогенезу (Belli et al., 2011), тогда как наличие стабилизирующих пространственную структуру молекулы ковалентных и водородных внутримолекулярных связей препятствует переходу α -спиралей или неорганизованных участков молекулы в β -слои (Chiti and Dobson, 2006).

Согласно К. М. Добсону практически любые белки, содержащие β -слои, при определенных физико-химических условиях способны к переходу в амилоидное состояние (Dobson, 2003). В живых организмах агрегации белков препятствуют физиологические условия внутриклеточной и межклеточной среды, а также существование специальных молекулярных систем, защищающих клетки от нежелательных белковых агрегатов (например, шапероны, системы протеасомной деградации, аутофагии и др.) (см. Tyedmers et al., 2010; Houck and Cyr, 2012). С возрастом эффективность работы этих систем снижается, что приводит к повышению вероятности агрегации различных белков.

Известно примерно 70 тяжелых заболеваний человека и других млекопитающих, при которых обнаружено образование белковых патологических амилоидных структур, среди них неизлечимые нейродегенеративные болезнь Альцгеймера (БА), болезнь Паркинсона БП (БП), болезнь Хантингтона (БХ) и др. (Picken, 2020). Одно из экзотических заболеваний у людей, вызванных прионом, было описано в 1950-х гг. среди аборигенов Папуа-Новой Гвинеи в племени Форе и родственных им племенах (см. Lindenbaum, 2015). Местные племена называли это заболевание куру, что переводится как трясучка или лихорадка. У заболевших куру возникали

непроизвольные движения, неконтролируемые приступы смеха, с развитием заболевания они теряли возможность ходить, а затем сидеть, и неминуемо погибали в течение года после проявления первых признаков болезни (Gajdusek, 1963). Ткани мозга умерших от куру людей имели губчатую структуру, кроме того, в препаратах были обнаружены специфические бляшки. В 1966 г. Гайдушеку удалось инфицировать двух шимпанзе материалом, полученным от умерших от куру людей, и доказать инфекционную природу заболевания (Gajdusek et al., 1966). Два года спустя была показана инфекционность болезни Кройцфельда-Якоба, еще одного заболевания, при котором развивается губчатая энцефалопатия (Gibbs et al., 1968).

Сейчас считается, что куру впервые появилось у одного из членов племени примерно в 1900 г., у которого спонтанно возникла БКЯ, а затем распространилась благодаря практике ритуального каннибализма, при котором члены племени поедают останки умершего родственника. После 1950-х годов с искоренением каннибализма, заболеваемость снизилась, и куру исчезла (Libersky et al., 2019).

В 1959 году Уильям Хадлоу высказал предположение, что куру имеет ту же природу, что и заболевание скрепи, или почесуха, у овец и коз, известное в Англии с 18 века (Gajdusek, 1962; Prusiner, 1984; Liberski et al., 2019). Больные скрепи животные испытывают сильный кожный зуд, повышенную возбудимость, паралич, истощение (Prusiner, 1984). К губчатым энцефалопатиям также относятся БГШШ, СФБ у людей и сходные заболевания животных – коров, овец, коз, оленей, мышей, хомяков, норок и т.д. (по: Prusiner and Scott, 1997), а также «коровье бешенство», или губчатая энцефалопатия крупного рогатого скота (BSE от **b**ovine **s**pongiform **e**ncephalopathy) (Prusiner, 2001). Последнее имеет особое значение, поскольку употребление в пищу говядины, заражённой «коровьим бешенством», явилось причиной вспышки БКЯ у жителей Великобритании, пик которой пришелся на 2000 г. (Geschwind, 2015).

Инфекционным агентом всех перечисленных заболеваний является особая форма белка PrP – PrP^{Sc} (Prusiner, 1989). PrP синтезируется во многих клетках, таких как нейроны, гладкие мышечные клетки кровеносных сосудов, моноциты и лимфоциты, островковые клетки поджелудочной железы, и практически не синтезируется в печени и почках (Yang et al., 2017). Функция PrP до конца не установлена, по-видимому он участвует в развитии нейронов и поддержании миелиновых оболочек (Bremer, 2009). Образование приона PrP^{Sc} чаще всего происходит спонтанно, но некоторые мутации в гене *PRNP* увеличивают вероятность перехода PrP в прионную форму, что обуславливает наследственную предрасположенность к прионным заболеваниям (Geschwind, 2015).

Помимо патологических амилоидов, вовлеченных в развитие заболеваний, существуют также и функциональные амилоиды – белки, которые осуществляют свою физиологическую функцию в амилоидизированном виде. Благодаря упорядоченной структуре и устойчивости к разнообразным агентам амилоиды способны выполнять изолирующую, запасающую, сигнальную и другие функции (см. Sergeeva and Galkin, 2020).

1.3 Прионы низших эукариот

PrP^{sc} – это единственный известный прион млекопитающих, для которого показана передача естественным путем. Инфекционные свойства амилоидов были показаны экспериментально у α -синуклеина (Luk et al., 2012) и гиперфосфорилированного тау-белка (Clavaguera et al., 2009). Остальные прионы обнаружены у низших эукариот (дрожжей и других грибов) (Таблица 1). У низших эукариот прионы являются цитоплазматическими наследственными факторами, их можно передать в штамм без приона цитодукцией или с помощью трансформации клеток лизатом, полученным из штамма с прионом (инфекционные свойства).

Первым прионом, обнаруженным у дрожжей, стал открытый в 1965 г. Брайаном Коксом нехромосомный наследственный детерминант [*PSI*⁺] (тот факт, что детерминант [*PSI*⁺] является прионом было показано значительно позднее (Wickner, 1994)). Наличие в клетке [*PSI*⁺] повышает эффективность прочтения СТОП-кодонов (терминаторов трансляции в мРНК) как значащих, что приводит к нонсенс-супрессии или повышению ее эффективности (Сох, 1965; Liebman and Sherman, 1979). Позже был обнаружен другой нехромосомный наследственный детерминант – [*URE3*], благодаря которому дрожжевые клетки могут поглощать уреидосукцинат из среды, что позволяет мутантам *ure2*, неспособным синтезировать данный интермедиат, расти на среде с уреидосукцинатом (Lacroute, 1971). Дальнейшие исследования показали, что [*URE3*] и [*PSI*⁺] – прионные формы белков Ure2 и Sup35, соответственно (Wickner, 1994).

Позднее при получении штаммов дрожжей с прионом [*PSI*⁺] *de novo* был обнаружен прион [*PIN*⁺] (от [*PSI*⁺] **in**ducibility) (Derkatch et al., 1997), необходимый для образования приона [*PSI*⁺], а затем и кодирующий его ген *RNQ1* (Sondheimer and Lindquist, 2000). Делеция гена *RNQ1* не имеет фенотипического проявления, его функция не выяснена. В 2008 г. был обнаружен прион [*SWI*⁺], структурный ген которого *SWI1* кодирует транскрипционный фактор, компонент хроматин-ремодулирующего комплекса SWI/SNF, который регулирует экспрессию примерно 6% генов дрожжей; клетки с прионом [*SWI*⁺] плохо растут на среде с ферментируемыми

источниками углерода: глицерине, галактозе, раффинозе, и т.д. (Du et al., 2008). Все перечисленные прионы обладают прионогенным доменом, обогащенным глутамином (Q) и аспарагином (N).

Целенаправленный поиск прионных детерминантов в 2000-2010-х привел к открытию ряда прионов: [*MOD*⁺], [*MOT3*⁺], [*OCT*⁺], [*NUP100*⁺], [*LSB*⁺]. Прион [*MOD*⁺], или прионизованный белок Mod5, — это тРНК-изопентилтрансфераза. При прионизации Mod5 повышается уровень эргостерола, благодаря чему клетки дрожжей становятся устойчивыми к антигрибковым препаратам, таким как флуконазол или клотримазол. Фактор [*MOD*⁺] оказался первым прионом, который не содержал обогащенный QN-прионизирующий домен. Белок Mot3 – еще один транскрипционный фактор, способный прионизоваться, регулирует гены, выполняющие разнообразные функции: гены, активирующиеся в условиях гипоксии, регулирующие синтез эргостерола, вовлеченные в проведение феромонального сигнала и стресс-ответ (Grishin et al., 1998; Montañes et al., 2011; Martines-Montañes et al., 2013). Прион [*MOT3*⁺] индуцируется в присутствии этанола и теряется в анаэробных условиях. При прионизации Mot3 у штаммов *FLO11* индуцируется флокуляция и инвазивный рост, кроме того, изменяется внешний вид колоний (Holmes et al., 2013). Белок Cus8 формирует прион [*OCT*⁺], этот прион был обнаружен при скрининге генов, сверхэкспрессия которых индуцирует прионизацию *Sup35 de novo*. Cus8 в комплексе с Tup1, репрессирует экспрессию примерно 7% генов дрожжей. Клетки дрожжей [*OCT*⁺] могут использовать лактат в качестве единственного источника углерода на фоне делеции гена *CYC1* (Patel et al., 2009). Прион [*LSB*⁺] тоже индуцирует образование [*PSI*⁺] и по фенотипическому проявлению сходен с [*PIN*⁺] (Chernova et al., 2011). Прион [*NUP100*⁺] был обнаружен при проверке амилоидных свойств потенциальных амилоидных белков, входящих в состав комплексов ядерной поры (Halfmann et al., 2012).

Согласно определению Стенли Прузинера, прионы — это инфекционные белковые частицы. Это определение не постулирует, что при прионизации молекула белка непременно должна менять свою пространственную конформацию. В соответствии с этим, нельзя утверждать, что амилоидизация – единственно возможный механизм белковой наследственности. В 2003 г. Робертс и Викнер описали альтернативный механизм воспроизведения приона (Roberts and Wickner, 2003). Вакуолярная протеаза В синтезируется в виде длинной неактивной молекулы, ее активация происходит после разрезания молекулы при участии активной молекулы протеиназы PrV или приона [β], таким образом поддержание приона [β] осуществляется автокаталитически и не связано с образованием амилоидных агрегатов.

Кроме перечисленных прионов у *S. cerevisiae* было обнаружено 46 детерминантов, обладающих свойствами прионов, но не образующих амилоиды (Chakrabortee et al., 2016a). Поскольку механизм передачи прионного статуса у этих белков еще недостаточно изучен, мы не будем их подробно рассматривать, отметим лишь, что и среди этих детерминантов встречаются факторы МП I. Например, белки Azf1, Ash1, Rlm1 и Haa1 – транскрипционные факторы, Mph1 – 3'-5'-хеликаза, которая необходима для правильной работы механизмов рекомбинационной репарации, а также синтеза ДНК в обход повреждений, Pbp2 – РНК-связывающий фактор, участвующий в поддержании стабильности теломер, Vts1, также известный как [SMAUG⁺] (Chakravarty et al., 2019), участвует в деградации мРНК, Rbs1 необходим для сборки комплекса РНК-полимеразы III.

Прионы обнаружены и у мицелиального гриба *Podospora anserina*. Один из прионов это амилоидогенный прион [*Het-s*], участвующий в вегетативной несовместимости (Coustou et al., 1997). Другой обнаруженный у *P. anserina* прион – прион *C*, структурный белок которого PaASK1 является компонентом сигнального MAP-киназного каскада MAPKKK, фенотипически прион *C* проявляется как дефекты растущей гифы, штаммы несущие прион *C*, обладают характерным CG-фенотипом (от англ. crippled grow). Механизм распространения приона *C* напоминает механизм передачи приона [β], его появление обусловлено автокаталитическим процессингом молекулы PaASK1 (Haedens et al., 2005).

Таблица 1 - Инфекционные амилоиды (прионы) низших эукариот (Andreychuk et al., 2020).

Прион структурный белок	Функция белка в норме	Фенотипическое проявление приона	Организм	Источник
[<i>PSI</i> ⁺] / Sup35	Фактор терминации трансляции	Супрессия нонсенс-мутаций	<i>S. cerevisiae</i>	Cox, 1965
[<i>URE3</i>] / Ure2	Регулятор катаболизма азота	Усвоение бедных источников азота в присутствии богатых	<i>S. cerevisiae</i>	Lacroute, 1971; Chen et al., 2011
[<i>PIN</i> ⁺] / Rnq1	Неизвестна	Индукция [<i>PSI</i> ⁺] и других дрожжевых прионов <i>de novo</i>	<i>S. cerevisiae</i>	Derkatch et al., 1997; Sondheimer and Lindquist, 2000
[<i>SWI</i> ⁺] / Swi1	Субъединица комплекса ремоделирования хроматина; регулятор транскрипции	Дефект роста на средах с неферментируемыми источниками углерода	<i>S. cerevisiae</i>	Du et al., 2008
[<i>Het-s</i>] / HET-s	Неизвестна	Вегетативная несовместимость	<i>P. anserina</i>	Coustou et al., 1997
[<i>MOD</i> ⁺] / Mod5	тРНК изопентенил-трансфераза	Повышенный уровень эргостерола и резистентности к противогрибковым препаратам	<i>S. cerevisiae</i>	Suzuki et al., 2012
[<i>MOT</i> ⁺] / Mot3	Регулятор транскрипции	Измененная структура клеточной стенки	<i>S. cerevisiae</i>	Alberti et al., 2009
[<i>OCT</i> ⁺] / Cys8	Субъединица транскрипционного репрессора	Способность к росту на средах с неферментируемыми источниками углерода в штаммах с делецией гена <i>CYC1</i> ; дефект споруляции; флокуляция	<i>S. cerevisiae</i>	Patel et al., 2009
[<i>NUP100</i> ⁺] / Nup100*	Компонент ядерной поры	Индукция [<i>PSI</i> ⁺] <i>de novo</i>	<i>S. cerevisiae</i>	Halfmann et al., 2012
[<i>LSB</i> ⁺] / Lsb1	Репрессор полимеризации актина	Индукция [<i>PSI</i> ⁺] <i>de novo</i>	<i>S. cerevisiae</i>	Chernova et al., 2011

Примечание: * – образование приона [*NUP100*⁺] показано только для мутантного белка.

1.4 Функциональные амилоиды

Прионизация белков часто сопровождается изменением их функциональных свойств, что приводит к различным фенотипическим проявлениям. Как правило, при прионизации белка, клетка приобретает фенотип, характерный для мутанта по соответствующему гену, тем не менее, проявление делеции (инактивации) гена и прионизации его продукта практически всегда неидентичны. В ряде случаев амилоидные агрегаты могут приобретать какие-либо новые функции в клетке, что приводит к появлению нового фенотипа (Coustou et al., 1997; Derkatch et al., 1997; Derkatch et al., 2001; Malovichko et al., 2019).

Довольно долгое время изучение амилоидов было связано исключительно с заболеваниями млекопитающих, а формирование амилоидов считалось патологическим процессом. В последние годы обнаруживаются все больше белков, способных к формированию амилоидных фибрилл и не связанных с патологиями, а выполняющих свою функцию в амилоидной форме. Функциональные амилоиды обнаружены почти во всех основных группах организмов и, благодаря своим уникальным характеристикам, таким как высокое сопротивление деформации, эластичность и стабильность при экстремальных условиях, способны выполнять в организме разнообразные функции. Функциональные амилоиды участвуют в следующих процессах: формирование биопленок у бактерий (Taglialegna et al., 2016), регуляция биогенеза и структуры клеточной стенки у дрожжей и архей (Kalebina et al., 2008; Ramsook et al., 2010; Ryzhova et al., 2018; Sergeeva et al., 2019; Калебина и Рекстина, 2019; Dueholm et al., 2015), контроль сперматогенеза и оогенеза у позвоночных и беспозвоночных животных (Hewetson et al., 2017), контроль полимеризации меланина у животных (Watt et al., 2013) и др.

По-видимому, особенности пространственной организации амилоидных полимеров позволяют амилоидам выполнять структурную роль: формировать различные клеточные или внеклеточные структуры (например, защитные или изолирующие); полимеризация в виде амилоидных агрегатов может служить механизмом запасания питательных веществ или регуляции функции белка. Вместе с тем появляющиеся в последние годы данные говорят о том, что функциональные амилоидные агрегаты могут принимать непосредственное участие и в регуляции МП I. Примеры таких функциональных амилоидов представлены в таблице 2.

Таблица 2 - Примеры функциональных амилоидов и амилоидоподобных белков, регулирующих МП I (Andreychuk et al., 2020)

Амилоидный белок	Организм	Функция белка / регулируемый процесс	Источник
Rim4	<i>S. cerevisiae</i>	Трансляционный репрессор / регуляция расхождения хромосом в процессе мейоза	Berchowitz et al., 2015
Orb2	<i>D. melanogaster</i>	Трансляционный регулятор / активация трансляции мРНК в синапсах нейронов	Majumdar et al., 2012
Fxr1	<i>Rattus norvegicus</i>	Трансляционный регулятор	Sopova et al., 2019
RepA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Белок, контролирующий инициацию репликации плазмиды pPS10	Giraldo, 2007; Molina-Garcia et al., 2016
LD, FPA и FCA	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Транскрипционные факторы / регуляция индукции цветения	Chakrabortee, et al., 2016b

Существует несколько РНК-связывающих амилоидных и амилоидоподобных белков, которые регулируют трансляцию специфических РНК. Orb2 *D. melanogaster* синтезируется в синапсах нейронов и формирует амилоиды, репрессирующие трансляцию. При стимуляции нейронов этот белок переходит в мономерную форму (Majumdar et al., 2012), таким образом осуществляется регуляция долговременной памяти. У *S. cerevisiae* белок Rim4 формирует амилоидные агрегаты, репрессирующие трансляцию мРНК гена *CLB3*, кодирующего циклин, и некоторых других специфических мРНК, что определяет характер расхождения хромосом в 1 делении мейоза. При переходе ко 2-му делению мейоза агрегаты Rim4 разбираются под контролем Ime2 (Berchowitz et al., 2015). Недавно открытый амилоид млекопитающих Fxr1 (Sopova et al., 2019) регулирует трансляцию специфических мРНК в мозге млекопитающих (Vasudevan et al., 2007; Majumder et al., 2016). Амилоидоподобные свойства показаны для ряда транскрипционных факторов *A. thaliana*, участвующих в регуляции индукции цветения (Chakrabortee et al., 2016b; см. Antonets and Nizhnikov, 2017). Многие РНК-связывающие белки различных организмов содержат домены, богатые аспарагином и глутамином, что указывает на их потенциальную склонность к амилоидогенезу, поэтому многие из них могут оказаться функциональными амилоидами (Harrison and Shorter, 2017).

Роль функциональных амилоидов показана и в контроле репликации ДНК, что непосредственно влияет на стабильность генома. Так, белок RepA бактерии *Pseudomonas aeruginosa*, кодируемый геном в составе плазмидного репликона pPS10, участвует в контроле инициации репликации этой плазмиды. Разные формы RepA – мономеры и амилоидные агрегаты – осуществляют противоположные функции в данном процессе. Мономеры связываются со специфическими повторами ДНК в ориджине репликации (итеронами) и иницируют репликацию плазмиды. После инициации репликации взаимодействие RepA с итеронами индуцирует сборку амилоидных олигомеров RepA, которые прочно связывают между собой две синтезированные копии pPS10 в области ориджина репликации и репрессируют инициацию репликации в этой области до начала нового раунда репликации (Giraldo, 2007; Molina-Garcia et al., 2016). В связи с бурным развитием исследований по идентификации новых амилоидных белков стоит ожидать роста числа открытий в этой области.

1.5 Объекты и модели изучения взаимодействия амилоидогенеза и процессов, участвующих в контроле стабильности генома

Литературные данные указывают на возможность взаимодействия амилоидов с факторами, которые принимают участие в возникновении мутаций всех трех типов: геномных, хромосомных и генных. Можно предположить, что амилоиды способны влиять на стабильность генома на разных этапах становления мутаций (стадии возникновения повреждений генетического материала и репарации поврежденной ДНК) посредством модификации точности репликации или трансляции, а также нарушая процессы рекомбинации и сегрегации хромосом. Некоторые из этих предположений уже получили экспериментальное подтверждение.

Большой объем экспериментальных данных по проблеме влияния амилоидогенеза на механизмы поддержания стабильности генома был получен при изучении клеток и тканей человека с амилоидными заболеваниями, а также при использовании животных и клеточных моделей нейродегенеративных амилоидозов. У пациентов с нейродегенеративными амилоидозами в пораженных тканях мозга обнаружена повышенная частота клеток с отклонениями от нормального набора хромосом, повышенный уровень окислительных повреждений ДНК как в ядрах, так и в митохондриях, кроме того, в нейронах, которые в норме являются неделяющимися клетками, зафиксирована аномальная активация клеточного цикла (Madabhushi et al., 2014; Lin et al., 2020) (Таблица 3).

По сравнению с мозгом здоровых людей в мозге людей с БА в 10 раз чаще встречаются клетки с одной или тремя 21 хромосомами (Migliore et al., 1999). Кроме того, отклонения от

нормального набора хромосом при БА включают как гипер-, так и гипоплоидию по 13, 18 и 17 хромосомам (Migliore et al., 2001). У женщин с БА в 2 раза увеличена частота клеток с лишней X-хромосомой. Кроме того, при анализе фибробластов и лимфоцитов у людей с БА было обнаружено увеличение частоты клеток с микроядрами (Tirri et al., 2001). Микроядра образуются из фрагментов хромосом, которые при расхождении хромосом в митозе не попали в ядро, такие фрагменты образуются в результате разрывов хромосом (в этом случае фрагменты ДНК не содержат центромеры) или в результате нарушения прикрепления микротрубочек веретена деления к центромере хромосомы (в таком случае микроядра содержат центромерную ДНК, которую можно обнаружить с помощью ДНК-зондов).

Таблица 3 - Нарушения генетического материала, выявляемые в тканях пациентов с амилоидными заболеваниями (Andreychuk et al., 2020)

Тип повреждения генетического материала	Амилоидные заболевания, при которых обнаружены повреждения
Изменение набора хромосом	БА – увеличение доли клеток с дополнительными 21, 17, 18, X-хромосомами
Повышенная частота образования микроядер в периферических тканях	БА – микроядра содержат участки центромерной ДНК и образуются в результате неправильного расхождения целых хромосом БП – микроядра не содержат центромерную ДНК, образуются преимущественно в результате поломок хромосом
Окислительные повреждения ядерной и мтДНК	БА, БП, АЛС, БХ
Окислительные повреждения РНК	БА, БП – в клетках мозга и крови
Одно- и двунитевые разрывы ДНК	БА, АЛС
Делеции и точковые мутации митохондриальной ДНК нейронов	БА, БП, АЛС

При БП в лейкоцитах также повышена частота образования микроядер. Кроме того, в них обнаружена значительная доля микроядер, содержащих ацентрические фрагменты ДНК. С помощью метода комет у людей с БП обнаружено значительное накопление двунитевых разрывов ДНК в клетках нескольких участков мозга (Hedge et al., 2006). Таким образом, дестабилизация генома в клетках пациентов с амилоидными нейродегенеративными заболеваниями указывает на то, что на фоне амилоидизации, по крайней мере, некоторых белков происходит нарушение МП I.

При нейродегенеративных заболеваниях в нейронах обнаруживают накопление огромного количества окислительных повреждений, индуцированных активными формами кислорода (АФК). АФК повреждают различные клеточные компоненты: липиды мембран, нуклеиновые кислоты, белки. При повреждении ДНК и растворимых нуклеотидов активными формами кислорода образуется около 20 различных окисленных продуктов, наиболее частыми из которых является 8-гидроксигуанин (8-OHG) и его производное 8-гидрокси-2'-дезоксигуанин (8-OHdG), по наличию которых определяют уровень окислительного стресса. В мозге людей, страдавших при жизни БА, было обнаружено увеличение уровня окисленных продуктов: 8-OHG, 8-гидроксиаденина, 5-гидроксицитозина и 5-гидроксиурацила (Cioffi et al., 2021). При БА окислительному повреждению подвергаются также рибонуклеиновые кислоты. Показано, что 30-70% мРНК, выделенных из мозга людей с БА, содержат окисленные основания, тогда как в контроле доля окисленных мРНК составила 2% (Nunomura et al., 2006). В нейронах людей с БА обнаружено 3-кратное увеличение содержания 8-OHdG в мтДНК (Mecocci et al. 1994). При БА в мозге обнаружено также 2-кратное увеличение содержания двунитевых разрывов ДНК (Mullaart et al., 1990).

Повышение уровня окислительного стресса и увеличение числа повреждений ядерной и мтДНК обнаружены и в мозге людей с БП. В тканях мозга людей с БП, обнаружено увеличение количества 8-OHdG по сравнению с контрольными образцами, причем наибольшая его концентрация зафиксирована в черной субстанции – участке мозга, поврежденном при БП (Alam et al., 1997). А в образцах периферической крови пациентов с БП и в культуре лимфоцитов, выделенных из крови пациентов с БП, обнаружено увеличение количества одонитевых разрывов и окисленных пуриновых оснований (Migliore et al., 2001).

В ДНК нейронов, выделенных из моторной коры мозга пациентов с АЛС, также увеличено содержание 8-OHdG по сравнению с контрольной группой (Bogdanov et al., 2000). Увеличение частоты окислительных повреждений ДНК ядер и митохондрий, в частности 8-OHdG, зафиксировано также и в клетках спинного мозга, коры головного мозга и мозжечка трансгенных мышей, с мутацией G93A в гене *SOD1* (Aguirre et al., 2005). Мутации в этом гене ассоциированы с 20% случаев наследственных форм АЛС (Ferri et al., 2006).

Повышенное содержание 8-OHdG в ДНК характерно и для больных БХ. Повышенное содержание окислительных повреждений ядерной и митохондриальной ДНК обнаружено в клетках больных БХ, тканях трансгенных мышей линии R6/2, синтезирующих мутантный белок хантингтин, а также в клеточных линиях почек африканской зеленой мартышки, в которых накапливаются агрегаты этого белка (Ayala-Reña, 2013).

Некоторые исследования доказывают непосредственную роль амилоидных агрегатов в образовании свободных радикалов. Так, было показано, что экспрессия человеческого минигена, кодирующего $A\beta_{1-42}$, у трансгенных *C. elegans* приводит к повышению уровня окислительного стресса, определяемого с помощью измерения концентрации карбонилированных белков (Yatin et al., 1999; Butterfield et al., 1999). Одна из гипотез, описывающих развитие симптомов при БА, – гипотеза окислительного стресса – предполагает, что образование токсичных форм $A\beta_{1-42}$ приводит к повышению уровня окислительного стресса, что в свою очередь, вызывает гибель клеток. В пользу этого предположения свидетельствует тот факт, что применение витамина Е, обладающего антиоксидантными свойствами, в культуре нейронов снижает уровень окислительных повреждений и предотвращает гибель клеток (Gugliandolo et al., 2017). Образование свободных форм кислорода было показано также в присутствии фрагментов PrP, несущих аминокислотные замены, которые способствуют прионизации PrP (Turnbull et al., 2003). Один из возможных механизмов влияния окислительных повреждений на патогенез нейродегенеративных заболеваний может заключаться в том, что транскрипция на матрице ДНК с окисленными формами гуанина происходит с ошибками, и в результате последующей трансляции происходит накопление аномальных белков, не способных выполнять свои функции.

В литературе обсуждают возможность прямого повреждающего действия некоторых амилоидов на ДНК. Так, показана способность некоторых амилоидов непосредственно связываться с молекулами ДНК и РНК. Для амилоида $A\beta_{1-42}$ показана нуклеазная активность. Например, известно, что растворимые формы $A\beta_{1-42}$ *in vitro* связываются с ДНК и вызывают её разрывы (Suram et al., 2007). Для α -синуклеина также показана способность связываться с ДНК, при этом такое взаимодействие индуцирует полимеризацию α -синуклеина (Cherny et al., 2004). Показано, что внутриклеточный $A\beta$ способен связываться с промотором гена, кодирующего супрессор опухолей p53, и активировать его экспрессию. Кроме того, у морских свинок окислительные повреждения ДНК индуцируют перемещение $A\beta$ в ядро (Ohiagi et al., 2005). Другие примеры взаимодействия амилоидогенных белков с ДНК и РНК можно найти в обзоре (Nizhnikov et al., 2016). Таким образом, первичные повреждения ДНК, нарушая стабильность генома, влияют не только на МП I рода, но и затрагивают МП II рода. В свою очередь, амилоидные агрегаты некоторых белков, связываясь с ДНК, влияют на ее стабильность и модифицируют МП I рода.

1.6 Амилоиды и эффективность репарации

При нейродегенеративных амилоидных заболеваниях увеличение частоты повреждений ДНК может быть связано не только с повышенным уровнем окислительного стресса, но и с недостаточной эффективностью ферментов систем репарации ДНК. Участие той или иной системы репарации в процессе восстановления структуры ДНК зависит от типа повреждения и стадии клеточного цикла. Устранение повреждений ДНК происходит поэтапно. В общем виде на первом этапе репарации происходит вырезание участка цепи ДНК с повреждением и последующее застраивание образовавшейся брешы, возможны также гомологичная рекомбинация и негомологичное воссоединение концов двух молекул ДНК. При репарации могут происходить взаимопревращения повреждений, образуются промежуточные продукты незавершенной репарации, которые представляют собой повреждения ДНК другого типа, служащие субстратом на последующих этапах репарации. Например, при устранении модифицированных оснований в ходе эксцизионной репарации оснований ДНК-гликозилаза вырезает поврежденные основания с образованием АП-сайтов, при устранении которых возникают однонитевые разрывы, это стимулирует появление двунитевых разрывов и рекомбинацию. Двунитевые разрывы могут приводить к потерям хромосом или их участков, а в случае ошибочной репарации ДНК с двунитевыми разрывами посредством рекомбинационной репарации или прямого воссоединения концов могут возникать генные мутации и перестройки хромосом (Le Guen et al., 2014). Избыточные повреждения ДНК в дифференцированных нейронах могут приводить к активации клеточного цикла, а недостаточная эффективность систем репарации, в свою очередь, к невозможности закончить репарацию ДНК с высокой точностью и к активации апоптоза. Так, в мозге людей с БА увеличена доля нейронов, синтезирующих циклины В и D (Moh et al., 2011). Синтез таких белков свидетельствует об активации клеточного цикла.

Уже довольно давно известны данные о снижении эффективности репарации ДНК в клетках пациентов с БА: фибробластах, лимфоцитах и лимфоцитах (Li and Kaminskas, 1985; Robison et al., 1987; Bradley et al., 1989). Более поздние исследования также подтверждают снижение активности ферментов репарации ДНК на разных стадиях развития БА (Corpede and Migliore, 2009). Среди ферментов, участвующих в репарации ДНК, при БА отмечено снижение активности факторов эксцизионной репарации оснований (BER), в частности, ферментов 8-оксигуанин-ДНК-гликозилазы (OGG1) и урацил-ДНК-гликозилазы (UDG), специфически удаляющих соответственно 8-OHG и урацил из ДНК, а также ДНК полимеразы β (Lillenes et al., 2016; Weissman et al., 2007; Canugovi et al., 2013). Именно ферменты BER принимают участие в

устранении подавляющего большинства повреждений ДНК, вызванных окислительным стрессом. Существуют генетические заболевания, вызванные мутациями в генах, кодирующих ферменты репарации ДНК. У людей такие заболевания проявляются повышенным риском развития рака (пигментная ксеродерма) или преждевременного старения (синдром Кокейна), кроме того, среди проявлений данных заболеваний отмечают также нейродегенеративные процессы. Некоторые исследователи предполагают, что мутации в генах, кодирующих ферменты репарации ДНК, могут влиять на процессы нейродегенерации и увеличивают риск развития БА, но данных, подтверждающих это предположение, недостаточно (Coppede, 2011).

Можно представить и другие механизмы влияния амилоидов на эффективность репарации, которые, однако, требуют проверки и глубокого экспериментального изучения. Как правило, агрегация амилоидных белков снижает их функциональную активность. Амилоидные агрегаты могут титровать молекулы неамилоидных белков и/или провоцировать их агрегацию. Таким образом, может снижаться активность и/или изменяться локализация белков, не обладающих амилоидными свойствами. Такими белками, вовлекаемыми в амилоидные агрегаты, теоретически могут быть и белки, участвующие в контроле стабильности генома. В случае дрожжевых прионов почти половина из них представляют собой транскрипционные факторы, поэтому весьма вероятно, что прионизация таких белков будет приводить к изменению экспрессии тех генов, которые эти транскрипционные факторы контролируют, в их число могут входить и гены репарации. Так, у мышей с мутантным вариантом гена *Htt*, содержащим дополнительные повторы триплетов CAG, что увеличивает вероятность амилоидизации белка гентингина, появление признаков БХ коррелирует с изменением транскриптома (Huang et al., 2021).

1.7 Амилоиды и геномные мутации

Амилоидные формы белков, вероятно, могут модифицировать процессы расхождения хромосом, за счет влияния на функции микротрубочек. Ключевая функция микротрубочек во время митоза – обеспечение движения хромосом, посредством процессов полимеризации и деполимеризации субъединиц тубулина. Показано прямое взаимодействие Sup35 с тубулином, опосредованное прионизирующим NM-доменом Sup35. Штаммы *SUP35-ΔNM* чувствительны к беномилу, нарушающему полимеризацию микротрубочек. Мутации в гене *SUP35*, кодирующем фактор терминации трансляции у дрожжей, который способен к образованию приона [*PSI*⁺], приводят к повышению частоты потери III хромосомы (Borchsenius et al., 2000), такие мутанты также чувствительны к беномилу (Tikhomirova and Inge-Vechtomov, 1996; Li et al., 2014). Мутации в кодирующем гене или недостаточность белка Sup35 приводят к морфологическим

изменениям клеток дрожжей, таким как увеличение размеров клеток, изменениям морфологии веретена деления, деполимеризация актина, которые, вероятно, обусловлены дефектами цитоскелета (Valouev et al., 2002). У самцов *Drosophila melanogaster* мутации в гене *SUP35* также приводят к нарушению сборки веретена деления, нарушениям сегрегации хромосом и цитокинеза в мейозе (Basu et al., 1998).

В качестве примера того, каким образом амилоиды могут влиять на стабильность генома в клетках человека, можно привести следующее: показано, что при болезни Альцгеймера накопление агрегированного β -амилоида сопровождается гиперфосфорилированием белка Тау (Wu et al., 2018; Mao and Reddy, 2011; Julien et al., 2018). Агрегация Тау, специфичного для нейронов белка микротрубочек, приводит к нарушению цитоскелета и гибели нейронов (Mao and Reddy, 2011; Alonso et al., 2018). Можно предположить, что амилоидные формы белков, влияя на функцию белков цитоскелета, могут препятствовать расхождению хромосом при делении, что приведет к нарушению ploидности. Это согласуется с данными о повышении частоты анеуплоидии в нейронах при БА. Для белка PrP в растворимой форме также показана способность связываться с тубулином (Nieznanski et al., 2005), при этом PrP препятствует правильной сборке микротрубочек, индуцируя образование кольцевых, дископодобных или слоистых тубулиновых олигомеров (Nieznanski et al., 2006). Таким образом, амилоидизация белков может индуцировать как первичные повреждения, приводящие к нарушению МП I и II рода, так и структурные нарушения генома.

Накапливается все больше фактов, говорящих о том, что не только амилоиды могут служить первопричиной дестабилизации генома, но и генетические нарушения могут запускать агрегацию белков. Практически все белки содержат аминокислотные фрагменты, которые способны образовывать амилоиды *in vitro* (Dobson, 2003), но в клетке переход в амилоидное состояние у белков ограничен физиологическими факторами, а также скоординированной работой систем синтеза, контроля качества и деградации белков. Синтезированные пептиды должны быть правильно свернуты, неправильно сложенные белки должны быть повторно свернуты, а необратимо поврежденные белки должны подвергнуться деградации. Кроме того, должны быть правильно собраны мультибелковые комплексы. Гомеостаз протеома обеспечивают шапероны и убиквитин-протеасомные системы. В том случае, когда клетки испытывают протеотоксический стресс – то есть, когда системы контроля качества белка, включающие шапероны и системы протеасомной деградации, работают неэффективно или перегружены, неправильно свернутые белки не устраняются, что провоцирует образование агрегатов (Tyedmers et al., 2010; Houck and Cyr, 2012). Крупные изменения генома, такие как изменение числа отдельных хромосом (потери или дупликации), крупные делеции или

дубликации обширных участков хромосом могут приводить к дестабилизации протеома из-за изменения дозы генов и повышать вероятность образования белковых агрегатов, в том числе амилоидных. Действительно, в ряде исследований было показано, что анеуплоидные клетки испытывают протеотоксический стресс, вызванный нарушением протеомного баланса, в частности, стехиометрического соотношения компонентов белковых комплексов. Так, анеуплоидные штаммы дрожжей – дисомики по различным хромосомам демонстрируют повышенную чувствительность к высокой температуре, ингибиторам белкового синтеза и сворачивания белка, а также к химическим агентам и мутациям, инактивирующим протеасомную деградацию. При этом повышение эффективности протеасомной деградации за счет делеции гена, кодирующего деубиквитирующий фермент Ubr6, повышает жизнеспособность ряда дисомных штаммов дрожжей (Torres et al., 2007; Torres et al., 2010). Вследствие недостаточности систем контроля качества белка анеуплоидные штаммы дрожжей характеризуются повышенной эффективностью агрегации белков, в том числе, образования амилоидных агрегатов. Так, показано, что в ряде дрожжевых штаммов-дисомиков, продуцирующих различные варианты белка гентингина (Htt) человека, отличающиеся длиной полиглутаминовых повторов, агрегация данного белка происходила с большей эффективностью (Oromendia et al., 2012). В этой же работе показано повышение эффективности образования агрегатов модифицированного варианта белка Sup35 дрожжей, склонного к амилоидной агрегации, в ряде анеуплоидных дрожжевых штаммов по сравнению с контрольными гаплоидными штаммами.

Принципиально сходные данные были получены и с использованием культур клеток человека и мыши. В культивируемых клетках млекопитающих возникновение анеуплоидии нарушает гомеостаз протеома, приводя к аномальному сворачиванию белковых молекул, накоплению белковых агрегатов, изменению характера аутофагии и накоплению компонентов аутофагосом в лизосомах, что приводит к перегрузке лизосом и, как следствие, неэффективной деградации аномальных белков в лизосомах (Tang et al., 2011; Stingle et al., 2012; Donnelly and Storchova, 2014; Santaguida et al., 2015).

Помимо общего нарушения гомеостаза протеома в анеуплоидных клетках, к повышению эффективности амилоидизации отдельных белков в таких клетках может приводить увеличение дозы генов, кодирующих белки, склонные к амилоидогенезу. Предполагают, что повышение концентрации амилоидогенного белка может быть одним из механизмов появления амилоидных форм белков. Яркой иллюстрацией этого является обнаружение связи БА и синдрома Дауна (СД) (Popovitch et al., 1990; Wisniewski et al., 1985). СД представляет собой врожденное заболевание, вызванное наличием дополнительной копии 21 хромосомы. Симптомы БА начинают развиваться у людей с СД уже к 20 годам, а к 40 годам практически у всех больных диагностируют БА (Oliver

and Holland, 1986). Примерно 30% людей с СД погибают от БА, что является лидирующей причиной смертности среди людей с СД, по-видимому, это цифра занижена, поскольку некоторые клинические проявления на ранних стадиях БА у людей с СД трудно выявить из-за схожести симптомов этих заболеваний (Fortea et al., 2021). Поскольку ген *APP*, кодирующий белок-предшественник $A\beta$, расположен в 21 хромосоме человека (Patterson et al., 1988), предполагают, что именно наличие дополнительной копии гена *APP* при СД вызывает увеличение продукции белка *APP* и, соответственно, $A\beta_{1-42}$ (Oyama et al., 1984; Patterson and Costa, 2005). В пользу этого предположения свидетельствуют данные о развитии БА у людей с разными формами СД, а также у носителей редкой дупликации локуса, содержащего ген *APP*. СД может быть вызван не только наличием целой лишней 21 хромосомы, но и её фрагмента. У людей с СД, вызванным наличием дополнительного фрагмента 21 хромосомы, не содержащего локус *APP*, не было обнаружено проявления симптомов БА (Prasher et al., 1998), а редкая дупликация локуса с геном *APP* вызывает преждевременное развитие БА у носителей, характеризующееся аутосомно-доминантным наследованием (Blom et al., 2008; Rovelet-Lecruх et al., 2006). Кроме того, на общую генетическую составляющую этих заболеваний указывает повышенная вероятность развития БА у матерей, имеющих детей с СД (Schurp et al., 1994).

Существование положительной корреляции между СД и БА позволило предположить, что люди, у которых развивается БА, являются мозаиками по 21 хромосоме (частичный, или мозаичный СД), и наличие лишней копии гена *APP* даже в небольшом количестве нервных клеток приводит к увеличению продукции $A\beta_{1-42}$ (Potter, 1991). Действительно, у людей с БА в мозге повышена частота клеток с анеуплоидным набором хромосом, преимущественно клеток, содержащих дополнительную 21 хромосому (Iourov et al., 2009).

1.8 Роль амилоидогенеза в канцерогенезе

Раковые и амилоидные нейродегенеративные заболевания – распространённые заболевания с высокой смертностью. При этом возникновение и развитие онкологических заболеваний тесно связано с усилением процессов дестабилизации генома, а нейродегенеративные заболевания рассматривают, прежде всего, в связи с амилоидогенезом белков. Необычная, преимущественно обратная корреляция между этими двумя группами болезней была выявлена еще в 1954 г., когда было обнаружено, что у пациентов с БП реже диагностируют рак (Doshay, 1954). В последующие годы это наблюдение было подтверждено в более чем 30 исследованиях (Driver et al., 2007a; Driver et al., 2007b; Elbaz et al., 2002; Elbaz et al., 2005; Fois et al., 2010; Olsen et al., 2005; Olsen et al., 2006). У пациентов с диагнозом БА риск

развития опухолей снижен на 50 %, а у тех людей, у которых в течение жизни диагностировали рак, БА развивается на 35 % реже, чем в контрольной группе соответствующего возраста (средняя популяционная частота) (Musicco et al., 2013). У людей с диагнозом БА реже выявляют рак лёгкого, молочной и предстательной железы и другие виды рака (Freedman et al., 2016). В некоторых исследованиях была выявлена положительная корреляция между БА и возникновением глиобластомы (Lehrer, 2018), одного из самых распространённых видов рака мозга, однако точная причина такой корреляции ещё не установлена.

При БП снижен риск возникновения рака легких, крови, мочеполовой и пищеварительной систем, однако же повышен риск возникновения злокачественной меланомы (Leong et al., 2021). Интересно, что меланоциты кожи и нейроны черной субстанции имеют общее происхождение и содержат пигмент меланин (Vajaj et al., 2010; Driver, 2014). Обратная корреляция была обнаружена также между онкологическими заболеваниями и болезнью Хантингтона (БХ) (Sørensen et al., 1999).

Механизм такой необычной зависимости не выяснен, однако существует несколько предположений. Одно из таких предположений заключается в том, что пациенты с установленным заболеванием одной группы, не доживают до проявления заболевания другой группы, поскольку и БА, и разные виды рака относятся к довольно агрессивным заболеваниям с высокой смертностью. Для того чтобы снизить влияние смертности на определяемое значение частоты заболевания необходимо использовать данные, полученные в результате длительных наблюдений. Такие данные были получены при наблюдении жителей Японии, переживших атомную бомбардировку, поскольку их здоровье находится под длительным наблюдением ввиду повышенного риска развития рака. В одном из исследований сообщалось, что у входящих в эту группу людей с диагнозом БА разные виды рака развиваются на 70% реже, чем у людей того же возраста без признаков деменции (Yamada et al., 1999). Обратная зависимость между онкологическими заболеваниями и БА сохраняется, даже если исключить из анализа людей, не доживших до 80 лет (Frain et al., 2017). Кроме того, подобной корреляции не обнаружено между частотой онкологических заболеваний и сосудистых деменций, относящихся к нейродегенеративным заболеванием неамилоидной природы (Roe et al., 2010).

Еще одно предположение заключается в том, что терапия, применяемая при одном из указанных заболеваний, может снижать риск возникновения заболевания другой группы. Несмотря на то, что лекарства от амилоидных заболеваний не найдено, тем не менее, применяют симптоматическое лечение, например, при БП прописывают препараты леводопа и амантадины для восстановления функций дофаминэргической системы в мозге. При онкологических

заболеваниях применяют лучевую или химиотерапию. Известно, что предварительное облучение малыми дозами ионизирующего излучения способствует лучшей переносимости последующих высоких доз радиации (Koval et al., 2020; Gueguen et al., 2019). Механизм этого действия объясняют тем, что небольшие дозы мутагена индуцируют активацию клеточных систем репарации, например, синтез ферментов систем репарации ДНК, и клеточные повреждения, вызванные последующим воздействием больших доз мутагена, быстрее устраняются (Gueguen et al., 2019).

Предполагают, что противоопухолевые препараты могут способствовать активации не только системы репарации ДНК, но и системы восстановления белков (шапероны и убиквитин-протеазы), что, с одной стороны, ускоряет устранение окислительных повреждений, вызванных токсичными формами амилоидных белков, а с другой, способствует удалению белковых молекул с измененной пространственной структурой. Снижение частоты опухолевых заболеваний у пациентов с амилоидозами, возможно, связано с активацией систем репарации ДНК под действием окислительного стресса, вызванного присутствием токсичных молекул белков, и ускоренным устранением повреждений ДНК, что препятствует образованию раковых клеток. Это теоретическое предположение требует экспериментальной проверки с использованием модельных организмов и мутагенов. Некоторые работы в этом направлении уже проводятся. Так, недавно показали, что у трансгенных мух *D. melanogaster*, синтезирующих A β ₁₋₄₂ человека (модель БА), небольшие дозы ионизирующего излучения подавляют развитие дефектов глаз и крыльев, вызванных накоплением амилоидных агрегатов (Hwang et al., 2019).

Получены свидетельства того, что переход белков в амилоидное состояние может способствовать возникновению и росту раковых опухолей. Например, известны некоторые мутации в гене-супрессоре опухолей p53, приводящие к синтезу мутантного белка с амилоидными свойствами (Ishimaru et al., 2003). Такие мутантные молекулы p53 склонны к агрегации и формируют амилоидоподобные агрегаты, в которые также включаются нормальные молекулы p53, что приводит к снижению концентрации функционального белка в цитоплазме. Такие мутации доминантны и приводят к развитию рака у их носителя, несмотря на наличие копии гена дикого типа (AnoVom et al., 2007). Возможно, к образованию амилоида приводит повышение концентрации белка p53 в раковых клетках, поскольку известно, что в раковых клетках происходит нарушение экспрессии генов (Inoue et al., 2012). В этом случае мутантные варианты p53 с большей вероятностью будут образовывать амилоиды, и таким образом способствовать прогрессии заболевания. Способность образовать амилоидные агрегаты *in vitro* была обнаружена у белка Rad51 (Kachkin et al., 2022). Белок Rad51 – ключевой фермент рекомбинационной репарации, участвующий в устранении двунитевых разрывов ДНК.

Мономеры Rad51 образуют спиральные нуклеопротеиновые агрегаты на содержащей двунитевой разрыв ДНК, такое связывание необходимо для осуществления успешной гомологичной рекомбинации. В клетках агрегацию Rad51 регулирует белок Brca2, этот белок содержит 8 консервативных последовательностей BRC, с помощью которых Brca2 связывается с Rad51 (Pellegrini et al., 2002; Morati and Modesti, 2021). Можно предположить, что Rad51 является функциональным амилоидом, однако следует отметить, что неизвестно, обладают ли физиологические агрегаты Rad51 амилоидными свойствами.

Представляет интерес блок экспериментальных данных о том, что при некоторых раковых заболеваниях изменена экспрессия генов, кодирующих белки-предшественники прионов и амилоидов. Увеличение продукции белка PrP отмечено в клетках многих видов рака, таких как остеосаркома, глиобластома, меланома, рак желудка, поджелудочной железы, легких и др. (Yang et al., 2017). Повышение экспрессии кодирующего A β гена *APP*, а также его гомолога *APLP2* (APP-likeprotein 2), обнаружена в клетках рака груди, легких, щитовидной железы, простаты, а также меланомы и саркомы Эдвина (Itoh et al., 1991; Yang et al., 2012; Miyazaki et al., 2014; Botelho et al., 2010; Peters et al., 2013; Liang et al., 2007). Во многих клеточных линиях, полученных из раковых опухолей, повышенная продукция белков APP и PrP коррелирует с усиленной пролиферацией (Itoh et al., 1991; Malaga-Trillo et al., 2009) и повышенной способностью к миграции клеток (Du et al., 2013; Cheng et al., 2014), что обеспечивает раковым клеткам способность образовывать метастазы. При этом снижение концентрации этих белков экспериментальными методами приводит к удлинению клеточного цикла – клетки реже делятся и даже синтезируют маркеры апоптоза (Lim et al., 2014; Danish et al., 2018). Кроме того, снижение продукции белка APP в клеточных линиях меланомы человека повышает их чувствительность к химиотерапевтическим препаратам (Botelho et al., 2010), которые блокируют вилку репликации и действуют в основном на активно делящиеся клетки. Этот факт указывает на то, что в таких клетках с низкой продукцией APP не происходит синтез ДНК. Необходимо отметить, что в цитируемых исследованиях оценивали только уровень экспрессии генов, кодирующих амилоидогенные белки, но не проверяли наличие амилоидов. Поэтому невозможно сделать однозначный вывод о прямом влиянии амилоидов на канцерогенез. Судить о роли амилоидогенеза в канцерогенезе на данном этапе развития этой области стоит с осторожностью, тем не менее даже эти данные позволяют предположить, что амилоидные свойства в будущем могут быть обнаружены у многих белков, для которых показана прямая роль в развитии рака.

1.9. Подходы, применяемые для решения задачи исследования

Таким образом, в литературе описано множество фактов, указывающих на существование взаимосвязи между амилоидогенезом и процессами, контролирующими стабильность генома. Тем не менее, неизвестно, каким образом и посредством каких молекулярных механизмов осуществляется это взаимодействие. Неизвестно, способны ли амилоидные формы белков оказывать прямое повреждающее и мутагенное воздействие на ДНК *in vivo* или же амилоиды модифицируют процессы, участвующие в поддержании стабильности генома, в том числе МП I, индуцируя таким образом изменение частоты возникновения мутаций. Ничего не известно о возможном обратном влиянии этих процессов, а именно способности повреждений ДНК оказывать влияние на гомеостаз протеома.

Для выяснения природы взаимодействия процессов амилоидогенеза и мутагенеза необходимы дальнейшие исследования. Одним из способов решения данной проблемы может стать применение в качестве модельного организма дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, у которого в отдельности хорошо изучены процессы мутагенеза и амилоидогенеза, а также глубоко разработаны методы, применяемые для изучения этих процессов. Для решения данной проблемы мы исследуем в дрожжах *S. cerevisiae* закономерности возникновения прионной формы белка Sup35 (приона [*PSI*⁺]) и различных генетических изменений, детектируемых с помощью набора мутационных тестов, позволяющих учитывать генные, хромосомные и геномные мутации. Одной из первоочередных задач является проверка причинно-следственной связи между процессами возникновения в клетке приона и генетических изменений.

Для того чтобы приступить к исследованию механизмов взаимодействия амилоидогенеза и процессов дестабилизации генома мы предположили 3 варианта очерёдности появления приона и генетических изменений (Рисунок 4):

1. Прион [*PSI*⁺] обладает мутагенным действием и индуцирует появление изменений в геноме.
2. Генетические изменения в геноме приводят к появлению приона.
3. Генетические изменения и прион [*PSI*⁺] возникают в клетке одновременно под действием какого-то общего фактора.

Данная работа направлена на проверку выдвинутых предположений. Для проверки первой гипотезы о влиянии приона на генетический аппарат клетки мы исследуем, как прион [*PSI*⁺] влияет на частоту различных типов генетических изменений. Для проверки второй гипотезы,

предполагающей, что генетические изменения индуцируют появление амилоидов, мы исследуем, как такие генотоксические факторы, как нарушение рекомбинационной репарации и ингибирование синтеза предшественников ДНК, влияют на частоту появления приона [PSI^+]. Не исключено, что амилоиды и генетические изменения возникают в клетке одновременно. Для проверки этой гипотезы мы исследуем совместную частоту появления обоих событий. Если прион и мутации возникают в клетке независимо друг от друга, то частота их совместного появления должна быть равной произведению частот каждого из перечисленных событий. Отклонение значения частоты возникновения приона и мутаций от ожидаемой будет свидетельствовать о существовании связи между этими двумя событиями.

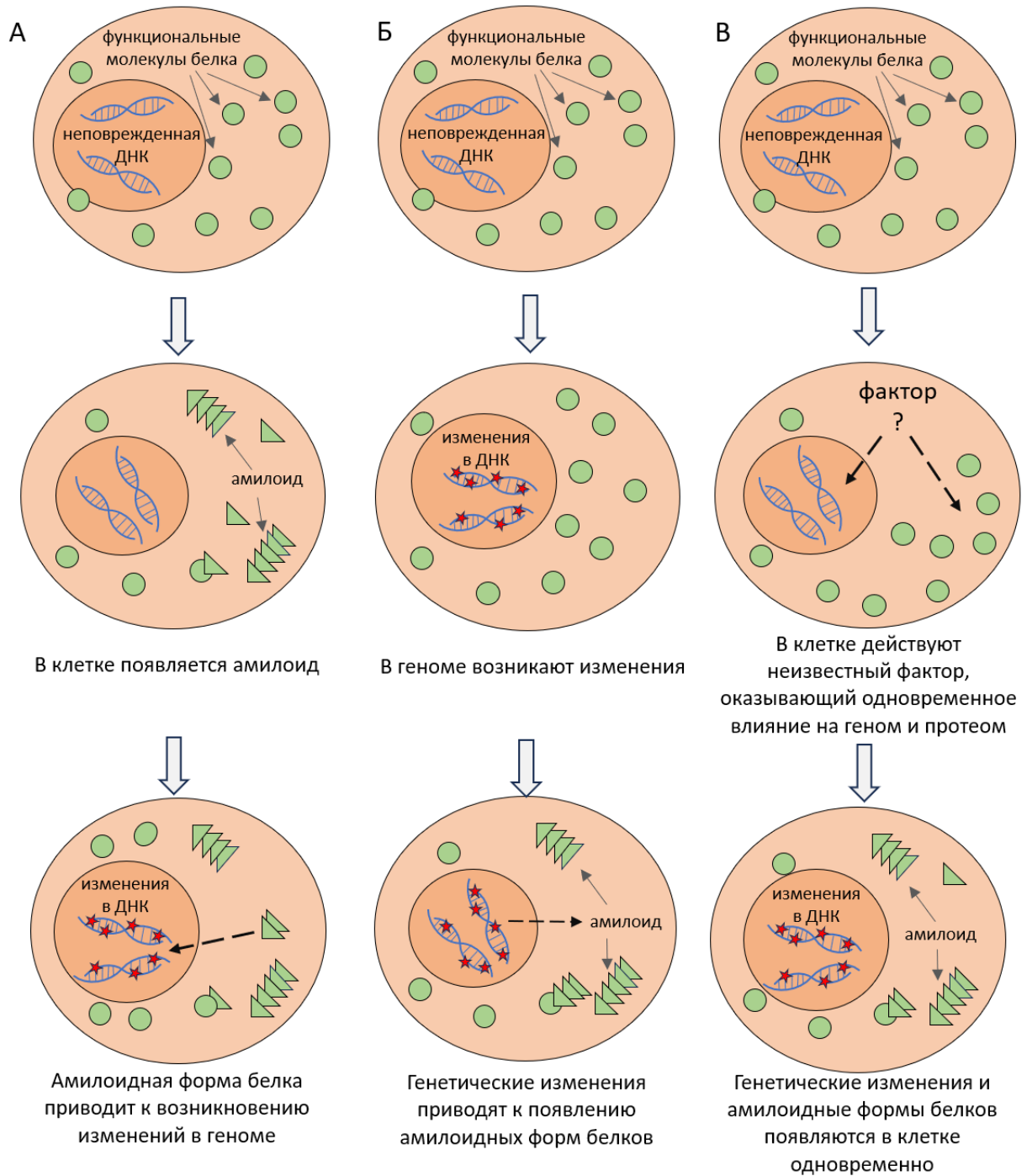


Рисунок 4 – Гипотезы об очерёдности появления в клетке приона и изменений в геноме. **А.** Амилоиды первичны: на первом этапе возникают амилоидные формы белков, которые напрямую или опосредованно приводят к изменениям в геноме (мутации, хромосомные перестройки, изменение числа хромосом и др.) **Б.** Изменения в геноме первичны: генетические изменения приводят к появлению изменённых форм белков с амилоидными свойствами. **В.** Генетические изменения и амилоиды появляются в клетке одновременно, вероятно под действием неизвестного фактора.

2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Штаммы дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, использованные в работе

В работе были использованы изогенные штаммы дрожжей *S. cerevisiae* [*PIN*⁺] [*PSI*⁺] и [*PIN*⁺] [*psi*⁻], полученные на основе базового штамма K5-35B-D924-ade1-14 (*MATa ura3Δ leu2Δ met15Δ lys5::kanMX ade1-14(UGA) [pin⁻] [psi⁻]*). На первом этапе на основе штамма [*pin*⁻] [*psi*⁻] с помощью белковой трансформации были получены 2 клона [*PIN*⁺] [*psi*⁻], далее в этих клонках индуцировали образование приона [*PSI*⁺] и отобрали несколько независимых клонов [*PIN*⁺] [*PSI*⁺]: 1-1, 1-6, 2-3 и 2-5 (Рисунок 5). Клон 2-3 в процессе хранения изменил тип спаривания α→n/m (non-mater), т.е. потерял способность скрещиваться со штаммами α и α типа спаривания, оставаясь гаплоидом. Все штаммы [*PIN*⁺] [*PSI*⁺], использованные в данной работе, были получены на основе клонка 2 [*PIN*⁺] [*psi*⁻] (Рисунок 5).

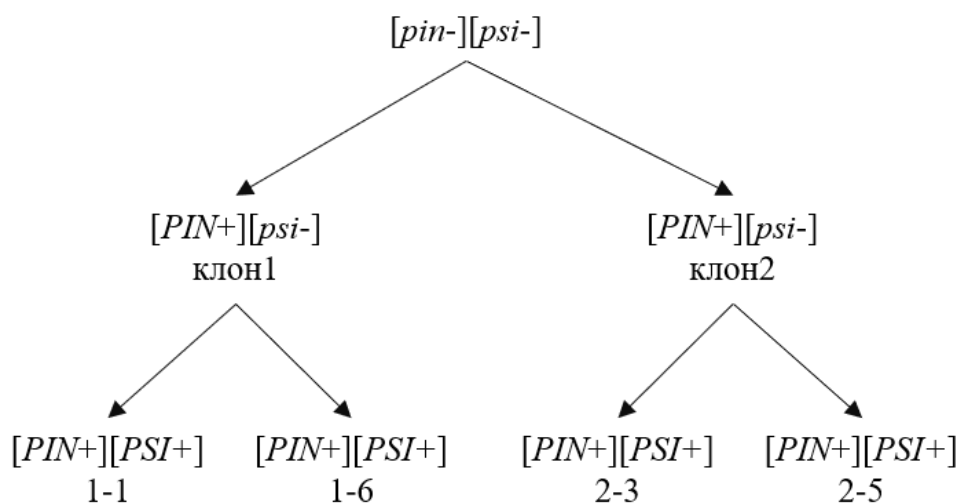


Рисунок 5 - Схема получения дрожжевых штаммов [*PIN*⁺] [*PSI*⁺] и [*PIN*⁺] [*psi*⁻], использованных в данной работе.

Также в работе был использован штамм 33Г-Д373 (*MATa pheA10 (UAA) ade2-144,717 his7-1(UAA) lys9-A21(UAA) trp1-289(UAG) ura3-52 [PIN⁺] [psi⁻]*) и изогенные ему штаммы [*PIN*⁺] [*PSI*⁺]: 33Г-Д373-61, 33Г-Д373-72 и 33Г-Д373-74. В работе были использованы следующие штаммы [*PSI*⁺], любезно предоставленные сотрудниками кафедры генетики и биотехнологии СПбГУ: 22D168-2, 311, W33, WWC, 3W1, 312, 13D, полученные на основе штамма 74-D694 (*MATa ade1-14(UGA) trp1-289 his3-Δ200 ura3-52 leu2-3,112 [PIN⁺] [psi⁻]*). Перечисленные штаммы были использованы в качестве доноров приона при белковой трансформации. В качестве партнера для «незаконной» гибридизации был использован автодиплоидный штамм Д926 (*MATa // MATa ADE1 // ade1Δ leu2Δ // leu2Δ lys2Δ // lys2Δ ura3Δ // ura3Δ his4Δ // his4Δ thr4Δ // thr4Δ*).

Штамм PLY122 (*MATa leu2-3,112 lys2-Δ201 ura3-52*) использовали в качестве партнера а-типа спаривания для получения гибридов при проведении тетрадного анализа. Для определения типа спаривания были использованы штаммы-тестеры 2Г-П2345 (*MATa his5*) и 78А-П2345 (*MATα his5*) (Степченкова и др., 2009). Для получения дизрупции *rad52::LEU2*, приводящей к инактивации рекомбинационной репарации клетки штамма K5-35B-D924-ade1-14 [*PIN⁺*] [*psi*] трансформировали плазмидой рJH181, содержащей ген *LEU2*, фланкированный с обеих сторон последовательностями, гомологичными гену *RAD52*. Плазмиду рJH181, любезно предоставленную проф. Ю.И. Павловым (Университет штата Небраска, США) перед трансформацией гидролизировали эндонуклеазой рестрикции *VamHI*, трансформантов отбирали по способности расти на среде без лейцина.

2.2 Среды и условия культивирования

Дрожжи выращивали на полных средах: жидкой и твердой средах YEPD (Захаров и др., 1984; Sherman et al., 1986), минимальной среде MD (минимальная дрожжевая среда по рецепту Yeast Nitrogen Base), содержащей необходимые аминокислоты, азотистые основания, витамины и микроэлементы (Захаров и др., 1984). Аминокислоты и азотистые основания добавляли в среду в следующих концентрациях: L-гистидин – 20 мг/л, L-лизин – 30 мг/л, аденин – 20 мг/л, урацил – 20 мг/л, L-треонин – 150 мг/л, L-лейцин – 60 мг/л, L-метионин – 20 мг/л, L-триптофан – 20 мг/л и L-фенилаланин – 20 мг/л. Среду для отбора гибридов готовили на основе MD с добавлением аминокислот и азотистых оснований, необходимых для роста гибридов. Среду для учета частоты прямых мутаций в гене *CANI*, готовили на основе MD с добавлением сульфата L-канаванина фирмы «Sigma-Aldrich», США, в концентрации 40 мг/л. Среда для индукции прионизации Sup35 была приготовлена на основе MD, содержащей необходимые аминокислоты, азотистые основания и 2% галактозы в качестве источника углерода. Среда для изгнания приона была приготовлена на основе твердой YEPD с добавлением гидрохлорида гуанидина (ГГХ) фирмы «Диаэм», Россия, в концентрации 0,5 г/л. Для исследования влияния дисбаланса пула дНТФ на частоту прионизации Sup35 в среду добавляли гидроксимочевину (ГМ) фирмы «Sigma-Aldrich», США, в концентрации 100 мМ. Для приготовления твердых сред использовали агар фирм «Sigma-Aldrich», США, или «Difco», в концентрации 20 г/л. Дрожжи выращивали при температуре 30°C.

2.3 Плазмиды

Все плазмиды, использованные в данной работе, за исключением плазмиды pJH181 и pEMBL-ΔBal2, были получены на основе вектора pRS316 (Sikorski and Hieter, 1989). Индукцию прионизации белка Sup35 проводили с помощью плазмиды pGAL1-SUP35 (Derkatch et al., 1996), индукцию прионизации Sup35 в штамме [*pin*⁻] – с помощью плазмиды pEMBL-ΔBal2 (Derkatch et al., 2000), изгнание приона [*PSI*⁺] – с помощью плазмиды pGAL1-HSP104 (Lindquist and Kim, 1996), для визуализации агрегатов приона [*PSI*⁺] использовали плазмиду pCUP1-SUP35NM-YFP (Derkatch et al., 2004). Плазмиду pJH181 использовали для получения штамма с дизрупцией гена *RAD52* (Zhuk et al., 2023).

2.4 Индукция прионизации Sup35

Различные варианты приона [*PSI*⁺], использованные в данной работе, были получены с помощью сверхпродукции белка Sup35 в штамме, несущем прион [*PIN*⁺]. Индукцию прионизации выполняли следующим образом. Штамм [*PIN*⁺] [*psi*⁻] трансформировали плазмидой pGAL1-SUP35, несущей ген *SUP35*, находящийся под промотором *GAL1*, и селективный маркер *URA3*. Полученных трансформантов выращивали на твердой селективной среде без урацила, содержащей 2% галактозы для индукции сверхэкспрессии гена *SUP35*, затем клетки перепечатывали на среду без аденина. Через 5-7 дней отбирали выросшие на отпечатке колонии. Так как прионизация Sup35 фенотипически проявляется в виде супрессии нонсенс-мутации в гене *ADE1* (*ade1-14*), часть колоний, выросших на среде без аденина, несёт прионизованную форму Sup35. Кроме клонов [*PSI*⁺] на среде без аденина могут появляться клоны, в которых произошла реверсия нонсенс мутации *ade1-14* к дикому типу или супрессорные мутации в других генах. Колонии, несущие прион [*PSI*⁺], отличали от истинных или супрессорных ревертантов по признаку неспособности расти на среде без аденина после пассирования на среде с гидрохлоридом гуанидина (ГГХ).

2.5 Флуоресцентная микроскопия

Для детекции агрегатов приона [*PSI*⁺] в клетках дрожжей, дрожжи трансформировали плазмидой pCUP1-SUP35NM-YFP, несущей химерный ген, кодирующей прионизующий NM-домен белка Sup35, слитый с YFP и находящийся под контролем промотора *CUP1*. Трансформантов выращивали в течение 24 часов на минимальной среде, содержащей 150 мкМ CuSO₄. Флуоресценцию наблюдали, используя микроскоп Leica DM6000B (Leica

Microsystem GmbH, Германия) при увеличении 1000^X. Фотографии были сделаны цветной камерой Leica DC 500.

2.6 Определение частоты прионизации

Частоту возникновения приона [*PSI*⁺] *de novo* определяли в штаммах [*PIN*⁺] [*psi*⁻], которые предварительно трансформировали плазмидой pGAL1-SUP35. Трансформантов инкубировали 2 суток в минимальной жидкой среде, содержащей 2% галактозы в качестве источника углерода и все необходимые для роста ауксотрофного штамма добавки, кроме урацила. После 2 дней выращивания суспензию клеток высевали на среду без аденина для отбора колоний, в которых произошла прионизация Sup35. Параллельно суспензию клеток высевали на полную среду для подсчета общего количества клеток в культуре. Колонии Ade⁺ отсеивали для подтверждения наличия приона [*PSI*⁺]. Частоту прионизации определяли как соотношение клонов [*PSI*⁺] к общему числу клеток в культуре.

2.7 Стандартные методы генетики дрожжей

В ходе исследования были использованы следующие стандартные методы частной генетики дрожжей: методы получения индивидуальных клонов и селективных сред, метод отпечатков, метод серийных разведений, методы скрещивания и отбора гибридов (Захаров и др., 1984; Sherman et al., 1986). Тип спаривания определяли по способности образовывать гибриды с тестерными штаммами 2Г-П2345 и 78А-П2345, тетрадный анализ проводили, как описано (Инге-Вечтомов, 1971).

2.8 Трансформация дрожжевых клеток плазмидной ДНК

Трансформацию дрожжей проводили по стандартной методике (Rose et al., 1990) с рядом модификаций. Для каждой реакции трансформации отбирали по 1,5 мл ночной культуры дрожжей. Клетки осаждали центрифугированием при 4000 об/мин в течение 5 минут. К осадку добавляли 6 мкл ДНК спермы лосося («Invitrogen», США) (10 мкг/мл), плазмидную ДНК (0,1-1 мкг), 500 мкл буфера ПЭГ/ТЕ/LiAc (40% ПЭГ - 4000 фирмы «Диаэм», Испания, 0,1 М ацетат лития (LiAc), 10 мМ Трис-HCl, 1 мМ ЭДТА (LiAc, Трис и ЭДТА фирмы «PanReac ApplyChem», Германия)) и 56 мкл диметилсульфоксида (ДМСО) фирмы «Biofroх», Германия. Полученную смесь инкубировали в течение 15 минут при комнатной температуре с постоянным

перемешиванием, после чего клетки подвергали тепловому шоку на водяной бане (15 мин при 42°C). Клетки осаждали центрифугированием при 4000 об/мин в течение 5 мин. и высевали на селективную среду для отбора трансформантов.

2.9 Трансформация дрожжевых клеток лизатом клеток, содержащим прион

Для переноса приона из штамма-донора приона ($[PSI^+]$) в штамм-реципиент ($[psi^-]$) использовали протокол (Tanaka, 2010). Для трансформации клетки штамма-реципиента выращивали в жидкой полной среде YEPD до достижения оптической плотности при 600 нм $OD_{600}=0,3 - 0,5$. 50 мл культуры осаждали центрифугированием 3000 об./мин. и последовательно промывали стерильной водой, 1 М раствором сорбитола («PanReas ApplyChem», Германия), и SCE-буфером (1 М сорбитол, 10 мМ ЭДТА, 10 мМ дитиотреитол («Helicon», Великобритания), 100 мМ цитрат натрия, pH=5,8), затем обрабатывали зимолиазой («Zymo Research», США) в SCE-буфере в течение 30 минут при 30 °C для получения сферопластов. Сферопласты последовательно промывали раствором 1 М сорбитола и STC-буфером (1 М сорбитол, 10 мМ $CaCl_2$, 10 мМ Трис, pH=7,5), осадок растворяли в 1 мл буфера STC.

Подготовленные сферопласты трансформировали лизатом клеток, полученных из штамма-донора приона. Лизат клеток для трансформации готовили следующим образом. Клетки штамма-донора приона обрабатывали для получения сферопластов, затем разрушали клетки встряхиванием со стеклянными шариками в присутствии ингибиторов протеаз при 4 °C, и осаждали центрифугированием. Для трансформации использовали растворимую фракцию.

Сферопласты реципиента трансформировали следующим образом. К 100 мкл суспензии сферопластов добавляли раствор клеточного лизата до финальной концентрации белков 200-400 мкг/мл, раствор плазмиды pRS316 (20 мкг/мл) и раствор ДНК спермы лосося (100 мкг/мл), смесь инкубировали при комнатной температуре в течение 30 минут. Затем к клеткам добавляли ПЭГ-буфер (ПЭГ 8000 20%, 10 мМ $CaCl_2$, 10 мМ Трис, pH=7.5) в 9-кратном объеме, инкубировали 30 минут и осаждали клетки. Осадок растворяли в 150 мкл буфера SOS (1 М сорбитол, 7 мМ $CaCl_2$, 0,25% дрожжевой экстракт, 0,5% бактопептон), инкубировали 30 минут при 30 °C, затем к клеткам добавляли минимальную среду, содержащую 1,6% агара и все необходимые добавки за исключением урацила и аденина, размешивали переворачиванием и сразу выливали на чашку MD для отбора трансформантов (среда содержит все необходимые для роста штамма-реципиента добавки, за исключением аденина и урацила). Через 10 дней обирали выросшие колонии и проверяли их на наличие приона по признаку потери способности расти на среде без аденина после инкубации на среде с ГГХ.

2.10 Альфа-тест

Альфа-тест, разработанный на кафедре генетики и биотехнологии СПбГУ, представляет собой тест для генетической токсикологии, позволяющий выявлять широкий спектр наследуемых и предмутационных изменений генетического материала (Жук и др., 2013; Степченкова и др., 2009; Zhuk et al., 2023). В альфа-тесте при оценке генетической активности исследуемых факторов учитывают частоту переключения типа спаривания гетероталличных штаммов дрожжей *S. cerevisiae* с α на a , которое может происходить в результате генетических нарушений, затрагивающих третью хромосому (Рисунок 6). При проведении альфа-теста 2 штамма одинакового типа спаривания α высевают на среду для отбора гибридов (они называются «незаконными» гибридами, поскольку возникают при гибридизации штаммов, исходно имеющих одинаковый тип спаривания α). Возникновение таких гибридов возможно, если одна из родительских клеток изменит тип спаривания с α на a . Показателем мутагенной активности изучаемого фактора в альфа-тесте служит повышение частоты возникновения «незаконных» гибридов (Жук и др., 2013).

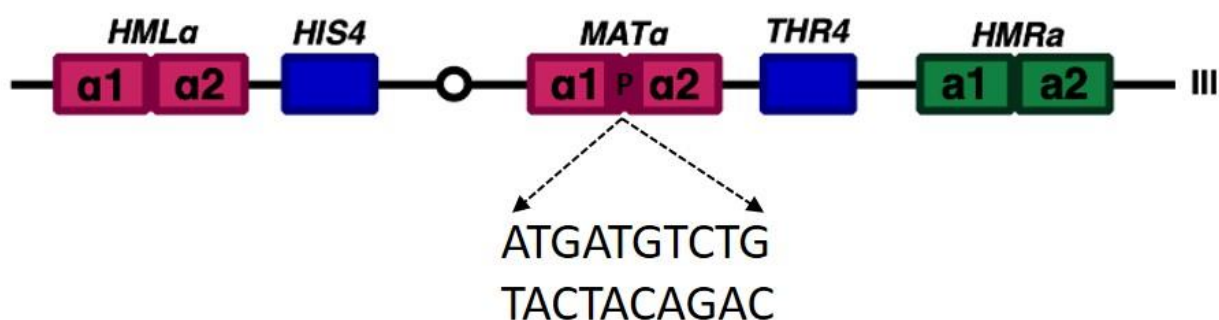


Рисунок 6 – Относительное расположение генетических маркеров на хромосоме III дрожжей *S. cerevisiae*, используемых при проведении альфа-теста. Представлены: локус *MAT*, находящийся в правом плече хромосомы III вблизи центромеры, кассеты с молчащей информацией *HMLα* и *HMRα*, расположенные в левом и правом плечах соответственно; последовательность двустороннего промотора генов *MATα1* и *MATα2*.

В основе модели альфа-теста лежит механизм переключения типа спаривания у гетероталличных штаммов дрожжей *S. cerevisiae*. Тип спаривания у дрожжей определяется расположенным в III хромосоме локусом *MAT*, представленным двумя идиоморфами – *MATa* или *MATα* (варианты локуса *MAT* называют идиоморфами, поскольку их последовательности негомологичны), и определяющими a и α тип спаривания, соответственно. В *MATα* под общим двусторонним промотором расположены два гена – *MATα1* и *MATα2*. *MATα1* является активатором α -специфичных генов, *MATα2* – репрессором a -специфичных генов (Johnson and Herzkowitz, 1985; Sengupta and Cochran, 1991). Таким образом, в клетках, имеющих в геноме идиоморф *MATα*, экспрессируются только α -специфичные гены, а синтез a -специфичных белков

репрессирован; в клетках с идиоморфом *MATa* α -специфичные гены экспрессируются конститутивно (Lee and Haber, 2015). При нарушении экспрессии генов *MATa*, приводящем к отсутствию одновременно обоих белков *Mata1* и *Mata2*, α -клетка переключает тип спаривания на a (Инге-Вечтомов и др., 1986). Переключение типа спаривания $\alpha \rightarrow a$ может произойти в результате потери третьей хромосомы, потери правого плеча третьей хромосомы, мутаций и временных повреждений, возникших одновременно в обоих генах *MATa* или в двустороннем промоторе. Кроме того, в третьей хромосоме расположены кассеты с молчащей информацией о типах спаривания, *HMRa* и *HMLa* (Рисунок 6). В гетероталлических штаммах с низкой частотой происходит транспозиция генетической информации из кассеты *HMRa* в локус *MAT* с сопутствующим переключением типа спаривания с α на a . Также возможна рекомбинация между гомологичными участками локуса *MAT* и кассеты *HMRa*, сопровождающаяся потерей участка III хромосомы, расположенного между *HMRa* и *MATa*. Таким образом, при проведении «незаконной» гибридизации можно оценить общий уровень мутагенной активности изучаемых факторов по изменению частоты «незаконной» гибридизации. Анализируя фенотип «незаконных» гибридов, можно подсчитать частоту различных генетических изменений, таких как потеря III хромосомы, потеря плеча III хромосомы, конверсия кассеты *HMRa* в локус *MATa*, реципрокная рекомбинация между *MATa* и кассетой *HMRa*, а также частоту мутаций и временных повреждений в локусе *MAT*, возникших одновременно в обоих генах идиоморфа *MATa* или в двустороннем промоторе) (Таблица 4). Такой анализ можно сделать при условии использования штаммов, маркированных по обоим плечам хромосомы III. Удобными маркерами являются ген *HIS4* в левом плече и ген *THR4* – в правом плече (Рисунок 6).

Для определения частоты «незаконной» гибридизации клетки штамма-тестера и штамма-партнёра для спаривания растили в жидкой среде YEPD. Суспензию клеток высевали на среду для отбора гибридов по 100 мкл штамма-тестера и 100 мкл штамма-партнера для гибридизации Д926, предварительно сконцентрированного в 10 раз. Одновременно высевали суспензию клеток штаммов-тестеров на полную среду YEPD для оценки выживаемости. Частоту гибридизации определяли как отношение количества гибридов к общему числу клеток в культуре. Все эксперименты проводили не менее трех раз, при этом для каждого из исследуемых штаммов использовали 12 независимых культур в каждом эксперименте.

Отобранных гибридов распределяли по классам в соответствии с их фенотипом, для этого определяли тип спаривания незаконных гибридов и проверяли у них наличие ауксотрофности по гистидину и треонину. Для определения типа спаривания клетки каждого полученного гибрида скрещивали с тестерными штаммами a и α типов спаривания, ауксотрофными по гистидину (2Г-П2345 и 78А-П2345). По способности гибридов скрещиваться с тестерными штаммами

определяли тип спаривания гибридов: α , α или некопулирующий (n/m). В соответствии с типом спаривания и способностью расти на селективных средах без гистидина или треонина, гибриды относили к одному из классов, представленных в таблице 4.

Долю каждого класса гибридов определяли как соотношение числа гибридов этого класса к общему числу проверенных гибридов. Частоту каждого класса определяли как произведение доли класса на общую частоту гибридизации.

Таблица 4 - События, учитываемые в альфа-тесте, и фенотип «незаконных» гибридов

Генетическое событие	Фенотип «незаконного» гибрида
Конверсия кассеты <i>HMRa</i> в локус <i>MATa</i>	n/m His ⁺ Thr ⁺
Реципрокная рекомбинация между локусом <i>MATa</i> и кассетой <i>HMRa</i>	n/m His ⁺ thr ⁻
Потеря правого плеча III хромосомы	α His ⁺ thr ⁻
Потеря хромосомы III	α his ⁻ thr ⁻
Мутация в <i>MATa</i> (в <i>MATa1</i> или <i>MATa2</i>)	α His ⁺ Thr ⁺
Мутации в <i>MATa</i> (одновременно в <i>MATa1</i> или <i>MATa2</i> или в двустороннем промоторе, делеция <i>MATa</i>)	
Временные (первичные) повреждения в локусе <i>MATa</i> (одновременно в <i>MATa1</i> или <i>MATa2</i> , или в двустороннем промоторе), устраняемые репарацией безошибочно после скрещивания	

Примечание: Фенотип гибридов указан для случая скрещивания двух штаммов одинакового типа спаривания (α): тестерного штамма (*MATa HIS4 THR4*) и партнера для скрещивания (*MATa his4 thr4*). Маркер *his4* находится в левом, а маркер *thr4* в правом плечах хромосомы III.

2.11 Определение частоты прямых мутации устойчивости к канаванину в гене *CANI*

Частоту возникновения спонтанных мутаций устойчивости к L-канаванину в гене *CANI* (*can^r*) определяли как отношение числа мутантных клеток к общему числу живых клеток в культуре исследуемых штаммов. Для каждого из исследуемых штаммов использовали 12 независимых культур, выращенных в жидкой среде. Для определения частоты *can^r* 100 мкл

ночной культуры клеток дрожжей высевали на среду с канаванином. Одновременно высевали подходящие разведения (приблизительно 2×10^4) той же ночной культуры на полную среду YEPD для оценки выживаемости. Для определения частоты мутагенеза, индуцированного УФ-светом, суспензию клеток тестируемого штамма высевали на среду с канаванином, а затем облучали УФ-светом в течение 10 и 40 секунд (доза облучения составила соответственно 20 и 80 Дж/м²). Для оценки выживаемости аликвоты тех же ночных культур в подходящем разведении высевали на твердую среду YEPD и подвергали облучению в тех же условиях. Чашки инкубировали при 30 °С в течение 3-5 дней, после чего проводили подсчет колоний на каждой чашке. Частоту мутирования в каждой культуре определяли как соотношение количества выросших мутантных колоний к общему числу клеток в культуре с учетом фактора разведения культур. Для каждого из исследованных штаммов использовали 12 независимых культур, каждый эксперимент проводили не менее трех раз, определяли медиану частоты и 95% доверительный интервал.

2.12 Определение частоты полиплоидизации

Для определения частоты полиплоидизации мы использовали подход, разработанный нами в рамках данного исследования (Andreychuk et al., 2022). Для детекции диплоидных клонов, возникших в ночной культуре гаплоидного штамма, на первом этапе мы изолировали отдельные колонии исследуемого штамма, для этого разбавленную ночную культуру высевали на полную среду YEPD, при этом на каждой чашке вырастало 100-300 отдельных колоний. Затем выросшие отдельные колонии пересевали на полную среду YEPD в виде небольших штрихов (приблизительно 72 колонии на чашку). Через 24 ч инкубирования чашки перепечатывали на среду с канаванином, и облучали УФ-светом в течении 20 сек. (40 Дж/м²). Через 3-5 дней на отпечатках гаплоидных колоний появляются устойчивые к канаванину мутанты, на отпечатках ди- и полиплоидов такие колонии отсутствуют. Полиплоидность отобранных кандидатов затем была подтверждали методом проточной цитометрии. Частоту полиплоидизации определяли как отношение числа полиплоидов к общему числу проверенных колоний. Темп полиплоидизации рассчитывали как описано в статье (Andreychuk et al., 2022). Таким же образом была подсчитана частота и темп появления колоний с измененной частотой мутагенеза – тех клонов, у которых после облучения УФ на среде с канаванином вырастает меньшее или большее количество колоний Can^r , чем на отпечатке исходного штамма.

2.13 Определение частоты совместного возникновения приона [*PSI*⁺] и прямых мутаций в гене *CAN1*

Измерение частоты появления клеток, в которых одновременно возникли прион и мутации в гене *CAN1*, выполняли следующим образом. Дрожжи, трансформированные плазмидой pGAL1-SUP35, содержащей полноразмерный ген *SUP35* под контролем промотора *GAL1*, предварительно выращивали в жидкой минимальной среде, содержащей 2% раффинозы и необходимые добавки за исключением урацила. Через 24 часа культуру дрожжей разводили в 10 раз в жидкой минимальной среде, содержащей 2% галактозы и необходимые добавки кроме урацила, и выращивали в течение 48 часов. Затем культуру клеток дрожжей высевали на среду без аденина и содержащую канаванин для отбора клеток Ade⁺ Can^r. Затем каждую колонию проверяли на наличие приона [*PSI*⁺] по признаку отсутствия роста на среде без аденина после пассирования на среде с ГГХ. Параллельно суспензию клеток подходящего разведения высевали на минимальную среду без аденина для подсчета частоты прионизации и на среду с аденином и канаванином для подсчета частоты возникновения мутаций *can*^r, а также на полную среду YEPD для определения выживаемости. Теоретически ожидаемую частоту совместного возникновения приона [*PSI*⁺] и мутаций *can*^r определяли как произведение частоты возникновения мутаций *can*^r и частоты появления клонов с прионом [*PSI*⁺]. Затем сравнивали экспериментальную частоту совместных событий с теоретически ожидаемой. Измерения проводили для 6 независимых культур. Параллельно таким же образом проводили измерения частоты мутагенеза, частоты прионизации и частоты совместных событий для штамма, трансформированного контрольной плазмидой pRS316, не содержащей гена *SUP35*, для оценки частоты перечисленных событий при физиологическом уровне продукции белка Sup35.

2.14 Проточная цитометрия

Для определения ploидности штаммов дрожжей мы проводили оценку количества ДНК в клетках с использованием метода проточной цитометрии, в качестве контроля использовали штаммы с известной ploидностью. Для проведения измерения культуру клеток дрожжей выращивали в среде с добавлением аденина в конечной концентрации 100 мг/мл для ингибирования накопления красного пигмента в штаммах с мутацией *ade1-14*. Выращенные в такой среде клетки дрожжей осаждали при 3000 об/мин., фиксировали постепенным добавлением 70% этанола при постоянном помешивании и инкубировали при 4°C в течение минимум 2 часов. Затем клетки промывали водой и последовательно обрабатывали РНКазой («ThermoScientific», США) в течение 6 часов при 37°C и протеиназой К («Евроген», Россия) при 50°C в течение 1 часа.

Для проведения проточной цитометрии суспензию дрожжевых клеток разводили в буфере 50 мМ Трис pH 7,5 до достижения оптической плотности при 600 нм = 0,1 – 0,2, затем клетки обрабатывали красителем пропидиум йодид (PI, «Sima-Aldrich», США) в финальной концентрации 5 мкг/мл. Проточную цитометрию проводили на базе научного парка Санкт-Петербургского государственного университета в ресурсном центре "Развитие молекулярных и клеточных технологий" на проточном сортирующем цитофлуориметре BD FACS Aria 3, («BD Biosciences», США). Для определения флуоресценции PI на проточном цитометре использовали лазер с длиной волны 488 нм с фильтром 616/23-нм. Для оценки интенсивности флуоресценции анализировали 100000 клеток для каждого образца. Построение гистограмм и диаграмм интенсивности флуоресценции для PI и подсчет статистических параметров осуществляли с помощью программного обеспечения FlowJo («BD Biosciences», США).

2.15 Выделение геномной ДНК из дрожжей *S. cerevisiae*

Геномную ДНК для полногеномного секвенирования выделяли из ночной культуры клеток, выращенных в жидкой полной среде. Клетки из 10 мл ночной культуры осаждали центрифугированием и затем ресуспендировали в 0,5 мл раствора (0,1 М Трис-HCl, pH 8,0, 50 мМ ЭДТА («PanReac AppliChem», Германия), 1 % SDS («Sigma-Aldrich», США)), добавляли 25 мкл 5 М NaCl и 200-500 мкл стеклянных шариков 150-212 мкм («Sigma-Aldrich», США), клетки дрожжей разрушали интенсивным встряхиванием в течение 1 мин, затем клетки инкубировали на льду 1 мин, цикл повторяли 6 раз. Лизат клеток центрифугировали, а водную фазу переносили в чистую пробирку и добавляли 200 мкл фенола («Ленреактив», Россия) и 200 мкл 4% изоамилового спирта, растворенного в хлороформе («HiMedia», Индия), тщательно перемешивали и осаждали, водную часть переносили в чистую пробирку, данный этап повторяли 5 раз. Затем к очищенной водной фракции добавляли 1/10 объема 3 М ацетата натрия и 2,5 объема холодного 95% этанола, перемешивали и инкубировали при температуре -20 °С в течение часа. После инкубации центрифугировали в течение 10 минут при 10000 об./мин., осадок промывали 75% раствором этанола и высушивали. Осадок растворяли в воде и обрабатывали РНКазой А фирмы «ThermoScientific» в течение 1 часа при 37 °С, а затем однократно очищали раствором фенол-изоамил-хлороформа, и осаждали ДНК 95% этанолом как описано выше. Полученный осадок, содержащий геномную ДНК, растворяли в воде. Концентрацию ДНК измеряли флуориметром Quantus фирмы Promega, США, в ресурсном центре СПбГУ «Развитие молекулярных и клеточных технологий».

2.16 Полногеномное секвенирование

Полногеномное секвенирование проводили на приборе illumina HiSeq 4000, («Illumina», США) с использованием набора для приготовления библиотек TruSeq DNA («Illumina», США) в ресурсном центре СПбГУ «Развитие молекулярных и клеточных технологий». Для расчета и визуализации метрик качества коротких прочтений до и после обрезки по качеству использовали программу FastQC (Babraham Bioinformatic, Великобритания). Очистку коротких прочтений по качеству проводили с использованием программы bbdduk (sourceforge.net/projects/bbmap/). Выравнивание коротких прочтений образцов проводили на референсный геном дрожжей *S. cerevisiae* штамма S288C R64-3-1 с помощью алгоритма BWA-MEM (Li, 2014). Дубликаты в выравниваниях маркировали с использованием программы picardMarkDuplicates (<https://broadinstitute.github.io/picard/>). Качества выравнивания полученных файлов в формате BAM оценивали с помощью инструментов Qualimap 2 (<http://qualimap.conesalab.org/>), plotCoverage, Picard и SAMtools (Li et al., 2009). Поиск однонуклеотидных замен и мутаций по типу вставок-выпадения (инделов) проводили по протоколу GATK с использованием GATK HaplotypeCaller (Lefouili and Nam, 2022) с указанием ploidy 1 и параметром ERC для совместного генотипирования образцов. Полученные варианты фильтровали с использованием параметров hardfiltration для однонуклеотидных замен и инделов по протоколу GATK Hard-filtering (De Summa et al., 2017), и дополнительно по параметру DP<20. Структурные вариации определяли с помощью алгоритма delly по протоколу для наследуемых вариантов, рассматривали только гомозиготные варианты. Оценку изменений числа копий проводили с использованием программы CNVkit (Talevich et al., 2014) с параметрами для учета ploidy log2: пороговые значения -1,0, 0,5849625, 1,3219281, 1,8073549, и 2,1699250, forcorynumbers 0 - 4.

2.17 Статистические методы.

При определении частоты «незаконной» гибридизации, мутагенеза, прионизации, а также частоты совместного возникновения приона [*PSI*⁺] и мутаций в гене *CAN1* использовали стандартный метод вычисления медианы и доверительных интервалов для медианы (Готов и др., 1982). Сравнение значений частоты, полученных для независимых культур, проводили с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни при $p < 0,01$. Сравнение теоретически ожидаемой и экспериментальной частоты одновременного возникновения приона [*PSI*⁺] и мутаций в гене *CAN1* проводили с помощью непараметрического критерия Вилкоксона для зависимых выборок при $p < 0,01$.

3 РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1 ОЦЕНКА ПАРАМЕТРОВ МУТАГЕНЕЗА У ШТАММОВ С $[PSI^+]$ И $[PIN^+]$ ИЗ КОЛЛЕКЦИИ КАФЕДРЫ ГЕНЕТИКИ И БИОТЕХНОЛОГИИ СПбГУ

3.1.1. Фенотипическая характеристика штаммов с прионом $[PSI^+]$

На первом этапе работы мы провели фенотипический анализ штаммов $[PSI^+]$, имеющих в коллекции кафедры генетики и биотехнологии. Для анализа уровня стабильности генома у этих штаммов использовали такой признак, как спонтанный уровень мутагенеза, который оценивали с использованием альфа-теста в варианте теста на «незаконную» гибридизацию. В работе использовали штаммы $[psi^-]$ 33Г-Д373 и К5-35В-Д924-ade1-14 и несколько изогенных им независимых клонов $[PSI^+]$, полученных ранее. Мы определили частоту «незаконной» гибридизации у штаммов с прионом $[PSI^+]$ в сравнении с изогенными штаммами $[psi^-]$. Результаты представлены в таблице 5. У всех проверенных штаммов, несущих прион $[PSI^+]$, частота «незаконной» гибридизации оказалась снижена по сравнению с изогенными штаммами без приона.

Таким образом, проверенные нами штаммы с прионом $[PSI^+]$ отличаются от изогенных штаммов $[psi^-]$ по такому признаку, как частота «незаконной» гибридизации, которая отражает общий уровень дестабилизации генома, так как в тесте на «незаконную» гибридизацию учитываются различные типы генетических изменений.

Таблица 5 - Частота «незаконной» гибридизации (медиана и 95% доверительный интервал)

Штамм	Наличие $[PSI^+]$	Частота «незаконной» гибридизации ($\times 10^{-6}$)
33Г-Д373	$[psi^-]$	12,8 (10,1 – 14,1)
33Г-373-61	$[PSI^+]$	5,8 (4,1 – 9,4) *
33Г-373-72	$[PSI^+]$	4,4 (2,9 – 5,0) *
33Г-373-74	$[PSI^+]$	3,0 (2,3 – 3,5) *
К5-35В-Д924-ade1-14 клон 1	$[psi^-]$	5,5 (4,5 – 8,5)
К5-35В-Д924-ade1-14 1-1	$[PSI^+]$	1,9 (1,2 – 2,1) *
К5-35В-Д924-ade1-14 1-6	$[PSI^+]$	2,5 (1,6 – 2,9) *
К5-35В-Д924-ade1-14 клон 2	$[psi^-]$	6,1 (5,1 – 7,3)
К5-35В-Д924-ade1-14 2-3	$[PSI^+]$	0,72 (0,3 – 1,0) *
К5-35В-Д924-ade1-14 2-5	$[PSI^+]$	0,73 (0,5 – 1,2) *

Примечание: * – обозначены статистически значимые отличия от соответствующего штамма без приона, по критерию Манна-Уитни, $p < 0,01$

3.1.2 Фенотипическая характеристика штаммов с прионом [PIN^+]

Поскольку индукция образования приона [PSI^+] происходит на фоне приона [PIN^+], мы также оценили спонтанный уровень мутагенеза с применением теста на «незаконную» гибридизацию у штамма K5-35B-Д924-ade1-14 [pin^-] [psi^-] и двух изогенных ему штаммов K5-35B-Д924-ade1-14 [PIN^+] [psi^-], которые также имеются в генетической коллекции кафедры генетики и биотехнологии СПбГУ. Мы не обнаружили статистически значимых отличий между значениями частоты образования «незаконных» гибридов у исследованных штаммов (Таблица 6).

Таблица 6 - Частота «незаконной» гибридизации (медиана и доверительный интервал)

Штамм	Частота «незаконной» гибридизации ($\times 10^{-6}$)
K5-35B-Д924-ade1-14 [PIN^+] [psi^-] клон 1	5,5 (4,5 – 8,5)
K5-35B-Д924-ade1-14 [PIN^+] [psi^-] клон 2	6,1 (5,1 – 7,3)
K5-35B-Д924-ade1-14 [pin^-] [psi^-]	7,6 (5,5 – 8,6)

На первом этапе работы нам удалось выявить, что у нескольких штаммов с прионом [PSI^+], имеющих в коллекции кафедры генетики и биотехнологии СПбГУ, полученных на разном генотипическом фоне, снижена частота «незаконной» гибридизации, при этом мы не выявили изменения частоты «незаконной» гибридизации в штамме, несущем только прион [PIN^+]. В связи с этим возникла необходимость более детального изучения обнаруженного явления. Остались открытыми следующие вопросы: (а) всегда ли наличие приона [PSI^+] приводит к снижению частоты «незаконной» гибридизации; (б) возможно ли существование различных вариантов приона, по-разному влияющих на параметры мутагенеза; (в) на частоту возникновения каких генетических изменений (генных, хромосомных или геномных мутаций) влияет прион [PSI^+]. Нельзя исключать, что на результаты, полученные в ходе выполнения первого этапа работы, мог повлиять тот факт, что использованные штаммы [PSI^+] были получены относительно давно и долгое время хранились в коллекции при температуре -70°C . Длительное хранение могло сказаться на свойствах приона. Поскольку изменение фенотипа было выявлено только в штаммах с прионом [PSI^+], дальнейшая работа была сфокусирована на исследовании влияния именно этого приона. Мы сформулировали три рабочих гипотезы, каждая из которых предполагает различные типы взаимосвязи между амилоидогенезом и появлением генетических изменений:

1. Прион [PSI^+] влияет на частоту наследуемых изменений в геноме.
2. Изменения в геноме влияют на частоту прионизации Sup35.

3. Прион [PSI^+] и мутации возникают одновременно, вероятно под действием общего индуцирующего фактора.

Дальнейшие исследования были направлены на проверку каждой из сформулированных гипотез.

3.2 ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ПРИОНА [PSI^+] НА ЧАСТОТУ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ РАЗЛИЧНЫХ ТИПОВ

3.2.1 Создание коллекции штаммов [PSI^+] и их фенотипическая характеристика

Поскольку у всех проверенных штаммов с прионом [PSI^+] из генетической коллекции кафедры генетики и биотехнологии СПбГУ было обнаружено снижение частоты «незаконной» гибридизации, мы предположили, что наличие приона в клетке может влиять на частоту генетических изменений, учитываемых в системе «незаконной» гибридизации (Гипотеза 1). Для проверки этого предположения мы получили коллекцию изогенных штаммов, несущих прион [PSI^+] на фоне штамма K5-35B-Д924-ade1-14 [PIN^+] [psi^-] и измерили частоту «незаконной» гибридизации у каждого из полученных клонов [PSI^+] в сравнении с исходным штаммом. Каждому штамму был присвоен порядковый номер, наличие приона мы проверяли по способности расти на среде без аденина, которая исчезала после пассирования клеток на среде с ГГХ. Дополнительно мы проверяли наличие приона [PSI^+] по образованию светящихся фокусов в клетках, несущих плазмиду для сверхпродукции химерного белка Sup35NM-YFP (Рисунок 7). Штаммы [PSI^+] мы получали несколькими способами: 50 независимых клонов [PSI^+] были получены с помощью сверхпродукции белка Sup35, 7 клонов – с помощью экспрессии прионизирующего пептида в штамме [pin^-], трансформированного плазмидой pEMBL- Δ Bal2, еще 7 штаммов [PSI^+] – путем переноса приона методом белковой трансформации из других штаммов [PSI^+]. В последнем случае в качестве доноров приона были использованы штаммы, любезно предоставленные сотрудником кафедры генетики и биотехнологии биологического факультета СПбГУ Станиславом Александровичем Бондаревым (название штаммов-доноров и их описание в соответствующем разделе материалов и методов). Таким образом с использованием различных методов индукции [PSI^+] мы создали коллекцию, состоящую из 64 независимых штаммов. В полученную нами коллекцию вошли штаммы, несущие варианты приона, различающиеся по силе супрессии нонсенс-мутаций, оцениваемой по интенсивности окраски колоний и скорости роста на среде без аденина.

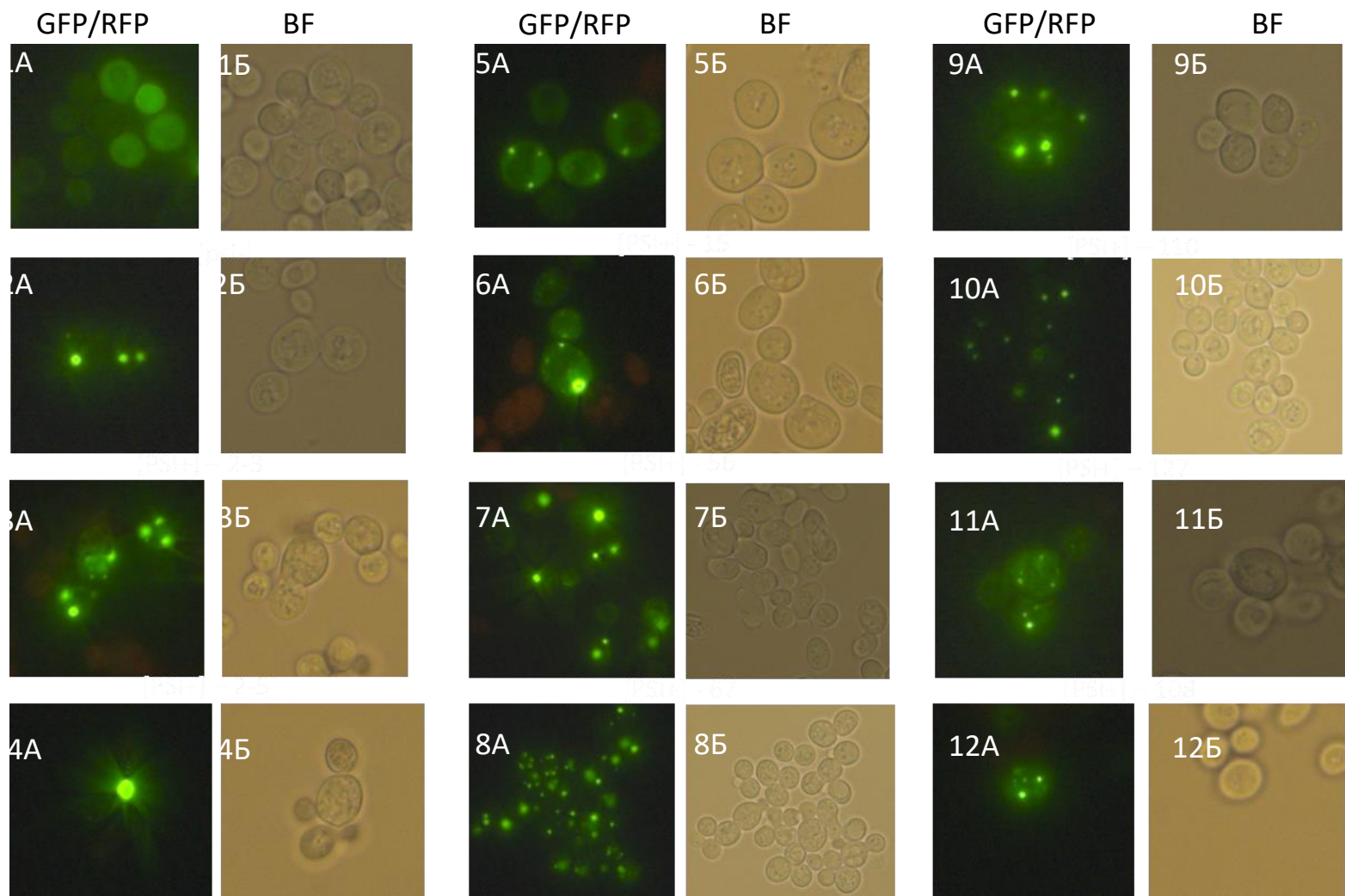


Рисунок 7. Анализ агрегации химерного белка Sup35NM-YFP в клетках штаммов дрожжей $[PSI^+]$ и контрольном штамме $[psi^-]$, использованных в работе. (А – флуоресцентная микроскопия, Б – клетки дрожжей в проходящем свете).
 1 А, Б – $[psi^-]$, 2 А, Б – $[PSI^+]$ -2-3, 3 А, Б – $[PSI^+]$ -2-5, 4 А, Б – $[PSI^+]$ -39, 5 А, Б – $[PSI^+]$ -15, 6 А, Б – $[PSI^+]$ -56, 7 А, Б – $[PSI^+]$ -67, 8 А, Б – $[PSI^+]$ -84,
 9 А, Б – $[PSI^+]$ -110, 10 А, Б – $[PSI^+]$ -127, 11 А, Б – $[PSI^+]$ -108, 12 А, Б – $[PSI^+]$ -4.

У полученных клонов мы измерили значение частоты «незаконной» гибридизации. Было обнаружено, что большинство штаммов [*PSI*⁺] (56 из 64) не отличается от изогенного штамма [*psi*⁻] по частоте «незаконной» гибридизации (Таблица 7).

Таблица 7 - Фенотип клонов [*PSI*⁺], полученных в данной работе.

Способ получения штаммов [<i>PSI</i> ⁺]	Число штаммов [<i>PSI</i> ⁺], у которых частота «незаконной» гибридизации		
	не отличается от [<i>psi</i> ⁻]	снижена по сравнению с [<i>psi</i> ⁻]	повышена по сравнению с [<i>psi</i> ⁻]
[<i>PIN</i> ⁺] [<i>PSI</i> ⁺], сверхэкспрессия <i>SUP35</i>	42	7	1
[<i>pin</i> ⁻] [<i>PSI</i> ⁺], сверхпродукция прионизирующего пептида	7	0	0
[<i>PIN</i> ⁺] [<i>PSI</i> ⁺], перенос приона методом белковой трансформации	7	0	0

Среди вновь полученных вариантов [*PSI*⁺] мы обнаружили 8 вариантов, у которых частота «незаконной» гибридизации отличалась от контрольного родительского штамма без приона: у семи из них частота была снижена (штаммы № 15, 39, 56, 67, 84, 110, 127), у одного повышена (клон № 108) (Таблица 8). В дальнейшей работе были исследованы 10 клонов, кроме перечисленных клонов [*PSI*⁺] с измененной частотой незаконной гибридизации, в анализ были также включены изогенные штаммы № 2-5 и № 2-3, полученные ранее (см. рисунок 5) и у которых также была снижена частота незаконной гибридизации (Таблица 5). В ходе регулярной проверки фенотипа штаммов выяснилось, что один из клонов (2-3) изначально имевший тип спаривания α потерял способность к скрещиванию с обоими тестерами и приобрёл фенотип n/m (non-mater) (Таблица 8). Поскольку альфа-тест можно проводить только с использованием штаммов типа спаривания α для клона № 2-3 альфа-тест не проводили.

Таблица 8. Фенотип штаммов [*PSI*⁺] с измененной частотой «незаконной» гибридизации.

№ штамма с прионом [<i>PSI</i> ⁺]	15	39	56	67	84	110	127	108	2-5	2-3
Тип спаривания	α	α	α	α	α	α	α	α	α	n/m
Изменение частоты «незаконной» гибридизации	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↑	↓	↓*

Примечание:

↓ – частота незаконной гибридизации снижена по сравнению с исходным штаммом [*psi*⁻]

↑ – частота незаконной гибридизации повышена по сравнению с исходным штаммом [*psi*⁻]

* – частота незаконной гибридизации снижена из-за типа спаривания n/m

3.2.2 Параметры спонтанного и индуцированного УФ-мутагенеза штаммов [*PSI*⁺] с измененным значением частоты «незаконной» гибридизации

У десяти отобранных для дальнейшего изучения штаммов [*PSI*⁺] с измененной частотой «незаконной» гибридизации мы оценили частоту возникновения прямых мутаций в гене устойчивости к канаванину *CAN1*. Предварительно, мы провели качественный тест на индукцию мутаций *can*^r. Штаммы 15, 56, 67, 84 не образовывали мутантные колонии даже после облучения УФ, кроме того, низкая частота спонтанных мутаций *can*^r и мутаций, индуцированных УФ, была отмечена и у клонов 2-5 и 2-3. У клонов [*PSI*⁺] № 2-5, 39, 108, 110 и 127 мы определили частоту прямых мутаций *can*^r в количественном тесте. В тесте на индукцию прямых мутаций в гене *CAN1* были получены результаты, соответствующие результатам, полученным в альфа-тесте: у штаммов [*PSI*⁺] со сниженной частотой «незаконной» гибридизации мы зафиксировали снижение частоты возникновения мутаций *can*^r по сравнению с родительским штаммом [*psi*⁻] (кроме клона 39, у которого частота спонтанного мутагенеза не отличалась от штамма [*psi*⁻]), а у штамма [*PSI*⁺], характеризующегося повышенной частотой «незаконной» гибридизации, частота мутаций *can*^r была повышена (Таблица 9).

Таблица 9 - Частота «незаконной» гибридизаций и частота прямых мутаций *can^r* (медиана и 95 % доверительный интервал).

штамм	Частота «незаконной» гибридизации ($\times 10^{-6}$)	Частота мутаций <i>can^r</i> ($\times 10^{-7}$)
[<i>psi</i>]	44 (35-65)	15,8 (14-21,5)
[<i>PSI⁺</i>] - 2-5	11,4 (6-19) *	4,0 (3,7-5,2) *
[<i>PSI⁺</i>] - 39	18 (14,2-23,4) *	19,2 (13,0-25,4)
[<i>PSI⁺</i>] - 108	247 (167-270) *	3290 (1290-12128) *
[<i>PSI⁺</i>] - 110	4,7 (4-7) *	8,5 (6,3 – 9,2) *
[<i>PSI⁺</i>] - 127	5,4 (3,4 – 8,4) *	7,2 (5,3 – 9,7) *

Примечание. * – обозначены статистически значимые отличия от соответствующего значения для штамма [*psi*], по критерию Манна-Уитни, $p < 0,01$

Для того, чтобы определить параметры индуцированного мутагенеза у различных штаммов [*PSI⁺*] мы исследовали эффект УФ излучения в различных дозах (20 и 80 Дж/м²) на частоту мутаций у некоторых отобранных нами штаммов. Мы показали, что облучение УФ по-разному влияет на мутагенез у разных штаммов [*PSI⁺*] (Рисунок 8). У штамма, несущего прион [*PSI⁺*] – 2-5, облучение УФ не приводило к значительному повышению частоты мутагенеза (Рисунок 8Б). Так, облучение УФ в дозе 80 Дж/м² штамма без приона повышает частоту мутирования примерно в 100 раз, тогда как облучение штамма с прионом [*PSI⁺*] – 2-5 – только в 10 раз. У штамма, несущего другой вариант приона [*PSI⁺*] – 127 облучение УФ приводило к повышению частоты мутагенеза. Тем не менее, при одинаковых дозах воздействия УФ частота мутагенеза у штамма с прионом была все же ниже, чем у штамма без приона (Рисунок 8Г). У штамма, несущего третий вариант приона [*PSI⁺*] – 108, обладающего повышенной частотой «незаконной» гибридизации, индукции мутагенеза при облучении УФ не было обнаружено (Рисунок 8Е), кроме того, при подсчёте выживаемости этот штамм образовывал значительно меньшее количество колоний по сравнению с другими штаммами, как спонтанно, так и при воздействии УФ. Такой фенотип характерен для штаммов с мутаторным фенотипом (штаммы с повышенной частотой спонтанного мутагенеза, например, из-за мутаций в генах, кодирующих ферменты, участвующие в репарации ДНК).

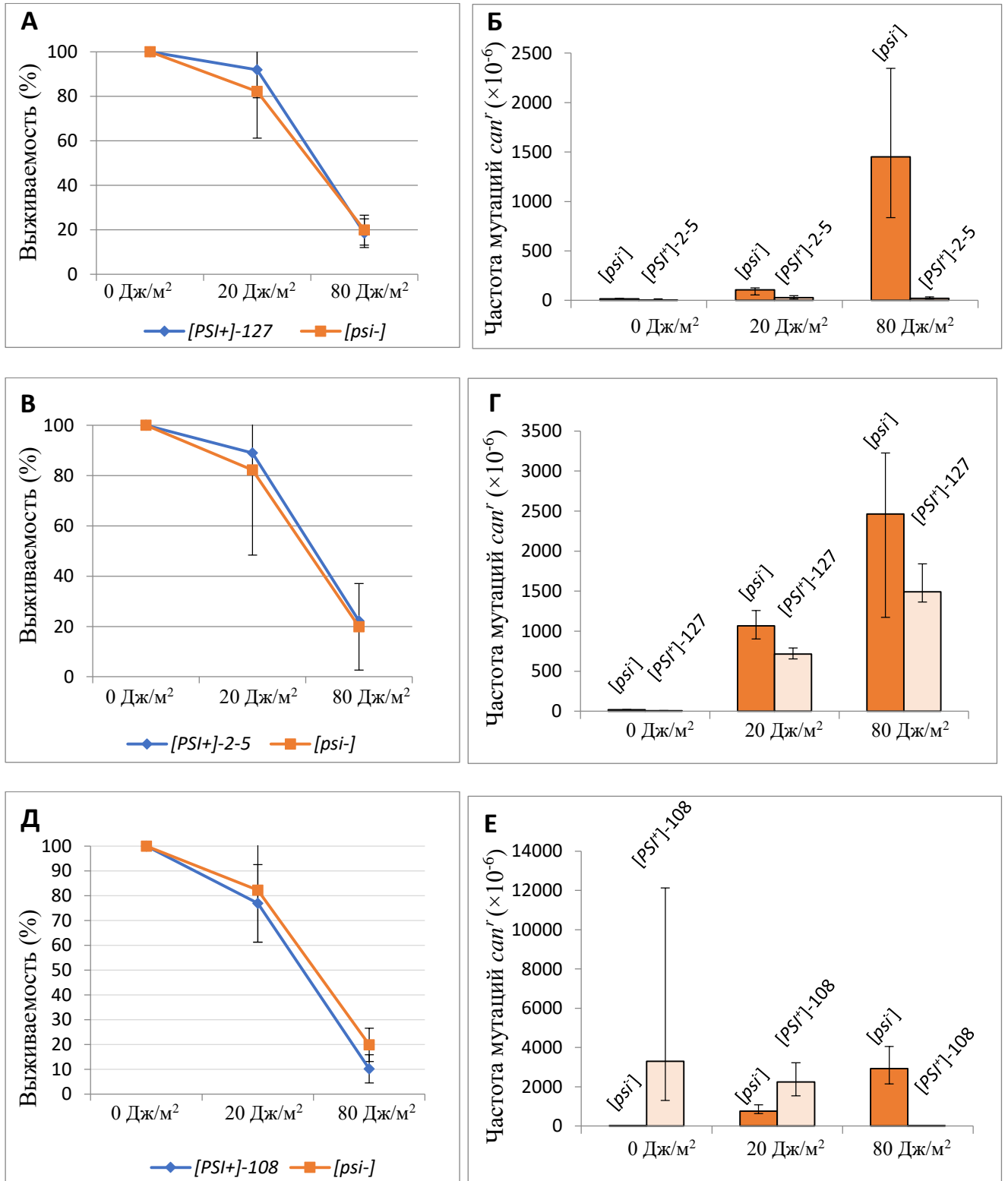


Рисунок 8 – Частота спонтанного и индуцированного УФ мутагенеза у штаммов [PSI⁺] и [psi⁻] (Б, Г и Е), и выживаемость клеток соответствующих вариантов [PSI⁺] под действием УФ (А, В и Д).

3.2.3. Спектр генетических изменений, учитываемых в альфа-тесте у штаммов [*PSI*⁺] – 2-5 и 127

Для того, чтобы оценить частоту различных генетических событий, учитываемых в альфа-тесте (см. соответствующий раздел «Материалы и методы», Таблица 4), мы провели анализ фенотипа «незаконных» гибридов, возникших при проведении альфа-теста для двух штаммов [*PSI*⁺]. Мы показали, что у штаммов [*PSI*⁺] 2-5 и 127 снижена частота возникновения гибридов двух классов, а именно гибридов, возникших в результате: (1) потери хромосомы III и (2) мутаций и временных повреждений *MATa*, (Таблица 10).

Таблица 10 - Частота возникновения «незаконных» гибридов различных классов в скрещиваниях $\alpha \times \alpha$ ($\times 10^{-8}$) (медиана и 95 % доверительный интервал).

Генетическое нарушение	Штамм		
	[<i>PIN</i> ⁺] [<i>psi</i>]	[<i>PIN</i> ⁺] [<i>PSI</i> ⁺] - 2-5	[<i>PIN</i> ⁺] [<i>PSI</i> ⁺] - 127
Мутации и временные повреждения	4,0 (3,4-4,7)	1,8* (1,1-2,1)	0,6* (0,4-0,9)
Конверсия кассеты <i>HMRa</i> в локус <i>MAT</i>	0,17 (0,14-0,2)	1,02* (0,7-1,2)	0,08* (0,05-0,1)
Потеря правого плеча III хромосомы	7,1 (6,1-8,3)	9,0 (5,8-10,7)	3,8* (2,4-6,0)
Рекомбинация между <i>HMRa</i> и <i>MATa</i>	0,29 (0,24-0,34)	0,1× (0,07-0,12)	0,008* (0,005-0,013)
Потеря III хромосомы	49,5 (42,0-58,0)	3,32* (2,2-4,0)	0,92* (0,6-1,4)
Частота возникновения мутантов, устойчивых к канаванину	158 (126-215)	40* (23-150)	72* (50-95)

Примечание: * – обозначены статистически значимые изменения по критерию Манна-Уитни, $p < 0,01$

Таким образом, мы проверили более 50 независимо полученных штаммов с прионом [*PSI*⁺], у большинства из них мы не выявили отличий по частоте «незаконной» гибридизации, тем не менее, у меньшей, но значительной доли проверенных штаммов с прионом [*PSI*⁺] частота «незаконной» гибридизации отличается от штамма без приона. Обращает на себя внимание тот факт, что отобранные штаммы характеризуются различными параметрами спонтанного и индуцированного мутагенеза (Таблица 11). Из 10 отобранных штаммов 4 штамма не мутируют совсем после облучения УФ, у штамма [*PSI*⁺] - 108 частота «незаконной» гибридизации и мутагенеза повышена, у штаммов [*PSI*⁺] - 2-5 и 2-3 под действием УФ индукция мутаций происходит слабее, чем у [*psi*], кроме того, у штамма 2-3 изменен тип спаривания, это может свидетельствовать о наличии у них различных генетических нарушений, таких как генные

мутации или хромосомные перестройки. Следующий этап работы был направлен на установление причинно-следственной связи между изменениями параметров мутагенеза у изучаемых штаммов и наличием [PSI^+].

Таблица 11 - Фенотип штаммов с прионом [PSI^+], изучаемых в данной работе.

№	Клоны штамма K5-35B-Д924 -ade1-14	Фенотип			
		частота «незаконной» гибридизации	частота спонтанного мутагенеза	частота УФ-индуцированного мутагенеза	тип спаривания
1	[PSI^+] - 2-3	снижена	снижена	нет индукции	n/m
2	[PSI^+] - 2-5	снижена	снижена	нет индукции	α
3	[PSI^+] - 39	снижена	нет отличий от штамма [psi^-]	нет отличий от штамма [psi^-]	α
4	[PSI^+] - 108	повышена	повышена	чувствителен к УФ	α
5	[PSI^+] - 110	снижена	снижена	снижена	α
6	[PSI^+] - 127	снижена	снижена	снижена	α
7	[PSI^+] - 15	снижена	0*	нет индукции	α
8	[PSI^+] - 56	снижена	0*	нет индукции	α
9	[PSI^+] - 67	снижена	0*	нет индукции	α
10	[PSI^+] - 84	снижена	0*	нет индукции	α

Примечание: * - штаммы не образуют мутантные колонии Can^r.

3.2.4 Проверка прямого влияния [PSI^+] на стабильность генетического материала

Для того чтобы определить, является ли причиной обнаруженных у некоторых штаммов [PSI^+] изменений параметров спонтанного и индуцированного мутагенеза непосредственно наличие самого приона или выявленные нами изменения опосредованы наследуемыми изменениями в геноме, мы проверили как на частоту «незаконной» гибридизации влияет потеря приона у этих штаммов (Рисунок 9А) и сопровождается ли перенос приона в исходный родительский штамм [psi^-] методом белковой трансформации (Рисунок 9Б) аналогичными

изменениями количественных характеристик мутагенеза. Для этого с помощью переноса приона в изогенный штамм [*psi*⁻] мы получили новые клоны [*PSI*⁺]. Мы отобрали по несколько клонов [*PSI*⁺] для каждого варианта приона (по 3-4 клона) и определили у полученных клонов частоту «незаконной» гибридизации в сравнении с родственными штаммами [*PSI*⁺] и [*psi*⁻]. Для изгнания приона [*PSI*⁺] в исследуемых штаммах мы использовали сверхпродукцию шаперона Hsp104, в каждом случае мы получили по 2 клона [*psi*⁻] от каждого штамма с прионом. У полученных штаммов [*psi*⁻] мы также оценили частоту «незаконной» гибридизации. В ходе указанных экспериментов мы проверяли следующую рабочую гипотезу: если наблюдаемые изменения параметров мутагенеза (снижение или повышение частоты незаконной гибридизации и прямых мутаций *can*^r) вызваны присутствием приона, то у штамма-реципиента приона [*PSI*⁺] после привнесения приона параметры мутагенеза должны соответствовать значениям, наблюдаемым у штамма-донора приона. Кроме того, при изгнании приона вместе с ним должен исчезать изучаемый фенотип – частота «незаконной» гибридизации и мутаций *can*^r должна вернуться к значениям, наблюдаемым у исходного штамма [*psi*⁻].

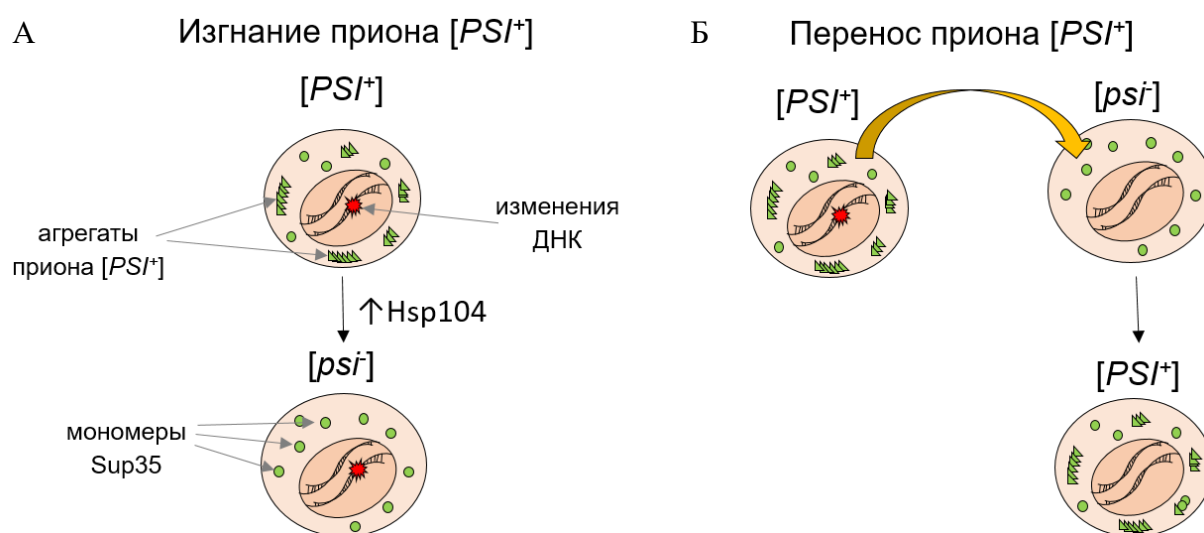


Рисунок 9 - Схема эксперимента по оценке влияния приона [*PSI*⁺] на изменение параметров мутагенеза. **А.** Изгнание приона из штаммов [*PSI*⁺]. При сверхпродукции белка Hsp104 клетки дрожжей теряют прион [*PSI*⁺], при этом в геноме сохраняются генетические изменения. В данном эксперименте сравнивали частоту «незаконной» гибридизации до и после изгнания приона. **Б.** При переносе приона в штамм [*psi*⁻] методом белковой трансформации клетки приобретают прион [*PSI*⁺] от донора, а возможные генетические изменения при этом не передаются реципиенту. В этом случае частоту «незаконной» гибридизации у полученного штамма [*PSI*⁺], измеренную после переноса приона, сравнивали с частотой «незаконной» гибридизации у штамма-донора ([*PSI*⁺]) и штамма-реципиента приона ([*psi*⁻]).

В ходе проверки этой гипотезы мы установили, что у штаммов [*PSI*⁺] - 39, [*PSI*⁺] - 127 и [*PSI*⁺] – 110 потеря приона не приводит к изменению частоты «незаконной» гибридизации (Таблица 12). Оба клона [*psi*⁻], полученных от штамма [*PSI*⁺] 2-5 вообще не образовывали

незаконных гибридов, а у штамма $[PSI^+]$ – 108 частота «незаконной» гибридизации после потери приона оказалась ниже, чем у исходного штамма $[psi^-]$. Тем не менее, ни у одного из проверенных штаммов потеря приона не приводила к восстановлению значения частоты «незаконной» гибридизации, характерного для исходного штамма $[psi^-]$. Аналогичные результаты были получены при переносе приона в родительский штамм $[psi^-]$. За исключением некоторых случаев, частота «незаконной» гибридизации у новых клонов с прионом, статистически значимо отличается от частоты «незаконной» гибридизации, наблюдавшейся у штамма-донора соответствующего варианта $[PSI^+]$ (Таблица 12). Таким образом, наличие приона само по себе не является причиной изменения значений частоты «незаконной» гибридизации, вероятно, на проявление этого признака влияют изменения в геноме, возникшие в отобранных нами штаммах $[PSI^+]$.

Таблица 12 - Частота «незаконной» гибридизации (медиана и 95 % доверительный интервал) у клонов $[PSI^+]$, полученных переносом приона из штамма-донора и в штаммах, полученных после изгнания $[PSI^+]$.

Штамм-донор приона	Частота «незаконной» гибридизации штамма с прионом	Частота «незаконной» гибридизации штаммов с прионом $[PSI^+]$, полученных с помощью переноса приона из штамма - донора приона	Частота «незаконной» гибридизации у штаммов без приона, полученных изгнанием приона из штаммов $[PSI^+]$	Частота «незаконной» гибридизации у штамма $[psi^-]$ (измерение проводили в каждом эксперименте)
$[PSI^+]$ - 2-5	1,2 (0,9 – 1,9)	11,5* (8,9 – 13,6)	0**	9,8* (7,2 – 10,5)
$[PSI^+]$ - 39	3,0 (1,9 – 4,0)	1,8 (1,1 – 2,7)	2,9 (2,2 – 34,1)	6,1* (5,3 – 7,5)
$[PSI^+]$ - 108	214,5 (118 – 256)	6,8* (4,4 – 8,9)	0,09* (0,12 – 0,2)	6,1* (5,3 – 7,5)
$[PSI^+]$ - 110	0,4 (0,2 - 0,6)	3,0* (2,4 – 3,5)	0,43 (0,35 – 1,4)	5,6* (4,9 – 7,3)
$[PSI^+]$ - 127	0,36 (0,22 – 0,5)	5,9* (3,9 – 7,0)	0,15 (0,03 – 0,4)	5,6* (4,9 – 7,3)

Примечание:

* – обозначены статистически значимые отличия значения частоты «незаконной» гибридизации от штамма $[PSI^+]$ по критерию Манна-Уитни ($p < 0,01$)

** – очень низкая частота «незаконной» гибридизации (не было получено «незаконных» гибридов)

3.3 ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ В ШТАММАХ [*PSI*⁺]

3.3.1 Генетические изменения, обнаруженные в штаммах [*PSI*⁺] с измененными параметрами мутагенеза

Для идентификации генетических изменений в геноме штаммов были выполнены проточная цитометрия и полногеномное секвенирование. Среди отобранных нами штаммов [*PSI*⁺] были штаммы, которые совсем не образовывали рецессивных мутаций *can*^r под действием УФ (штаммы [*PSI*⁺] – 15, 56, 67 и 84), такой фенотип часто свидетельствует о полиплоидности. Мутации в гене *CAN1* рецессивны, а поскольку в геноме диплоидов содержатся две копии гена *CAN1* дикого типа, то частота появления устойчивых к канаванину колоний у таких штаммов ниже, чем у гаплоидов, содержащих только одну копию гена. Поэтому мы проверили плоидность 10 отобранных штаммов [*PSI*⁺], а также штамма без приона [*psi*⁻] методом проточной цитометрии. Было выявлено, что четыре штамма с предполагаемой дупликацией генома (клоны [*PSI*⁺] – 15, 56, 67 и 84) действительно являются диплоидами. Этим объясняется низкая частота спонтанного и индуцированного УФ мутагенеза у этих штаммов.

У гаплоидных штаммов [*PSI*⁺] – 2-5, [*PSI*⁺] – 2-3, [*PSI*⁺] – 39, [*PSI*⁺] – 108, [*PSI*⁺] – 110, [*PSI*⁺] – 127 и штамма без приона (фенотипическая характеристика этих штаммов представлена в таблице 11) были просеквенированы геномы. Проанализированные геномы сравнивали с геномом изогенного штамма [*psi*⁻]. Выравнивание коротких прочтений во всех случаях проводили на геном штамма S288C. У всех штаммов было подтверждено наличие делеций в генах *URA3* и *LEU2*, нонсенс-мутации в гене *ADE2*. В геноме каждого из перечисленных штаммов были обнаружены 10-14 уникальных точковых мутаций, из которых одна является значащей. У некоторых штаммов [*PSI*⁺] нам удалось обнаружить хромосомные нарушения. В геноме всех проанализированных штаммов [*PSI*⁺] мы выявили генетические изменения (мутацию или дупликацию хромосомы), которые позволяют объяснить изменение параметров мутагенеза, характерные для носителей этих мутаций. Перечень выявленных мутаций, приведен в таблице 13. Остальные мутации расположены или в некодирующих участках генов, или являются синонимичными.

Таблица 13 - Обнаруженные изменения в геноме в штаммах [*PSI*⁺].

штамм	Фенотип штамма	Генетические изменения
[<i>PSI</i> ⁺] - 2-5	α , снижена частота «незаконной» гибридизации, и мутагенеза, нет индукции УФ мутагенеза	мутация в гене <i>STE6</i> Leu575Stop
[<i>PSI</i> ⁺] - 2-3	n/m,	мутация в гене <i>KEX1</i> Tyr57Stop
[<i>PSI</i> ⁺] - 39	α , снижена частота «незаконной» гибридизации, частота мутагенеза не изменена	мутация в гене <i>CDC60</i> Arg797Lys
[<i>PSI</i> ⁺] - 108	α , повышена частота «незаконной» гибридизации, повышена частота мутагенеза, чувствителен к высоким дозам УФ	мутация в гене <i>RAD50</i> Leu191Phe
[<i>PSI</i> ⁺] - 110	α , снижена частота «незаконной» гибридизации, снижена частота спонтанного и УФ – индуцированного мутагенеза	Дупликации I и III хромосом
[<i>PSI</i> ⁺] - 127	α , снижена частота «незаконной» гибридизации, снижена частота спонтанного и УФ – индуцированного мутагенеза	Дупликации I и III хромосом
[<i>PSI</i> ⁺] - 15	α , снижена частота «незаконной» гибридизации и мутагенеза, нет индукции УФ мутагенеза	Диплоидизация
[<i>PSI</i> ⁺] - 56	α , снижена частота «незаконной» гибридизации и мутагенеза, нет индукции УФ мутагенеза	Диплоидизация
[<i>PSI</i> ⁺] - 67	α , снижена частота «незаконной» гибридизации и мутагенеза, нет индукции УФ мутагенеза	Диплоидизация
[<i>PSI</i> ⁺] - 84	α , снижена частота «незаконной» гибридизации и мутагенеза, нет индукции УФ мутагенеза	Диплоидизация

В геноме штамма [*PSI*⁺] -- 2-5 была обнаружена нонсенс-мутация в гене *STE6*, этот ген кодирует мембранный белок, транспортирующий α -фактор из клетки, мутации в этом гене приводят к стерильности α -клеток. А- и α -факторы, или феромоны, выделяются клетками

соответствующий типов спаривания и действуют на рецепторы клеток противоположного типа спаривания, при связывании с соответствующим рецептором α - и α -факторы индуцируют остановку клеточного цикла на стадии G1 и переход клетки к копуляции, поэтому дефектные по синтезу феромонов клетки стерильны. Наличие мутации в гене *STEb* у штамма [*PSI*⁺] - 2-5 объясняет появление n/m спор в тетрадном анализе (споры с генотипом *MATa steb*), а также снижение частоты «незаконной» гибридизации, поскольку при переключении типа спаривания $\alpha \rightarrow \alpha$ образовавшиеся клетки α -типа спаривания теряют способность скрещиваться.

В штамме [*PSI*⁺] - 2-3, который был исследован одним из первых, но изменивший тип спаривания в ходе работы, была обнаружена мутация в гене *KEX1* (нонсенс-мутация), этот ген кодирует белок, необходимый для синтеза предшественника α -фактора, мутации в этом гене приводят к стерильности клеток α -типа спаривания (*MAT α*) (Michaelis, 1993). Неизвестно, на какой стадии работы в этом штамме возникла данная мутация, возможно, что она возникла в момент получения штамма, но она не проявлялась в результате супрессии нонсенс-мутаций из-за присутствия приона [*PSI*⁺]. Длительное хранение при низких температурах, возможно, изменило свойство приона, известно, что в клетке существует несколько различающихся по пространственной организации вариантов приона, они могут различаться по способности супрессировать нонсенс-мутации, а также по способности стабильно передаваться в дочерние клетки при митотическом делении.

Штамм [*PSI*⁺] - 39 несет в геноме миссенс-мутацию в гене *CDC60* (замена аргинина на лизин в позиции 797). Этот ген кодирует лейцин - тРНК-синтетазу, которая присоединяет лейцин к соответствующей тРНК, описанные мутации в этом гене приводят к термочувствительности мутантов, остановке клеточного цикла на стадии G1 при 37°C, снижению способности к спариванию и к повышению частоты потерь хромосом (Bedard et al., 1981). Данная мутация не приводит к термочувствительности.

Штамм [*PSI*⁺] - 108 мутантен по гену *RAD50* (мутация приводит к замене лейцина на фенилаланин в положении 191), этот ген кодирует белок, участвующий в мейотической рекомбинации и устранении двунитевых разрывов ДНК, поддержании стабильности теломер, мутанты по этому гену обладают гипермутабельным фенотипом и чувствительны к генотоксичным факторам, таким как УФ или ионизирующее излучение (Symington, 2002). В штаммах [*PSI*⁺] - 127 и [*PSI*⁺] - 110, обнаружены дубликации хромосом 1 и 3. Так как локус *MAT α* расположен в III хромосоме, то дисомики по этой хромосоме содержат две копии локуса *MAT α* , что приводит к снижению частоты переключения типа спаривания и снижению частоты «незаконной» гибридизации.

3.3.2 Генетический анализа штаммов $[PSI^+]$ - 127 и $[PSI^+]$ - 2-5

Для двух штаммов $[PSI^+]$, обладающих пониженной частотой спонтанного и индуцированного УФ мутагенеза, 2-5, несущего мутацию *ste6*, и $[PSI^+]$ - 127, дисомика по двум хромосомам, мы провели генетический анализ. Для этого эти штаммы, а также штамм $[psi^-]$, скрестили со штаммом PLY122 и провели тетрадный анализ, результаты тетрадного анализа представлены в таблице 14. У обоих проанализированных штаммов результаты тетрадного анализа согласуются с данными геномного секвенирования и подтверждают наличие выявленных генетических изменений. У гибрида, полученного от штамма $[psi^-]$, расщепление по всем признакам соответствовало теоретически ожидаемому, экспериментальные значения расщепления сравнивали с теоретически ожидаемым по критерию χ^2 Пирсона при $p < 0,05$.

У гибрида, полученного от скрещивания штаммов $[PSI^+]$ - 127 и PLY122, выживаемость спор была снижена по сравнению с гибридом, полученным от штаммов $[psi^-]$ и PLY122 (Таблица 14), кроме того, среди аскоспор встречались некопулирующие (n/m) и такие, которые не образовывали мутанты *can^r* после облучения УФ (немутирующие), а расщепление по признакам ауксотрофности отличалось от теоретически ожидаемого расщепления. Выживаемость спор, полученных от гибридов от скрещивания $[PSI^+]$ - 2-5 и PLY122, составила 72%, поэтому расщепление по признакам анализировали как случайную выборку спор. Среди проанализированных сегрегантов были обнаружены немутурующие и некопулирующие, а в потомстве были выявлены отличия расщепления по маркерам ауксотрофности от теоретически ожидаемого. Наличие нескрещивающихся сегрегантов в потомстве гибридов, а также отличающееся от теоретически ожидаемого расщепление по признакам и пониженная выживаемость спор подтверждают наличие в геноме исследованных штаммов наследуемых изменений, в частности, затрагивающих гены, которые контролируют тип спаривания.

Таблица 14 - Результаты тетрадного анализа гибридов, полученных от скрещивания штаммов [*PSI*⁺] x PLY122 и [*psi*⁻] x PLY122

Родительские штаммы	Количество проверенных тетрад	Количество жизнеспособных спор	Фертильность	Маркер	Ожидаемое расщепление (по фенотипу)	Наблюдаемое расщепление (по фенотипу)	χ^2	Заключение (p=0,05)
[<i>psi</i> ⁻] x PLY122	28 (из них полных 25)	109	97%	рост на среде без метионина	25 (2 Met ⁺ : 2 Met ⁻)	25 (2 Met ⁺ : 2 Met ⁻)	0	отклонений не выявлено
				рост на среде без аденина	25 (2 Ade ⁺ : 2 Ade ⁻)	25 (2 Ade ⁺ : 2 Ade ⁻)	0	отклонений не выявлено
				рост на среде без лизина	17 (1 Lys ⁺ : 3 Lys ⁻) 4 (2 Lys ⁺ : 2 Lys ⁻) 4 (4 Lys ⁻ : 0 Lys ⁺)	14 (1 Lys ⁺ : 3 Lys ⁻) 8 (2 Lys ⁺ : 2 Lys ⁻) 3 (4 Lys ⁻ : 0 Lys ⁺)	4,89	отклонение случайно
				тип спаривания	25 (2 α : 2 a)	2 α : 2 a	0	отклонений не выявлено
				способность образовывать <i>can</i> ^r колонии	25 (4 мутируют)	25 (4 мутируют)	0	отклонений не выявлено
[<i>PSI</i> ⁺] - 127 x PLY122	25 (из них полных 16)	88	88%	рост на среде без метионина	16 (2 Met ⁺ : 2 Met ⁻)	15 (2 Met ⁺ : 2 Met ⁻) 1 (3 Met ⁺ : 1 Met ⁻)	1,07	отклонение случайно
				рост на среде без аденина	16 (4 Ade ⁺)	14 (4 Ade ⁺) 2 (3 Ade ⁺ : 1 Ade ⁻)	1,3	отклонение случайно
				рост на среде без лизина		6 (2 Lys ⁻ : 2 Lys ⁺) 7 (3 Lys ⁻ : 1 Lys ⁺) 3 (4 Lys ⁻ : 0 Lys ⁺)	2,8	отклонение случайно
				тип спаривания	16 (2 α : 2 a)	7 (2 α : 2 n/m) 2 (2 α : 2 a) 5 (2 α : 1 a : 1 n/m) 1 (1 α : 3 n/m) 1 (3 α : 1 a)	20,6	отклонение не случайно
				способность образовывать <i>can</i> ^r колонии	16 (4 мутируют)	10 (4 мут. : 0 немут.) 5 (3 мут. : 1 немут.) 1 (2 мут. : 2 немут.)	6,4	отклонение не случайно

Родительские штаммы	Количество проверенных тетрад	Количество жизнеспособных спор	Фертильность	Маркер	Ожидаемое расщепление (по фенотипу)	Наблюдаемое расщепление (по фенотипу)	χ^2	Заключение (p=0,05)
[PSI ⁺] – 2-5 x PLY122*	25 (из них полных 3)	72	72%	рост на среде без метионина	36 Met ⁺ : 36 Met ⁻	37 Met ⁺ : 35 Met ⁻	0,056	отклонение случайно
				рост на среде без аденина	72 Ade ⁺	65 Ade ⁺ : 7 Ade ⁻	7,75	отклонение не случайно
				рост на среде без лизина	36 Lys ⁻ : 36 Lys ⁺	48 Lys ⁻ : 24 Lys ⁺	10	отклонение не случайно
				тип спаривания	36 a : 36 α	37 a : 29 α : 6 n/m	7,72	отклонение не случайно
				способность образовывать cap ^f колонии	72 мут.	47 мут. : 25 немут.	38,3	отклонение не случайно

Примечание: * - расщепление по признакам анализировали в случайной выборке спор.

3.4 ВЛИЯНИЕ ПРИОНА [*PSI*⁺] НА ЧАСТОТУ ДУПЛИКАЦИИ ГЕНОМА.

В предыдущих экспериментах удалось выяснить, что само по себе наличие приона [*PSI*⁺] не оказывает влияния на частоту генетических изменений, учитываемых в тестах на «незаконную» гибридизацию и прямых мутаций в гене *CAN1*, однако эти тесты не учитывают такие генетические изменения как геномные мутации. Поскольку среди отобранных штаммов [*PSI*⁺] были обнаружены диплоиды, мы проверили как влияет прион на частоту диплоидизации. Для этого был разработан подход, позволяющий различать гаплоидные и полиплоидные штаммы дрожжей на фенотипическом уровне, а также позволяющий оценить частоту появления полиплоидов в культуре дрожжей (Andreychuk et al., 2022). Для идентификации ди- и полиплоидных клеток в культуре гаплоидного штамма мы использовали такой фенотипический признак, как частота образования мутантных колоний *Can*^r после облучения УФ. Поскольку мутации *can1* рецессивны, то для образования мутантной колонии необходимо, чтобы в клетке произошла инактивация всех копий гена *CAN1*, поэтому у гаплоидов частота образования мутантов *can*^r значительно выше по сравнению с диплоидами и полиплоидами, у которых мутации должны возникнуть одновременно в двух или трех копиях репортерного гена соответственно. Визуально диплоидные и полиплоидные клоны отличаются от гаплоидов тем, что после облучения УФ светом они практически не производят мутантные клоны на среде с канаванином. Поэтому для определения частоты спонтанной диплоидизации мы определяли отношение числа клеток, не мутирующих на среде с канаванином, к общему количеству клеток в культуре в нескольких независимых культурах, плоидность немутуирующих клонов дополнительно проверяли методом проточной цитометрии (см. «Материалы и методы»). Стоит отметить, что ранее Я. Харари с соавторами удалось определить темп спонтанной полиплоидизации с помощью длительных эволюционных тестов с применением компьютерного моделирования (Harari et al., 2018). В нашем исследовании мы впервые измерили темп спонтанной полиплоидизации прямым методом в культурах гаплоидных гетероталлических штаммов дрожжей, медиана и доверительный интервал частоты спонтанной диплоидизации составили $6,2 \times 10^{-5}$ ($5,1 \times 10^{-5} - 36,4 \times 10^{-5}$) (Таблица 15). Это значение, близко значению спонтанной диплоидизации, измеренному ранее для штаммов α и α типов спаривания, которые составили $5,3 \times 10^{-5}$ и 9×10^{-5} соответственно (Harari et al., 2018).

Для того, чтобы оценить влияние [*PSI*⁺] на частоту спонтанной полиплоидизации мы оценили значение этого параметра у одного из полученных нами клонов [*PSI*⁺] в сравнении со штаммом [*psi*⁻], полученном на его основе методом изгнания [*PSI*⁺] с помощью сверхэкспрессии *HSP104*. Поскольку у нескольких полученных нами штаммов [*PSI*⁺] были обнаружены генетические изменения, сопровождающиеся различными показателями стабильности генома,

для оценки влияния приона на частоту полиплоидизации был выбран штамм [*PSI*⁺] - 118, у которого частота «незаконной» гибридизации не отличается от штамма без приона. У этого штамма мы предварительно проверили плоидность методом проточной цитометрии и подтвердили, что этот штамм является гаплоидом. У выбранного штамма мы измерили темп полиплоидизации, который статистически значимо не отличался от темпа спонтанной полиплоидизации, поэтому мы сделали вывод, что прион [*PSI*⁺] не влияет на частоту полиплоидизации. Чтобы дополнительно убедиться в отсутствии влияния приона на частоту появления полиплоидных колоний, мы оценили темп полиплоидизации у штамма [*PSI*⁺] – 118 после изгнания приона (Таблица 15), полученное значение частоты полиплоидизации в этом случае осталось неизменным. Таким образом, полученные результаты подтверждают, что наличие приона не влияет на частоту полиплоидизации.

Таблица 15 - Темп спонтанной полиплоидизации, в присутствии приона [*PSI*⁺] и после изгнания приона.

Штамм	Темп образования полиплоидных колоний (медиана и доверительный интервал) ($\times 10^{-5}$)
[<i>PIN</i> ⁺] [<i>psi</i> ⁻]	6,2 (5,1 – 36,4)
[<i>PIN</i> ⁺] [<i>PSI</i> ⁺] - 118	4,9 (1,0 – 38,0)
[<i>PIN</i> ⁺] [<i>psi</i> ⁻] – 118 (после изгнания приона)	4,5 (0,8 – 18,0)

3.5 ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ НАРУШЕНИЯ МЕХАНИЗМОВ, УЧАСТВУЮЩИХ В ПОДДЕРЖАНИИ СТАБИЛЬНОСТИ ГЕНОМА НА ЧАСТОТУ ПРИОНИЗАЦИИ Sup35

По результатам проделанной работы мы пришли к выводу, что сам по себе прион [*PSI*⁺] не оказывает влияния на частоту мутаций – наличие приона само по себе не является ни мутагенным, ни антимутагенным фактором. В пользу этого заключения говорят следующие выявленные нами факты: (а) не все штаммы с прионом [*PSI*⁺] характеризуются сниженной или повышенной частотой генетических нарушений, выявляемых в альфа-тесте и в тесте на индукцию мутаций *can*^r; (б) перенос [*PSI*⁺] в изогенный штамм без этого приона не сопровождается переносом признака пониженная или повышенная частоты незаконной гибридизации; (в) изгнание приона [*PSI*⁺] не приводит к возврату значений частоты незаконной гибридизации к значениям, характерным для штамма [*psi*⁻]; (г) изменения количественных параметров мутагенеза обнаружены только у штаммов [*PSI*⁺], но не [*PIN*⁺]; (д) в геноме всех штаммов [*PSI*⁺] с измененными параметрами мутагенеза выявлены изменения генетического

материала различных типов – полиплоидия, удвоение отдельных хромосом, точковые мутации в кодирующей области некоторых генов. При этом в проанализированной нами коллекции штаммов [*PSI*⁺] обнаружено значительное число клонов, характеризующихся сниженной или повышенной частотой незаконной гибридизации и частотой спонтанных мутаций *can*^r, причём в геноме каждого из этих штаммов обнаружены какие-либо мутации. Совокупность перечисленных фактов позволила нам сделать предположение, что в некоторых случаях изменения генома могут являться первичными и возникая в клетке спонтанно или под действием мутагенных факторов могут влиять на частоту возникновения приона [*PSI*⁺]. Существуют наследственные формы нейродегенеративных заболеваний, обусловленные наличием мутаций в генах, кодирующих белок-предшественник амилоида, или в других генах, кодирующих процессинг амилоидогенного белка, а также генетическими изменениями, приводящими к изменению количества амилоидогенного белка. Тем не менее не известно, как мутации, не затрагивающие биосинтез амилоидогенного белка, влияют на агрегацию этого белка. Один из возможных механизмов влияния дестабилизации генома на амилоидогенез заключается в том, что дестабилизация генома приводит к появлению различных генетических изменений, таких как мутации, хромосомные перестройки и др., которые изменяют аминокислотную последовательность белков, и таким образом изменяются их амилоидогенные свойства, такие изменения также могут приводить к синтезу белков, которые в норме не синтезируются, например, мутации, приводящие к сдвигу рамки считывания, могут приводить к синтезу белка с новой аминокислотной последовательностью.

Для проверки предположения о том, что факторы, контролирующие стабильность генома, влияют на частоту появления приона, мы проверили будут ли мутагенные факторы, повышающие уровень дестабилизации генома, влиять на частоту возникновения [*PSI*⁺]. В качестве одного из мутагенных факторов мы использовали гидроксимочевину, добавление которой в среду приводит у дрожжей к снижению пулов предшественников синтеза ДНК и повышению частоты мутаций (Kumar et al., 2010; Northam et al., 2010). В качестве второго мутагенного фактора мы использовали инактивацию рекомбинационной репарации посредством дизрупции гена *RAD52*. Мутанты *rad52* обладают мутаторным фенотипом и чувствительны к ДНК-повреждающим воздействиям. Для проверки гипотезы о том, что дестабилизация генома может стимулировать прионизацию Sup35, мы оценили частоту возникновения [*PSI*⁺] в штамме, обработанном гидроксимочевинной и в штамме с дизрупцией *rad52::LEU2* по сравнению с частотой возникновения приона без мутагенных воздействий.

3.5.1 Влияния ингибитора синтеза предшественников ДНК дНТФ на частоту прионизации Sup35

Для того чтобы проверить как нарушение точности синтеза ДНК влияет на частоту прионизации белка Sup35, мы проверили эффект гидроксимочевины (ГМ) на частоту прионизации Sup35. Гидроксимочевина блокирует фермент рибонуклеотидредуктазу, синтезирующую предшественники ДНК дезоксинуклеотиддифосфаты (дНДФ) из соответствующих рибо-нуклеотидов, что приводит к снижению концентрации дНТФ в клетках и замедлению синтеза ДНК, остановке вилки репликации, активации ферментов чекпойнта в ответ на повреждения ДНК (Коç et al., 2004) и повышению уровня мутагенеза (Northam et al., 2010). Для исследования влияния гидроксимочевины на частоту возникновения $[PSI^+]$, штаммы дрожжей, несущие плазмиду pGAL1-SUP35 выращивали в среде без урацила с галактозой (для индукции экспрессии SUP35) и гидроксимочевинной. Затем клетки высевали на среду без аденина для отбора клонов с прионом, а также на полную среду для подсчета выживаемости как описано в разделе «Материалы и методы». Мы не обнаружили статистически значимого отличия по частоте прионизации Sup35 в присутствии гидроксимочевины и без этого вещества (Рисунок 10).

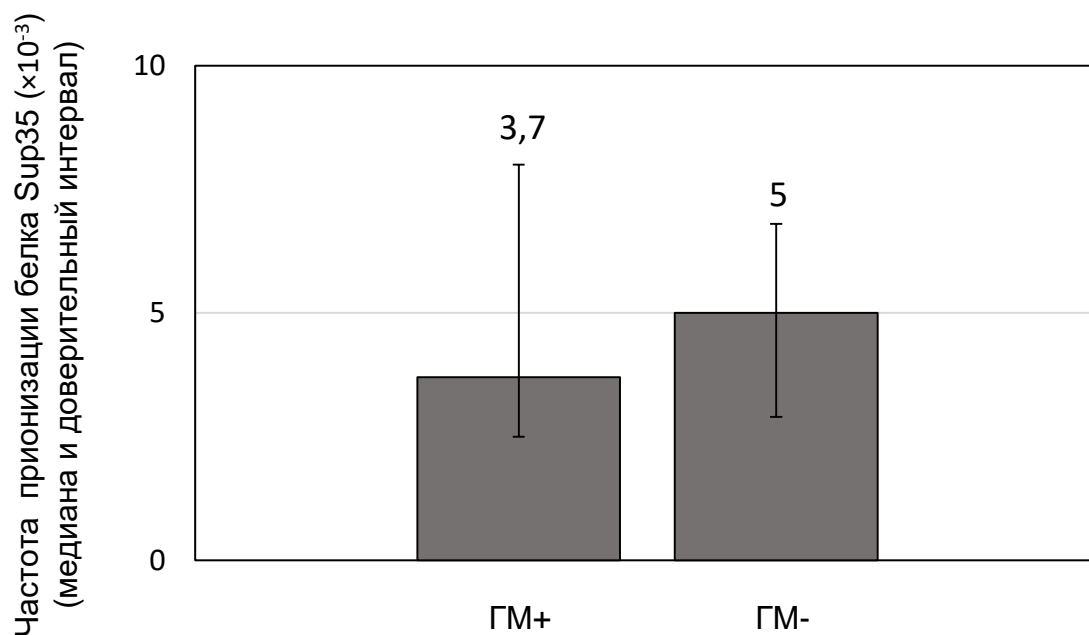


Рисунок 10 - Частота прионизации белка Sup35 в штамме $[PIN^+]$ $[psi^-]$ в присутствии гидроксимочевины и без воздействия (медиана и 95% доверительный интервал). Полученные значения не отличаются по критерию Манна-Уитни, $p < 0,05$

3.5.2 Результаты исследования влияния инактивации гена *RAD52* на частоту возникновения приона [*PSI*⁺]

Для того чтобы проверить как на частоту появления приона [*PSI*⁺] влияет нарушение рекомбинационной репарации ДНК, мы сконструировали штамм, несущий дизрупцию гена *RAD52*, и посчитали частоту прионизации белка Sup35 у этого штамма в сравнении со штаммом дикого типа. Ген *RAD52* кодирует фермент, необходимый для гомологичной рекомбинации и участвующий в устранении двунитевых разрывов. Мутации в этом гене, а также делеция всего гена приводят к чувствительности мутантов к действию ДНК-повреждающих агентов и повышению уровня мутагенеза. В ходе проверки влияния *rad52* на частоту прионизации Sup35 мы не обнаружили статистически значимых отличий между мутантным штаммом *rad52::LEU2* и штаммом дикого типа по этому показателю (Рисунок 11).

Таким образом, дестабилизация генома, по крайней мере, под действием двух мутагенных факторов (снижение пула предшественников ДНК и инактивация рекомбинационной репарации) не приводит к увеличению частоты прионизации Sup35. А принимая во внимание результаты, полученные на предыдущем этапе, можно сделать вывод о том, что ни один из двух факторов (дестабилизация генома или амилоидизация) не являются первичным по отношению друг к другу, хотя по предварительным наблюдениям среди клонов [*PSI*⁺] часто выявляются штаммы с различными генными, хромосомными и геномными мутациями и измененными параметрами мутагенеза. Поэтому следующим направлением исследования стала точная оценка появления клонов, одновременно несущих [*PSI*⁺] и различные генетические нарушения, приводящие к изменению параметров мутационного процесса. Для этого необходимо провести проверку предположения, что частота появления таких клонов превышает теоретически ожидаемую в случае независимого появления этих признаков.

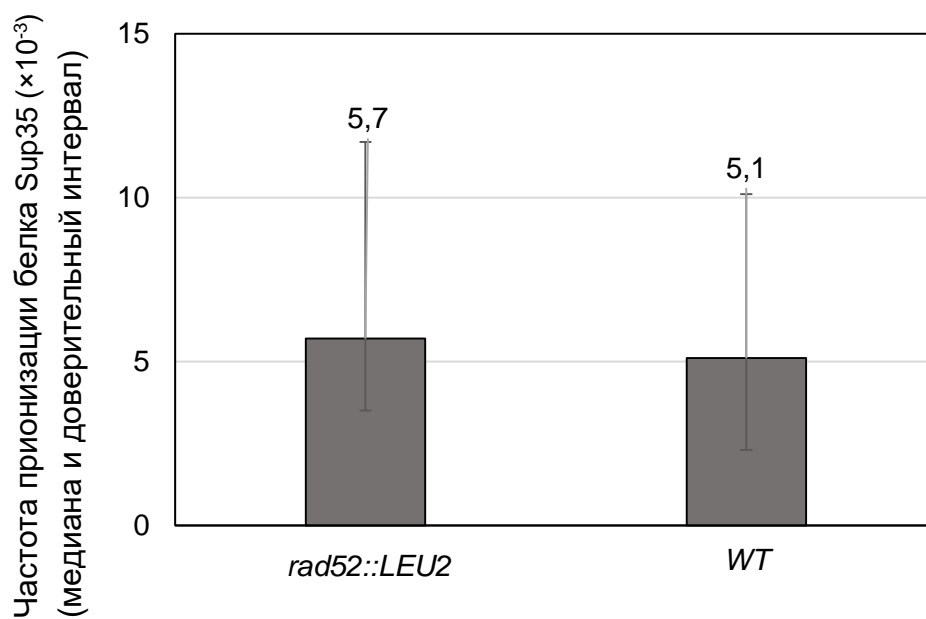


Рисунок 11 - Частота прионизации белка Sup35 в штаммах [*PIN*⁺] [*psi*] с дизрупцией гена *RAD52* и wt (медиана и 95% доверительный интервал).
Полученные значения не отличаются по критерию Манна-Уитни, $p < 0,05$

3.6 ЧАСТОТА ОДНОВРЕМЕННОГО ПОЯВЛЕНИЯ ПРИОНА [*PSI*⁺] И ИЗМЕНЕНИЙ ГЕНОМА

Несмотря на то, что прион [*PSI*⁺] не влияет на стабильность генома, обращает на себя тот факт, что в коллекции полученных нами штаммов [*PSI*⁺] были выявлены штаммы с измененными параметрами мутагенеза, несущие в геноме различные генетические изменения: точковые мутации, дупликации отдельных хромосом и дупликация генома. Частота таких штаммов высокая (12,5%, 8 из 64), что явно превышает спонтанный уровень мутагенеза. Поэтому мы предположили, что генетические изменения возникают одновременно с появлением приона.

3.6.1 Частота появления клонов с измененными параметрами мутагенеза при прионизации белка Sup35

Для того, чтобы определить, связано ли изменение параметров мутагенеза с появлением приона [*PSI*⁺] у некоторых штаммов, мы провели следующий эксперимент. Мы трансформировали штамм [*PIN*⁺] [*psi*⁻] плазмидой, содержащей полноразмерный ген *SUP35*, расположенный под промотором *GALI*. Трансформантов выращивали в жидкой среде с галактозой без урацила для индукции сверхпродукции белка Sup35. Затем высевали суспензию клеток на среду без аденина для селекции клонов [*PSI*⁺] и на полную среду для оценки выживаемости и отбора клонов, в которых прион не возник (Рисунок 12). Затем оба типа колоний ([*PSI*⁺] и [*psi*⁻], пережившие сверхпродукцию Sup35 и происходящие из одной культуры) отсеивали в виде небольших штрихов на соответствующие среды (клоны [*psi*⁻] пересевали на полную среду, клоны Ade⁺ на минимальную среду без аденина), через 2 дня дрожжи отпечатывали на среду с канаванином и облучали ультрафиолетом, затем качественно оценивали уровень УФ-индуцированного мутагенеза у отобранных колоний (Рисунок 13). Параллельно проводили проверку отобранных клонов на наличие приона. Если у проверяемого клона после облучения УФ на отпечатке вырастает несколько десятков устойчивых к канаванину колоний, то такой клон учитывали, как клон, не имеющий нарушений мутагенеза. Среди большинства нормально мутирующих клонов с определенной частотой встречаются клоны с измененными количественными параметрами мутагенеза – штаммы, которые совсем не мутируют при облучении УФ и штаммы, у которых количество Can^r колоний меньше или больше, чем у исходного штамма. Мы определили частоту возникновения таких клонов с измененными параметрами мутагенеза среди клонов каждого типа ([*PSI*⁺] и [*psi*⁻]), происходящих из одной и той же культуры. Для этого мы подсчитывали долю колоний, у которых уровень УФ-индуцированного мутагенеза отличался от нормального, тех колоний, которые не мутировали

вообще или уровень индуцированного мутагенеза был заметно снижен (Рисунок 13). Всего мы проверили 8324 колонии $[PSI^+]$ и 6214 колоний $[psi^-]$, полученных из 6 независимых культур (по 700-1500 колоний каждого типа из каждой из 6 независимых культур).

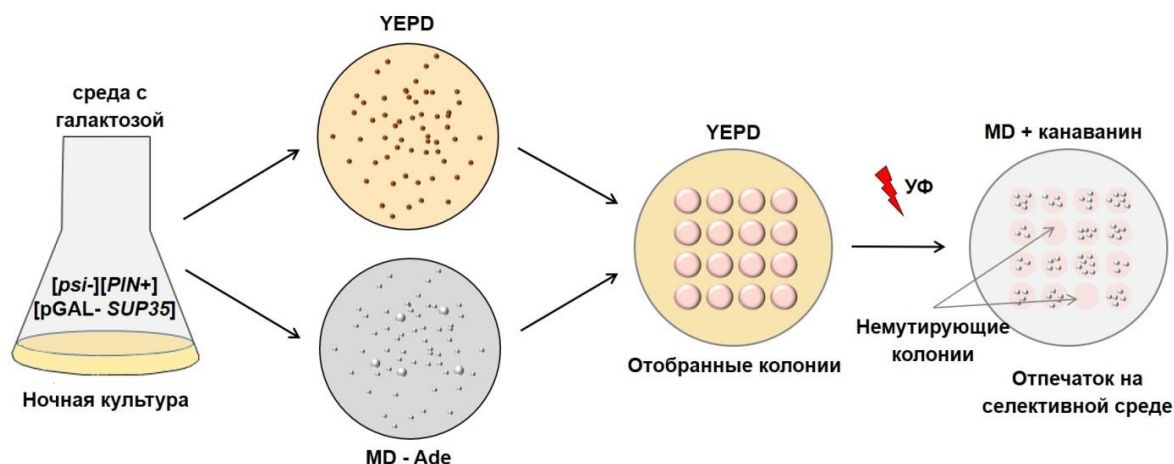


Рисунок 12 - Схема эксперимента по выявлению колоний с измененными параметрами мутагенеза. Культуру дрожжей, трансформированных плазмидой, содержащей ген *SUP35*, выращивали в жидкой среде с галактозой для индукции сверхпродукции белка Sup35. Затем суспензию клеток параллельно высевали на среду без аденина для отбора колоний $[PSI^+]$ и на полную среду для отбора колоний $[psi^-]$. Выросшие индивидуальные колонии высевали в виде небольших штрихов на свежую чашку, на следующий день чашку перепечатывали на среду с канаванином и облучали УФ. Через 5 дней оценивали количество выросших колоний на каждом отпечатке.

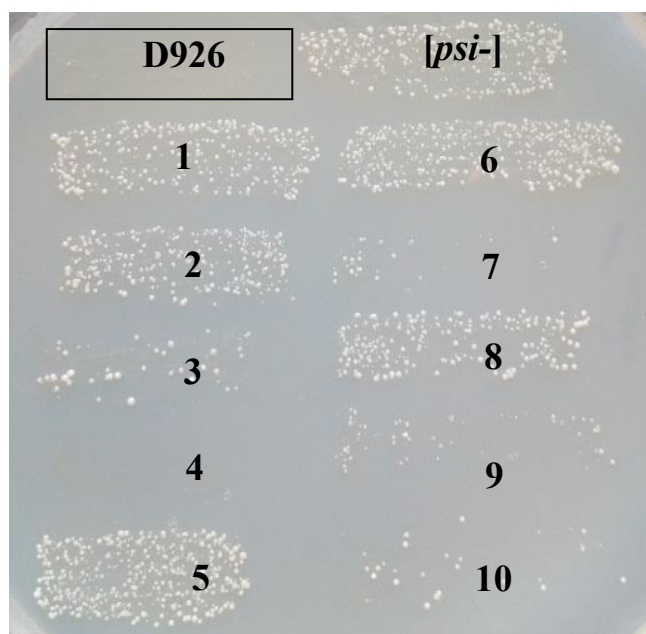


Рисунок 13 - Отпечатки клонов на селективной среде (минимальная среда с канаванином) после облучения УФ. На рисунке отмечены: штаммы D926 – диплоидный штамм, $[psi^-]$ – штамм без приона, 1-10 – клоны, в которых произошла прионизация Sup35. Среди клонов $[PSI^+]$ есть клоны, которые мутируют как исходный штамм $[psi^-]$ (№ 1, №2, № 5, № 6 и № 8), немутуирующие клоны (№ 4) и клоны со сниженным уровнем мутагенеза (№ 3, № 7, № 9 и №10).

Среди клонов, в которых произошла прионизация Sup35, темп образования колоний с измененными параметрами мутагенеза (немутирующих и редкомутирующих клонов) составляет 342×10^{-5} . Темп образования клонов с измененными параметрами мутагенеза в клетках $[psi^-]$ из той же культуры составляет $5,5 \times 10^{-5}$ (были обнаружены только немутуирующие клоны), это значение в 62 раза ниже, чем в клонах с прионизованным Sup35 (Таблица 16). Важно подчеркнуть, что оба типа проанализированных колоний $[PSI^+]$ и $[psi^-]$ происходят из одной культуры, выращенной в условиях сверхпродукции Sup35, поэтому мы можем заключить, что выявленные отличия связаны именно с появлением $[PSI^+]$, а простой сверхэкспрессии Sup35 недостаточно для увеличения скорости возникновения клонов с измененными параметрами мутагенеза. Отметим, что темп возникновения немутуирующих клонов в клетках $[psi^-]$, переживших сверхпродукцию Sup35, соответствует частоте спонтанной полиплоидизации у *S. cerevisiae*, в культурах дрожжей, выращенных на полной среде с глюкозой, т.е. в оптимальных условиях без селективного давления и индукции сверхпродукции Sup35, он составил $6,2 \times 10^{-5}$ ($5,1 \times 10^{-5}$ - $36,4 \times 10^{-5}$) (см. раздел 3.4). Таким образом, увеличение частоты клонов с измененными параметрами мутагенеза среди клонов $[PSI^+]$ связано именно с появлением приона $[PSI^+]$. На основе полученных нами данных можно предположить, что прионизация Sup35 происходит чаще в штаммах, у которых произошла временная дестабилизация генома или возникли наследуемые генетические нарушения, влияющие на стабильность генома. Возможно, дестабилизация генома предшествует возникновению $[PSI^+]$ или происходит в клетках, которые приобрели компетентность к прионизации в результате наследуемых или временных изменений генетического материала. Нельзя исключать того, что дестабилизация генома и прионизация Sup35 происходят одновременно под действием некоего общего фактора.

Таблица 16 - Темп образования колоний с измененными параметрами мутагенеза при сверхпродукции белка Sup35 в колониях $[PSI^+]$ и $[psi^-]$ и спонтанный темп полиплоидизации.

Штамм	Условия культивирования	Наличие приона	Темп образования мутантных (немутирующих и редкомутирующих) колоний (медиана и 95% доверительный интервал) ($\times 10^{-5}$)
wt $[pGAL-SUP35]$	Минимальная среда -Ura +Gal	$[PSI^+]$	342 (196-1033) *
		$[psi^-]$	5,5 (0 - 45)

Примечание: * – значение статистически значимо отличается по критерию Манна-Уитни, $p < 0,01$

3.6.2 Частота одновременного появления приона [PSI^+] и мутаций в гене $CAN1$

В ходе проверки гипотезы о том, что прион и какое-либо генетическое изменение возникают одновременно, мы провели эксперимент по оценке частоты возникновения клонов, одновременно несущих прион и мутацию can^r , а также частоты каждого из этих событий в отдельности (Рисунок 14). Согласно нашему предположению, если мутация и прион возникают независимо друг от друга, то частота их совместного возникновения в клетке должна быть равна произведению значений частоты каждого из этих событий. Если же частота их совместного появления окажется выше, то это указывает на существование положительной связи между событиями. В том случае, если частота их совместного появления окажется ниже, то это означает, что одно из двух перечисленных событий подавляет возникновение другого.

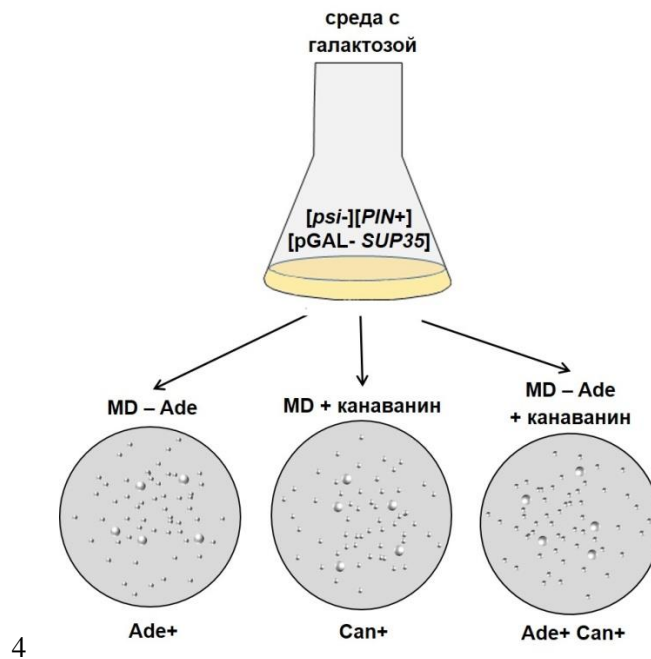


Рисунок 14 - Схема эксперимента для измерения частоты одновременного появления в клетках дрожжей приона [PSI^+] и мутаций в гене $CAN1$. Аликвоты суспензии клеток культуры штамма [psi^-] одновременно высеваются на среду без аденина для подсчета колоний [PSI^+]*, на среду с канаванином для подсчета мутантов по гену $CAN1$, и на среду с канаванином и без аденина для подсчета колоний Can^r [PSI^+]*.

* Поскольку на среде без аденина наряду с колониями с прионом вырастают колонии, несущие мутации, супрессирующие нонсенс-мутацию $ade1-14$, колонии Ade^+ выросшие на среде без аденина подвергаются дополнительной проверке. Колонии с прионом [PSI^+] можно отличить от мутантных колоний по потере способности расти на среде без аденина после пассирования на среде с ГТХ, приводящего к потере приона.

Для проведения данного эксперимента мы выращивали клетки штамма [PIN^+] [psi^-], трансформированного плазмидой, несущей ген $SUP35$ под контролем промотора $GAL1$, в жидкой

минимальной среде без урацила, содержащей необходимые добавки и 2% раффинозы, а затем часть клеток переносили в свежую среду с галактозой для индукции сверхпродукции белка Sup35, культуры выращивали в течение 48 часов, после чего клетки высевали на 4 типа твердых сред: на среду без аденина (для отбора клеток, в которых возник прион [*PSI⁺*]), на среду с канаванином (для учета мутантов по гену *CAN1*), а также среду без аденина с канаванином (для учета одновременного возникновения мутаций и приона) и на полную среду для подсчета выживаемости. Параллельно ту же процедуру проводили с трансформантом, несущим плазмиду pRS316.

Для проведения эксперимента использовали по 6 независимых культур каждого штамма. Мы оценили частоту возникновения [*PSI⁺*] и *can^r* в отдельности и частоту их совместного появления в каждой из 6 культур (Таблица 17). По шести измерениям была определена медиана частоты и 95% доверительный интервал. Мы показали, что частота прямых мутаций в гене *CAN1* составила $2,0 \times 10^{-6}$, частота прионизации Sup35 – $2,1 \times 10^{-2}$. Основываясь на этих данных мы определили теоретически ожидаемое значение частоты одновременного возникновения мутаций и приона в каждой из 6 культур и подсчитали медианное значение, которое составляет $3,8 \times 10^{-8}$, при этом экспериментальное значение частоты их одновременного возникновения составило – $9,9 \times 10^{-8}$. Таким образом, экспериментальная частота совместного возникновения событий оказалась в 2,5 раза выше теоретически ожидаемой (отличия статистически значимы по критерию Вилкоксона при $p < 0,01$). Таким образом, появление приона [*PSI⁺*] и мутаций *can^r* взаимосвязано.

Для штамма, трансформированного плазмидой pRS316 частота прямых мутаций в гене *CAN1* составили $2,4 \times 10^{-6}$, что статистически значимо не отличается от частоты мутагенеза у штамма, трансформированного плазмидой, несущей ген *SUP35*. Этот результат свидетельствует о том, что повышение продукции белка Sup35 не влияет на частоту возникновения мутаций в гене *CAN1*. Частота прионизации белка Sup35 в штамме, трансформированном плазмидой без вставки *SUP35* составила $2,3 \times 10^{-8}$, что на несколько порядков ниже частоты прионизации Sup35 при сверхпродукции, что согласуется с опубликованными данными (Tyedmers et al., 2008). Теоретически ожидаемая частота одновременного возникновения приона и мутаций *can^r* при физиологическом уровне экспрессии *SUP35* составила $5,0 \times 10^{-14}$, экспериментально измерить частоту одновременных событий нам не удалось, поскольку эта частота ниже разрешающей способности метода. Таким образом, мы можем заключить, что, хотя, наличие приона само по себе не влияет на частоту мутагенеза, и дестабилизация генома не приводит к повышению частоты прионизации, эти два события несомненно связаны. Необходимо отметить, что в тесте на индукцию прямых мутаций устойчивости к канаванину учитывают в основном точковые мутации (замены и короткие вставки/выпадения), и реже протяженные делеции, затрагивающие

ген *CAN1*. При этом в штаммах [*PSI*⁺] нам удалось выявить хромосомные нарушения. Поэтому можно ожидать что при использовании какой-либо тест-системы, способной выявлять более широкий спектр генетических нарушений и [*PSI*⁺], разница между частотой возникновения мутаций и приона в отдельности и частотой совместных событий будет более существенной. Это предположение согласуется с данными, представленными в предыдущем разделе (Таблица 16). Так, при использовании тест-системы, которая позволяет учитывать все события, приводящие к изменению частоты УФ-индуцированного мутагенеза, частота колоний с измененными параметрами мутагенеза оказалась в 62 раза выше среди клонов [*PSI*⁺], чем среди клонов [*psi*⁻].

Таблица 17 - Частота (медиана и 95% доверительный интервал) событий в штамме, трансформированном плазмидой, содержащей ген *SUP35* под контролем промотора *GAL1*, и штамме, трансформированном контрольной плазмидой pRS316 без вставки.

Штамм	Частота (медиана и 95% доверительный интервал) возникновения следующих событий			
	<i>can</i> ^r	[<i>PSI</i> ⁺]	Одновременно <i>can</i> ^r и [<i>PSI</i> ⁺] (эксперим.)	Одновременно <i>can</i> ^r и [<i>PSI</i> ⁺] (теоретически ожидаемая)
[<i>pGAL1</i> - <i>SUP35</i>]	$2,0 \times 10^{-6}$ ($1,2 \times 10^{-6} - 3,3 \times 10^{-6}$)	$2,1 \times 10^{-2}$ ($1,8 \times 10^{-2} - 3,2 \times 10^{-2}$)	$9,9 \times 10^{-8}$ ($6,4 \times 10^{-8} - 17 \times 10^{-8}$)	$3,8 \times 10^{-8}$ ($2,2 \times 10^{-8} - 9,6 \times 10^{-8}$)
[pRS316]	$2,4 \times 10^{-6}$ ($2,2 \times 10^{-6} - 6,5 \times 10^{-6}$)	$2,3 \times 10^{-8}$ ($0 - 3,2 \times 10^{-8}$)	0	$5,0 \times 10^{-14}$ ($0 - 18,2 \times 10^{-14}$)

4. ОБСУЖДЕНИЕ

Целью данной работы было исследование взаимного влияния амилоидизации белка Sup35 и механизмов, участвующих в поддержании стабильности генетического материала в модельном организме *S. cerevisiae*. В ходе выполнения работы мы проверяли три гипотезы о типе взаимодействия между амилоидогенезом и мутагенезом:

1. Прион [PSI^+] обладает мутагенным действием и индуцирует появление изменений в геноме.
2. Генетические изменения в геноме приводят к появлению приона.
3. Генетические изменения и прион [PSI^+] возникают в клетке одновременно, возможно под действием какого-то неизвестного фактора.

Для проверки первого предположения мы создали коллекцию независимо полученных штаммов [PSI^+] и проанализировали параметры мутагенеза у полученных штаммов. Среди них были выявлены штаммы [PSI^+], отличающиеся от штамма без приона по количественным параметрам мутагенеза. В ходе дальнейшей проверки мы обнаружили, что изменения параметров мутагенеза (таких как частота «незаконной» гибридизации, частота спонтанного и индуцированного УФ мутагенеза, и др.) у этих штаммов обусловлены присутствием в геноме генетических изменений, а не приона [PSI^+].

Для проверки второго предположения о том, что изменения в геноме индуцируют переход белка Sup35 в прионизованную форму, мы исследовали влияние таких генотоксических факторов, как нарушение рекомбинационной репарации ДНК и снижение пула предшественников синтеза ДНК, на частоту образования приона, и не выявили влияния этих факторов.

Для проверки третьего предположения мы измерили частоту появления клонов с измененным уровнем спонтанного мутагенеза среди клонов, в которых возник прион [PSI^+] по сравнению с клонами [psi^-]. Эта частота оказалась примерно в 60 раз выше по сравнению с частотой появления таких клонов в клетках той же культуры, но в которых не произошла прионизация белка Sup35. Этот результат свидетельствует о том, что изменение параметров мутагенеза и появление приона [PSI^+] связаны между собой. Также мы измерили частоту одновременного появления в клетках приона [PSI^+] и мутаций в гене *CAN1*. Согласно нашему предположению, если мутация и прион возникают независимо друг от друга, то частота их совместного возникновения в клетке должна быть равной произведению частот каждого из этих событий по отдельности. Повышенная частота совместного появления мутаций и приона

указывала бы на существование положительной связи между событиями. Если частота их совместного появления оказалась бы ниже теоретически ожидаемой, то это означало бы, что одно из двух перечисленных событий подавляет возникновение другого. Экспериментальная частота совместных событий оказалась примерно в 2,5 раза выше теоретически ожидаемой. Полученные экспериментальные данные указывают на существование положительной связи между возникновением приона и мутаций *can^r*. Таким образом, в соответствии с полученными результатами был сделан вывод о том, что мутации *can^r* и прион [*PSI⁺*] не влияют на частоту возникновения друг друга, и могут возникать одновременно, вероятно, под действием какого-то общего фактора.

Полученные нами результаты согласуются с литературными данными. Так, в 2017 году были опубликованы результаты работы (Chan et al., 2017), в которой авторы исследовали, как нонсенс-супрессия при прионизации Sup35 влияет на экспрессию генов. В одном из клонов с прионом [*PSI⁺*] авторы заметили повышенный уровень белков, кодируемых генами, расположенными в I хромосоме. При последующем анализе оказалась, что данный клон имеет дополнительную I хромосому. Проанализировав коллекцию из 7 штаммов с прионом, авторы выявили еще несколько дисомиков по I хромосоме, а также обнаружили дисомик по V хромосоме. Авторы предположили, что прион индуцирует неправильное расхождение хромосом и появление штаммов с дополнительной хромосомой. Для проверки своего предположения, они измерили частоту потери центромерной плазмиды в штаммах [*PSI⁺*], но не выявили статистически значимых отличий от штамма без приона, таким образом, авторы данной работы пришли к выводу, что прион [*PSI⁺*], не влияет на расхождение хромосом. Результаты, полученные в данном исследовании, подтверждаются результатами, полученными в нашей работе. Среди проанализированных штаммов [*PSI⁺*] мы также нашли два клона, у которых дублированы I и III хромосомы. В контексте нашей работы, следует обратить внимание на тот факт, что в этих хромосомах располагаются маркерные гены, которые мы использовали для селекции: в хромосоме I находится ген *ADE1*, нонсенс-мутация в котором, используется для мониторинга возникновения и наличия [*PSI⁺*], а в хромосоме III находится локус типа спаривания *MAT*, нарушения экспрессии которого учитываются в альфа-тесте. Поэтому выявление дисомиков по этим хромосомам в нашей работе может быть не случайным.

Для того чтобы объяснить механизм совместного возникновения приона и генетических изменений мы предположили модель, схематично изображенную на рисунке 15. Согласно этой модели, в клетке действует неизвестный фактор, который оказывает влияние одновременно на структуру ДНК и белков, приводя к возникновению повреждений в этих молекулах. Затем в ходе репарации ДНК и процессов, контролирующих качество молекул белков, большая часть

повреждений ДНК устраняется безошибочно, и большая часть молекул белков с повреждениями восстанавливается или деградирует. Небольшая часть первичных повреждений может быть зафиксирована в виде мутаций, тогда как небольшая часть измененных молекул белков может остаться неисправленной и зафиксироваться в виде амилоидов.

Учитывая разнообразие генетических изменений, обнаруженных в штаммах с прионом [*PSI⁺*] в нашей работе, можно предположить, что фактор, индуцирующий и прионизацию и мутации, обладает широким спектром повреждающего действия. Таким фактором может быть окислительный стресс. Известно, что АФК могут окислять молекулы нуклеиновых кислот, белков и липидов. В работах, выполненных под руководством С. Линдквист, было показано, что окислительный стресс действительно влияет на частоту прионизации Sup35, так в одной из работ этой научной группы было показано, что перекись водорода в среде увеличивает частоту прионизации Sup35 (Tyedmers et al., 2008). В других исследованиях было показано, что делеция генов *SOD1*, *TSA1* и *TSA2*, кодирующих ферменты супероксиддисмутазу и пероксиредоксины, борющиеся с АФК в клетке, также повышает частоту прионизации Sup35 (Sideri et al., 2010, 2011; Doronina et al., 2015). Еще в одном исследовании было показано, что АФК окисляют метионин в составе молекулы Sup35, и это индуцирует образование приона (Grant, 2015). Также на вклад окислительного стресса в амилоидогенез указывают данные о повышенной концентрации активных форм кислорода в модельных объектах нейродегенеративных амилоидных заболеваний, например, таких как БА (Muche et al., 2017).

Различные поврежденные белки, по-видимому, тоже могут выступать индукторов амилоидогенеза. Например, амилоидогенный белок β 2-микроглобулин, компонент комплекса гистосовместимости, концентрация которого повышается в крови при хронических заболеваниях почек, образует амилоидные агрегаты в костной и хрящевой тканях в местах воспаления при множественной миеломе. Примерно треть молекул β 2-микроглобулина, образующих агрегаты, составляют поврежденные усеченные и окисленные молекулы этого белка (Cornwell et al., 2018). Предполагают, что повышенная концентрация АФК, индуцируемая воспалительным процессом, окисляет молекулы β 2-микроглобулина, и они, в свою очередь, служат центрами инициации амилоидогенеза и вовлекают в полимерные агрегаты полноразмерные молекулы белка (Neirynck et al., 2013).

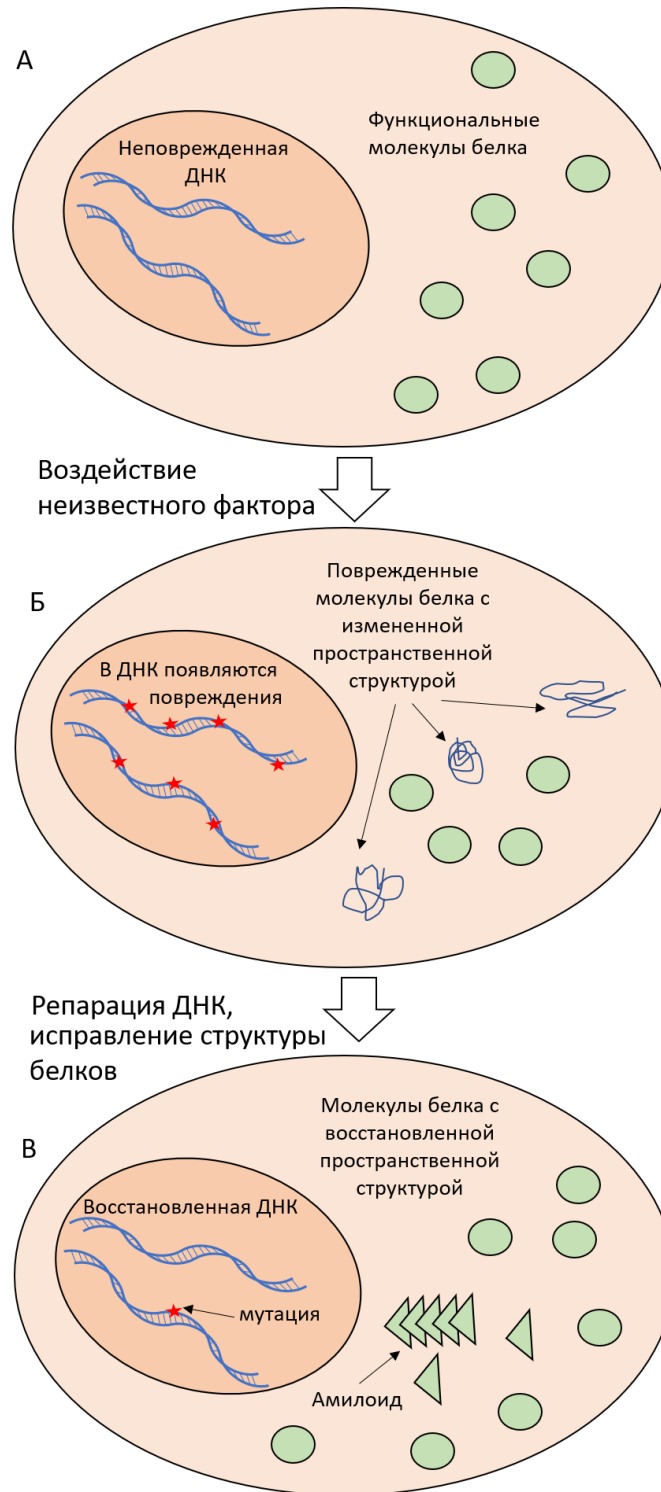


Рисунок 15 - Схема совместного возникновения приона [PSI^+] и мутаций can^1

А. клетка с неповрежденными ДНК и молекулами белков. **Б.** под действием неизвестного фактора в ДНК возникают первичные повреждения, а также изменяется пространственная структура белков. **В.** В ходе репарации ДНК большая часть первичных повреждений безошибочно устраняется, незначительная часть первичных повреждений превращается в наследуемые изменения – мутации. В то же время под действием комплексной системы, отслеживающей правильность укладки белков, большая часть молекул белков с поврежденной пространственной структурой восстанавливают исходную структуру или деградируют, незначительная часть поврежденных молекул белков индуцируют образование амилоидов.

Таким образом, поврежденные молекулы амилоидогенного белка, вероятно, могут служить триггером для инициации агрегации белка, вовлекая новые неповрежденные молекулы в процесс передачи информации о пространственной структуре. Сейчас не существует общепринятой модели, объясняющей механизм спонтанного перехода амилоидогенной молекулы белка в амилоидную форму, существует несколько гипотез, но ни одна из них еще не получила экспериментального подтверждения. Одна из таких гипотез предсказывает, что ключевую функцию в образовании амилоидов играют нарушения системы контроля качества синтеза и укладки белков (Dobson, 2003). В рамках этой гипотезы можно представить, что поврежденные и неправильно уложенные молекулы служат белковыми аналогами предмутационных повреждений ДНК. Можно предположить, что измененные в результате повреждающего действия АФК молекулы некоторых белков приобретают пространственную структуру, характерную для амилоидов. Такие измененные белки могут с определенной вероятностью избегать системы контроля качества укладки белков, и впоследствии служить затравками для индукции амилоидной агрегации.

Описанный гипотетический механизм индукции амилоидогенеза созвучен физиологической гипотезе мутагенеза М. Е. Лобашева для линейных матричных процессов (Лобашев, 1947). М. Е. Лобашев предположил механизм появления мутаций, который заключался в том, что мутациям предшествуют предмутационные повреждения в генах, которые превращаются в мутации в результате нетождественной репарации. Возможно, и амилоидам (в случае приона [*PSI*⁺] наследуемым изменениям пространственной структуры) предшествуют предамилоидные («предмутационные») изменения молекул белков. Так же, как и в МП I в МП II белки, содержащие предамилоидные повреждения, передают измененную структуру белка другим нативным молекулам белка, таким образом происходит нетождественное копирование пространственной матрицы («мутация»). Таким образом, мы предлагаем гипотезу индукции амилоидогенеза, которая заключается в следующих положениях:

1. Активные формы кислорода, появляющиеся в клетках в результате жизнедеятельности, окисляют молекулы белков.
2. Молекулярные системы, контролирующие качество синтеза и укладки белков, обладают естественным уровнем неоднозначности и допускают ошибки с определенной частотой.
3. Поврежденные молекулы обладающих амилоидогенным потенциалом белков иногда избегают исправления и индуцируют образование амилоидных агрегатов, привлекая молекулы белков с нормальной пространственной структурой в амилоидные полимеры.

Конечно, предложенный механизм индукции амилоидогенеза является всего лишь предположением, и требует дальнейших исследований. Осложняет исследование причин перехода белков в амилоидную форму отсутствие универсального фактора, индуцирующего прионизацию, который мог быть использован как положительный контроль.

Для продолжения исследования взаимодействия амилоидогенеза и механизмов поддержания стабильности генома и проверки гипотезы о роли активных форм кислорода в индукции прионизации Sup35 необходимо установить частоту одновременного возникновения первичных предмутационных повреждений ДНК и приона [PSI^+]. Для этого может оказаться полезным использование альфа-теста в варианте «незаконной» цитодукции, позволяющем учитывать частоту первичных повреждений ДНК.

5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе мы показали, что генетические изменения и прионы часто возникают в клетке одновременно, при этом нет прямого влияния генетических изменений и прионов на возникновение друг друга. Такого рода исследование, направленное на изучение взаимодействия амилоидогенеза и процессов, участвующих в поддержании стабильности генома, было выполнено впервые. Мы предположили механизм, благодаря которому можно объяснить повышенную частоту совместного возникновения генетических изменений и приона [PSI^+] в клетках дрожжей *S. cerevisiae*. Мы предполагаем, что ключевую роль в индукции амилоидогенеза играют АФК, которые повреждают различные клеточные структуры, включая белковые молекулы и генетический материал клетки.

6. ВЫВОДЫ

1. Наличие в клетке дрожжей *S. cerevisiae* стабильных вариантов приона [PSI^+], наследуемых в ходе митотических делений, не влияет на стабильность генома.
2. Дестабилизация генома, индуцированная нарушением механизма гомологичной репарации или пула предшественников ДНК, не влияет на частоту возникновения [PSI^+].
3. Частота одновременного возникновения приона [PSI^+] и генетических изменений в клетке дрожжей *S. cerevisiae* превышает теоретически ожидаемую частоту в случае их независимого возникновения.
4. Генетические изменения, возникающие в клетке дрожжей *S. cerevisiae* одновременно с прионом [PSI^+], представляют собой мутации разных типов: генные, хромосомные и геномные мутации.
5. Предложена модель, согласно которой совместное появление приона [PSI^+] и изменений генома в клетке, вероятно, опосредовано действием общего фактора (предположительно окислительный стресс), одновременно повреждающего и геном и протеом клетки.

БЛАГОДАРНОСТИ

Хочу поблагодарить коллег за неоценимый вклад, помощь и участие в выполнении работы: научного руководителя Инге-Вечтомова С. Г., сотрудников и аспирантов СПб филиала ИОГен РАН: Степченкову Е. И., Зотову И. В., Тараховскую Е. Р., Задорского С. П., Жук А. С.; сотрудников кафедры генетики и биотехнологии биологического факультета СПбГУ; сотрудников лаборатории биологии амилоидов СПбГУ; сотрудников научного парка и ресурсного центра «развитие молекулярных и клеточных технологий» СПбГУ. Хочу выразить благодарность Галкину Алексею Петровичу за критическое прочтение работы. Работа была поддержана грантами РФФИ 20-04-00663-а, РФФИ 20-34-90040-Аспиранты, РФФИ 20-14-00148 и СПбГУ 15-61.2218.2013.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Вирхов Р. 1871. Целлюлярная патология как учение, основанное на физиологической и патологической гистологии. СПб. (Virchow R. Die Cellular pathologie in ihrer Begründung auf physiologische und pathologische Gewebelehre. Berlin. 1855).
2. Галкин А. П., Велижанина М. Е., Сопова Ю. В., Щенфельд А. А., Задорский А. П. Прионы и неинфекционные амилоиды млекопитающих – сходства и различия // *Биохимия*. 2018. Т. 83. № 10. С. 1476-1489.
3. Глотов Н. В., Животовский Л. А., Хованов Н. В., Хромов-Борисов Н. Н. Биометрия. Учебное пособие. - Л.: Изд. ЛГУ, 1982 -264 с.
4. Жук А. С., Ширяева А. А., Коченова О. В., Андрейчук Ю. В., Степченкова Е. И., Инге-Вечтомов С. Г. 2013. Альфа-тест – система для оценки генетически активных факторов // *Актуальные проблемы гуманитарных и естественных наук*. № 11-1. С. 54-60.
5. Захаров И. А., Кожин С. А., Кожина Т. Н., Федорова И. В. 1984. Сборник методик по генетике дрожжей-сахаромицетов. Л.: Наука.144 с.
6. Инге-Вечтомов С. Г. 2003. Матричный принцип в биологии (прошлое, настоящее, будущее?) // *Экологическая генетика*. Т. 1. № 1. С. 3-15.
7. Инге-Вечтомов С. Г. 2013. Матричный принцип как парадигма современной генетики // *Генетика*. Т. 49. № 1. С. 4-9.
8. Инге-Вечтомов С. Г. 2015а. Материализация гена. От менделеевских факторов к молекулярной генетике. В книге: Ретроспектива генетики (курс лекций). СПб.: Н-Л. С. 250-253.
9. Инге-Вечтомов С. Г. 2015b. От хромосомной теории к матричному принципу // *Генетика*. Т. 51. № 4. С. 397.
10. Инге-Вечтомов С. Г. Идентификация некоторых групп сцепления у Петергофских генетических линий дрожжей. // *Генетика*. 1971. Т. 7. № 9. С. 113-124.
11. Инге-Вечтомов С. Г., Репневская М. В., Карпова Т. С. 1986. Изучение скрещивания клеток одинакового типа спаривания дрожжей-сахаромицетов // *Генетика*. Т. 22. № 11. С. 2625-2636.
12. Калелина Т. С., Рекстина В. В. 2019. Молекулярная организация клеточной поверхности дрожжей // *Молекулярная биология*. Т. 53. № 6. С. 968-981.
13. Кольцов Н. К. 1936. Наследственные молекулы. В кн. «Организация клетки». Гос. изд. биол. и мед. лит. М-Л. С. 22-28.
14. Лобашев М. Е. 1947. Физиологическая (паранекротическая) гипотеза мутационного процесса // *Вестник Ленинградского ун-та*. № 8. С. 10-29.

15. Нижников А. А., Антоненц К. С., Инге-Вечтомов С. Г. 2015. Амилоиды: от патогенеза к функции // *Биохимия*. Т. 80, С. 1356-1375.
16. Степченкова Е. И., Коченова О. В., Инге-Вечтомов С. Г. 2009. «Незаконная» гибридизация и «незаконная» цитодукция у гетероталлических дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* как система для анализа генетической активности экзогенных и эндогенных факторов в «альфа-тесте» // *Вестник СПбГУ*. Сер. 3. Выпуск 4. С. 129-139.
17. Aguirre N., Flint Beal M., Matson W. R., Bogdanov M. B. 2005. Increased oxidative damage to DNA in an animal model of amyotrophic lateral sclerosis // *Free Radical Research*. Vol. 39. Is. 4. P. 383-388.
18. Ainslie A., Huiting W., Barrazaol L., Bergink S., 2021. Genome instability and loss of protein homeostasis: converting paths to neurodegeneration? // *Open Biology*. Vol. 11. Is. 4. 200296.
19. Alam Z. I., Jenner A., Daniel S. E., Lees A. J., Cairns N., Marsden C. D., Jenner P., Halliwell B. 1997. Oxidative DNA damage in the parkinsonian brain: an apparent selective increase in 8-hydroxyguanine levels in substantia nigra // *Journal of Neurochemistry*. Vol. 69. Is. 3. P. 1196–1203.
20. Alberti S., Halfmann R., King O., Kapila A., Lindquist S. 2009. A systematic survey identifies prions and illuminates sequence features of prionogenic proteins // *Cell*. Vol. 137. Is. 1. P. 146–158.
21. Alonso A. D., Cohen L. S., Corbo C., Morozova V., Elidrissi A., Phillips G., Kleiman F. E. 2018. Hyperphosphorylation of tau associates with changes in its function beyond microtubule stability // *Frontiers in Cellular Neuroscience*. Vol. 12. № 338.
22. Andreychuk Y. V., Zadorsky S. P., Zhuk A. S., Stepchenkova E. I., Inge-Vechtomov S. G. 2020. Relationship between type I and type II template processes: amyloids and genome stability // *Moleculiar Biology*. Vol. 54. № 5. P. 750–775.
23. Andreychuk Y. V., Zhuk, A. S., Tarakhovskaya, E. R., Inge-Vechtomov, S. G., Stepchenkova, E. I. 2022. Rate of spontaneous polyploidization in haploid yeast *Saccharomyces cerevisiae* // *Biological Communications*. Vol. 67. № 2. P. 88–96.
24. Angarica V. E., Ventura S., Sancho J. 2013. Discovering putative prion sequences in complete proteomes using probabilistic representations of Q/N-rich domains // *BMC Genomics*. Vol. 14. № 316.
25. AnoBom A. P., Rangel L. P., Costa D. C., de Oliveira G. A., Sanches D., Braga C. A., Gava L. M., Ramos C. H., Cepeda A. O., Stumbo A. C., De Moura Gallo C. V., Cordeiro Y., Silva J. L. 2012. Mutant p53 aggregates into prion-like amyloid oligomers and fibrils: implications for cancer // *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 287. Is. 33. P. 28152–28162.

26. Antonets K. S., Nizhnikov A. A. 2017. Amyloids and prions in plants: Facts and perspectives // *Prion*. Vol. 11. Is. 5. P. 300–312.
27. Avery O., McLeod C., McCarthy M. 1944. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types // *Journal of Experimental Medicine*. Vol. 79. Is. 2. P. 137-158.
28. Ayala-Peña S. 2013. Role of oxidative DNA damage in mitochondrial dysfunction and Huntington's disease pathogenesis // *Free Radical Biology and Medicine*. Vol. 63. P. 102-110.
29. Bajaj A., Driver J. A. Schernhammer E. S. 2010. Parkinson's disease and cancer risk: a systematic review and meta-analysis // *Cancer Cases & Control*. Vol. 21. P. 697-707.
30. Barbitoff Y. A., Matveenko A.G., Moskalenko S. E., Zemlyanko O. M., Newnam G.P., Patel A., Chernova T. A., Chernoff Y. O., Zhouravleva G. A. 2017. To CURE or not to CURE? Differential effects of the chaperone sorting factor Cur1 on yeast prions are mediated by the chaperone Sis1 // *Molecular Microbiology*. Vol. 105. Is. 2. P. 242-257.
31. Bartz J. C. 2016. Prion strain diversity // *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. Vol. 6. Is. 12. a024349.
32. Basu J., Williams B. C., Li Z., Williams E. V., Goldberg M. L. 1998. Depletion of a drosophila homolog of yeast Sup35p disrupts spindle assembly, chromosome segregation, and cytokinesis during male meiosis // *Cell Motility and the Cytoskeleton*. Vol. 39. Is. 4. P. 286–302.
33. Bateman D. A., Wickner R. B. 2013. The [PSI⁺] prion exists as a dynamic cloud of variants // *PLOS Genetics*. Vol. 9,1. e1003257.
34. Bębenek A., Ziuzia-Graczyk I. 2018. Fidelity of DNA replication – a matter of proofreading // *Current Genetics*. Vol. 64. Is. 5. P. 985-996.
35. Bedard D. P., Johnston G. C., Singer R. A. 1981. New mutations in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* affecting completion of “start” // *Current Genetics*. Vol. 4. Is. 3. P.205–214.
36. Belli M., Ramazzotti M., Chiti F. 2011. Prediction of amyloid aggregation in vivo // *EMBO Reports*. Vol. 12. Is. 7. P. 657-663.
37. Bennhold H. 1922. Specific Staining of amyloid by Congo red // *Munchener Medizinische Wochenschrift*. Vol. 69. P. 1537-1538.
38. Berchowitz L. E., Kabachinski G., Walker M. R., Carlile T. M., Gilbert W. V., Schwartz T. U., Amon A. 2015. Regulated formation of an amyloid-like translational repressor governs gametogenesis // *Cell*. Vol. 163. Is. 2. P. 406–418.
39. Bleem A., Daggett V. 2017. Structural and functional diversity among amyloid proteins: Agents of disease, building blocks of biology, and implications for molecular engineering // *Biotechnology and Bioengineering*. Vol. 114. Is. 1. P. 7–20.

40. Blom E. S., Viswanathan J., Kilander L., Helisalmi S., Soininen H., Lannfelt L., Ingelsson M., Glaser A., Hiltunen M. 2008. Low prevalence of APP duplications in Swedish and Finnish patients with early-onset Alzheimer's disease // *European Journal of Human Genetics*. Vol. 16. P. 171–175.
41. Bogdanov M., Brown R. H., Matson W., Smart R., Hayden D., O'Donnell H., Flint Beal M., Cudkovicz M. 2000. Increased oxidative damage to DNA in ALS patients // *Free Radical Biology and Medicine*. Vol. 29. Is. 7. P. 652–658.
42. Borchsenius A. S., Muller S., Newnam G. P., Inge-Vechtomov S. G., Chernoff Y. O. 2006. Prion variant maintained only at high levels of the Hsp104 disaggregase // *Current Genetics*. Vol. 49. P. 21-29.
43. Borchsenius A. S., Tchourikova A. A., Inge-Vechtomov S. G. 2000. Recessive mutations in *SUP35* and *SUP45* genes coding for translation release factors affect chromosome stability in *Saccharomyces cerevisiae* // *Current Genetics*. Vol. 37. Is. 5. P. 285-291.
44. Botelho M. G., Wang, X., Arndt-Jovin D. J., Becker D., Jovin T. M. 2010. Induction of terminal differentiation in melanoma cells on downregulation of beta-amyloid precursor protein // *The Journal of Investigative Dermatology*. Vol. 130. Is. 5. P. 1400–1410.
45. Bradley W. G., Polinsky R. J., Pendlebury W. W., Jones S. K., Nee L. E., Bartlett J. D., Hartshorn J. N., Tandan R., Sweet L., Magin G. K. 1989. DNA repair deficiency for alkylation damage in cells from Alzheimer's disease patients // *Progress in Clinical and Biological Research*. Vol. 317. P. 715–732.
46. Bremer J., Baumann F., Tiberi C., Wessig C., Ficher H., Schwarz P., Steele A. D., Toya K.V., Nave K.-A., Weis J., Aguzzi A. 2009. Axonal prion protein is required for peripheral myelin maintenance // *Nature Neuroscience*. Vol. 13. P. 310-318.
47. Butterfield D. A., Howard B., Yatin S., Koppal T., Drake J., Hensley K., Aksenov M., Aksenova M., Subramaniam R., Varadarajan S., Harris-White M. E., Pedigo N. W. Jr, Carney J. M. 1999. Elevated oxidative stress in models of normal brain aging and Alzheimer's disease // *Life Sciences*. Vol. 65. Is. 18-19. P. 1883–1892.
48. Canugovi C., Misiak M., Ferrarelli L. K., Croteau D. L., Bohr V. A. 2013. The role of DNA repair in brain related disease pathology // *DNA Repair*. Vol. 12. Is. 8. P. 578–587.
49. Chakrabortee S., Byers J. S., Jones S., Garcia D. M., Bhullar B., Chang A., She R., Lee L., Fremin B., Lindquist S., Jarosz D. F. 2016a. Intrinsically Disordered Proteins Drive Emergence and Inheritance of Biological Traits // *Cell*. Vol. 167. Is. 2. P. 369–381.
50. Chakrabortee S., Kayatekin C., Newby G. A., Mendillo M. L., Lancaster A., Lindquist S. 2016b. Luminidependens (LD) is an Arabidopsis protein with prion behavior // *Proceedings of*

- the National Academy of Sciences of the United States of America*. Vol. 113. № 21. P. 6065-6070.
51. Chakravarty A. K., Smejkal T., Itakura A. K., Garcia D. M., Jarosz D. F. 2019. A non-amyloid prion particle that activates a heritable gene expression program // *Molecular Cell*. Vol. 77. Is. 2. P. 251-265.
 52. Chan P., Lee L., Kim E., Hui T., Stoynev N., Nassar R., Moksa M., Cameron D. M., Hirst M., Gsponer J., Mayor T. 2017. The [PSI⁺] yeast prion does not wildly affect proteome composition whereas selective pressure exerted on [PSI⁺] cells can promote aneuploidy // *Scientific Reports*. Vol. 7,1. № 8442.
 53. Chandramowliswaran P., Sun M., Casey K. L., Romanyuk A. V., Grizel A. V., Sopova J. V., Rubel A. A., Nussbaum-Krammer C., Vorberg I. M., Chernoff Y. O. 2018. Mammalian amyloidogenic proteins promote prion nucleation in yeast // *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 293. Is. 9. P. 3436–3450.
 54. Chatani E., Yuzu K., Ohhashi Y., Goto Y. 2021. Current understanding of the structure, stability and dynamic properties of amyloid fibrils // *International Journal of Molecular Science*. V.22. Is. 9, 4349.
 55. Chatterjee N., Walker G. C. 2017. Mechanism of DNA damage, Repair and mutagenesis // *Environmental and Molecular Mutagenesis*. Vol. 58. Is. 5. P. 235-263.
 56. Chen L. J., Sawyer E. B., Perrett S. 2011. The yeast prion protein Ure2: insights into the mechanism of amyloid formation // *Biochemical society transactions*. Vol. 39. Is. 5. 1359–1364.
 57. Cheng Y., Tao L., Xu J., Li Q., Yu J., Jin Y., Chen Q., Xu Z., Zou Q., Liu X. 2014. CD44/cellular prion protein interact in multidrug resistant breast cancer cells and correlate with responses to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients // *Molecular Carcinogenesis*. Vol. 53. Is. 9. P. 686–697.
 58. Chernoff Y. O., Lindquist S. L., Ono B., Inge-Vechtomov S. G., Liebman S. W. 1995. Role of the chaperone protein Hsp104 in propagation of the yeast prion-like factor [PSI⁺] // *Science*. Vol. 268. Is. 5212. P. 880–884.
 59. Chernova T. A., Romanyuk A. V., Karpova T. S., Shank, J. R., Ali M., Moffatt N., Howie R. L., O'Dell A., McNally J. G., Liebman S. W., Chernoff Y. O., Wilkinson K. D. 2011. Prion induction by the short-lived, stress-induced protein Lsb2 is regulated by ubiquitination and association with the actin cytoskeleton // *Molecular Cell*. Vol. 43. Is. 2. P. 242-252.
 60. Cherny D., Hoyer W., Subramaniam V., Jovin T. M. 2004. Double-stranded DNA stimulates the fibrillation of alpha-synuclein in vitro and is associated with the mature fibrils: an electron microscopy study // *Journal of Molecular Biology*. Vol. 344. Is. 4. P. 929–938.

61. Chiti F., Dobson C. M. 2006. Protein misfolding, functional amyloid, and human disease // *Annual Review of Biochemistry*. Vol. 75. P. 333-366.
62. Cioffi F., Adam R., Bansal R., Broersen K. 2021. A review of oxidative stress products and related genes in early Alzheimer's disease // *Journal of Alzheimer's Disease*. Vol. 83. Is. 3. P. 977–1001.
63. Clavaguera F., Bolmont T., Crowther R. A., Abramowski D., Frank S., Probst A., Fraser G., Stalder A. K., Beibel M., Staufenbiel M., Jucker M., Goedert M., Tolnay M/ 2009. Transmission and spreading of tauopathy in transgenic mouse brain // *Nature Cell Biology*. Vol. 11. P. 909-913.
64. Coppedè F. 2011. An overview of DNA repair in amyotrophic lateral sclerosis // *The Scientific world journal*. Vol. 11. P. 1679–1691.
65. Coppedè F., Migliore L. 2009. DNA damage and repair in Alzheimer's disease // *Current Alzheimer Research*. Vol. 6. Is. 1. P. 36–47.
66. Cornwell O., Radford S. E., Ashcroft A. E., Ault J. R. 2018. Comparing hydrogen deuterium exchange and fast photochemical oxidation of proteins: a structural characterisation of wild-type and $\Delta N6$ β -microglobulin // *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. Vol. 29. Is. 12. P. 2413-2426.
67. Coustou V., Deleu C., Saupe S., Begueret J. 1997. The protein product of the het-s heterokaryon incompatibility gene of the fungus *Podospora anserina* behaves as a prion analog // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Vol. 94. Is. 18. 9773–9778.
68. Cox B. S. 1965. Ψ , a cytoplasmic suppressor of super-suppressor in yeast // *Heredity*. Vol. 20. P. 505-521.
69. Crick F. H. C. 1958. On protein synthesis // *Symposia of the Society for Experimental Biology*. Vol. 12. H. 138-163.
70. Crick F. H. C. 1970. Central dogma of molecular biology // *Nature*. Vol. 227. P. 138-163.
71. Danish Rizvi S. M., Hussain T., Subaiea G. M., Shakil S., Ahmad A. 2018. Therapeutic targeting of amyloid precursor protein and its processing enzymes for breast cancer treatment. // *Current Protein & Peptide Science*. Vol. 19. Is. 9. P. 841–849.
72. De Summa S., Malebra G., Pinto R., Mori A., Mijatovich V., Tommasi S. 2017. GATK hard filtering: tunable parameters to improve variant calling for next generation sequencing targetes gene panel data // *BMC Bioinformatics*. Vol. 18. Article № 119.
73. Derkatch I. L., Bradley M. E., Hong J. Y., Liebman S. W. 2001. Prions affect the appearance of other prions: the story of [PIN(+)] // *Cell*. Vol. 106. Is. 2. P. 171–182.

74. Derkatch I. L., Bradley M. E., Masse S. V., Zadorsky S. P., Polozkov G. V., Inge-Vechtomov S. G., Liebman S. W. 2000. Dependence and independence of [PSI(+)] and [PIN(+)] : a two-prion system in yeast? // *The EMBO Journal*. Vol. 19. Is. 9. P. 1942-1952.
75. Derkatch I. L., Bradley M. E., Zhou P., Chernoff Y. O., Liebman S. W. 1997. Genetic and environmental factors affecting the *de novo* appearance of the [PSI⁺] prion in *Saccharomyces cerevisiae* // *Genetics*. Vol. 147. Is. 2. P. 507–519.
76. Derkatch I. L., Chernoff Y. O., Kushnirov V. V., Inge-Vechtomov S. G., Liebman S. W. 1996. Genesis and variability of [PSI] prion factors in *Saccharomyces cerevisiae* // *Genetics*. Vol. 144. Is. 4. P. 1375-1386.
77. Derkatch I. L., Uptain S. M., Outeiro T. F., Krishnan R., Lindquist S. L., Liebman S. W. 2004. Effect of Q/N-rich, polyQ, And non-polyQ amyloids on the *de novo* formation of the [PSI⁺] prion in yeast and aggregation of Sup35 *in vitro* // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Vol. 101. № 35. P. 12934-12939.
78. Dobson C. M. 2003. Protein folding and misfolding // *Nature*. Vol. 426. P. 884–890.
79. Dong C.-F., Shi S., Wang X.-F., An R., Li P., Chen J.-M., Wang X., Wang G.-R., Shan B., Zhang B.-Y., Han J., Dong Z.-P. 2008. The N-terminus of PrP is responsible for interacting with tubulin and fCJD related PrP mutants possess stronger inhibitive effect on microtubule assembly *in vitro* // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. Vol. 470. Is. 1. P. 83-92.
80. Donnelly N., Storchova Z. 2014. Dynamic karyotype, dynamic proteome: buffering the effects of aneuploidy // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular Cell Research*. Vol. 1843. Is. 2. P. 473–481.
81. Doronina V. A., Staniforth G. L., Speldewinde S. H., Tuite M. F., Grant C. M. 2015. Oxidative stress conditions increase the frequency of *de novo* formation of the yeast [PSI⁺] prion // *Molecular Microbiology*. Vol. 96. Is. 1. P. 163-74.
82. Doshay L. J. 1954. Problem situations in the treatment of paralysis agitans // *Journal of the American Medical Association*. Vol. 156. Is. 7. P. 680–684.
83. Driver J. A. 2014. Inverse association between cancer and neurodegenerative disease: review of the epidemiological and biological evidence // *Biogerontology*. Vol. 15. Is. 6. P. 547-557.
84. Driver J. A., Kurth T., Buring J. E., Gaziano J. M., Logroschino G. 2007a. Prospective case-control study of nonfatal cancer preceding the diagnosis of Parkinson's disease // *Cancer Causes & Control*. Vol. 18. Is. 7. P. 705–711.
85. Driver J. A., Logroschino G., Buring J. E., Gaziano J. M., Kurth T. 2007b. A prospective cohort study of cancer incidence following the diagnosis of Parkinson's disease // *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. Vol. 16. Is. 6. P. 1260–1265.

86. Du L., Rao,G., Wang,H., Li,B., Tian,W., Cui,J., He,L., Laffin,B., Tian,X., Hao,C., Liu,H., Sun, X., Zhu Y., Tang D. G., Mehrpour M., Lu Y., Chen Q. 2013. CD44-positive cancer stem cells expressing cellular prion protein contribute to metastatic capacity in colorectal cancer // *Cancer Research*. Vol. 73. Is. 8. P. 2682–2694.
87. Du Z., Park K. W., Yu H., Fan Q., Li L. 2008. Newly identified prion linked to the chromatin-remodeling factor Swi1 in *Saccharomyces cerevisiae* // *Nature Genetics*. Vol. 40. Is. 4. P. 460–465.
88. Dueholm M. S., Larsen P., Finster K., Stenvang M. R., Christiansen G., Vad B. S., Bøggild A., Otzen D. E., Nielsen P. H. 2015. The tubular sheaths encasing *Methanosaeta thermophila* filaments are functional amyloids // *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 290. Is. 33. P. 20590–20600.
89. Elbaz A., Peterson B. J., Bower J. H., Yang P., Maraganore D. M., McDonnell S. K., Ahlskog J. E., Rocca W. A. 2005. Risk of cancer after the diagnosis of Parkinson's disease: a historical cohort study // *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society*. Vol. 20. Is. 6. P. 719–725.
90. Elbaz A., Peterson B. J., Yang P., Van Gerpen J. A., Bower J. H., Maraganore D. M., McDonnell S. K., Ahlskog J. E., Rocca W. A. 2002. Nonfatal cancer preceding Parkinson's disease: a case-control study // *Epidemiology*. Vol. 13. Is. 2. P. 157–164.
91. Ferri A., Cozzolino, M., Crosio, C., Nencini M., Casciati A., Gralla E. B., Rotilio G., Valentine J. S., Carri M. T. 2006. Familial ALS-superoxide dismutases associate with mitochondria and shift their redox potentials // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Vol. 103. Is. 37. P. 13860–13865.
92. Fois A. F., Wotton C. J., Yeates D., Turner M. R., Goldacre M. J. 2010. Cancer in patients with motor neuron disease, multiple sclerosis and Parkinson's disease: record linkage studies // *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*. Vol. 81. Is. 2. P. 215–221.
93. Fortea J., Zaman S. H., Hartley S., Rafii M. S., Head E., Carmona-Iragui M. 2021. Down Syndrome-associated Alzheimer's disease: a genetic form of dementia // *Lancet Neurology*. Vol. 20. Is. 11. P. 930-942.
94. Frain L., Swanson D., Cho K., Gagnon D., Lu K. P., Batensky R. A., Driver J. 2017. Association of cancer and Alzheimer's disease risk in a national cohort of veterans // *Alzheimer's & Dementia*. Vol. 13. Is. 12. P. 1364-1370.
95. Freedman D. M., Wu J., Chen H., Kuncl R. W., Enewold L. R., Engels E. A., Freedman N. D., Pfeiffer R. M. 2016. Association between cancer and Alzheimer's disease in a U. S. Medicare population // *Cancer Medicine*. Vol. 5. Is. 10. P. 741-751.

96. Fujiwara K., Toda H., Ikeguchi M. 2012. Dependence of α -helical and β -sheet amino acid propensities on the overall protein fold type // *BMC Structural Biology*. Vol. 12. № 18.
97. Gajdusek D. C. 1962. Kuru: An appraisal of five years of investigation // *Eugenics Quarterly*. Vol. 9 №1. P. 69-74.
98. Gajdusek D. C. 1963. Kuru // *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. Vol. 57. Is. 3. P.151-169.
99. Gajdusek D.C., Gibbs C. J., Alpers M. 1966. Experimental transmission of a kuru-like syndrome to chimpanzees // *Nature*. Vol. 209. Is. 5025. P.794-796.
100. Geschwind M. D. 2015. Prion diseases // *Continuum*. Vol. 21. № 6. P. 1612-1638.
101. Gibbs C. J., Gajdusek D. C., Asher D. M., Alpers M. P., Beck E., Daniel P. M., Matthews, W. B. 1968. Creutzfeldt-Jakob Disease (Spongiform Encephalopathy): Transmission to the Chimpanzee // *Science*. Vol. 161. Is. 3839. P. 388–389.
102. Giraldo R. 2007. Defined DNA sequences promote the assembly of a bacterial protein into distinct amyloid nanostructures // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Vol. 104. Is. 44. P. 17388–17393.
103. Grant C. M. 2015. Sup35 methionine oxidation is a trigger for de novo [PSI⁽⁺⁾] prion formation // *Prion*. Vol. 9. I. 4. P. 257-65.
104. Gremer L., Schölzel D., Schenk C., Reinartz E., Labahn J., Ravelli R. G., Tusche M., Lopez-Inglesias C., Hoyer W., Heise H., Willbold D., Schröer G. F. 2017. Fibril structure of amyloid- β (1-42) by cryo-electron microscopy // *Science*. Vol. 358. Is. 6359. P. 116-119.
105. Grishin A.V., Rothenberg M., Downs M. A., Blumer K.J. 1998. Mot3, a Zn finger transcription factor that modulates gene expression and attenuates mating pheromone signaling in *Saccharomyces cerevisiae* // *Genetics*. Vol. 149. Is. 2. P. 879-892.
106. Guéguen Y., Bontemps A., Ebrahimian T. G. 2019. Adaptive responses to low doses of radiation or chemicals: their cellular and molecular mechanisms // *Cellular and Molecular Life Sciences*. Vol. 76. Is. 7. P. 1255-1273.
107. Gugliandolo A., Bramanti P., Mazzon E. 2017. Role of Vitamin E in the Treatment of Alzheimer's disease: Evidence from Animal Model // *International Journal of Molecular Science*. Vol. 18. Is. 12. 2504
108. Haedens V., Malagnac F., Silar P. 2005. Genetic control of an epigenetic cell degeneration syndrome in *Podospora ancerina* // *Fungal Genetics and Biology*. Vol. 42 Is. 6. P. 564-577.
109. Halfmann R., Wright J. R., Alberti S., Lindquist S., Rexach M. 2012. Prion formation by a yeast GLFG nucleoporin // *Prion*. Vol. 6, Is. 4. P. 391-399.
110. Harari Y., Ram Y., Rappoport N., Hanady L., Kupiec M. 2018. Spontaneous changes in ploidy are common in yeast // *Current biology*. Vol. 28. Is. 6. P .825-835.

111. Harrison, A. F., Shorter, J. 2017. RNA-binding proteins with prion-like domains in health and disease // *The Biochemical Journal*. Vol. 474. Is. 8. P. 1417–1438.
112. Hegde, M. L., Gupta, V. B., Anitha, M., Harikrishna, T., Shankar, S. K., Muthane, U., Subba Rao, K., Jagannatha Rao, K. S. 2006. Studies on genomic DNA topology and stability in brain regions of Parkinson's disease // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. Vol. 449. Is. 1-2. P. 143–156.
113. Hewetson A., Do H. Q., Myers C., Muthusubramanian A., Sutton R. B., Wylie B. J., Cornwall G. A. 2017. Functional Amyloids in Reproduction // *Biomolecules*. Vol. 7. Is. 3. № 46.
114. Holmes D. L., Lancaster A. K., Lindquist S., Halfmann R. 2013. Heritable remodeling of yeast multicellularity by an environmentally responsive prion // *Cell*. Vol. 153. Is. 1. P. 153-165.
115. Houck S. A., Cyr D. M. 2012. Mechanisms for quality control of misfolded transmembrane proteins // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*. Vol. 1818. Is. 4. P. 1108–1114.
116. Howie A. J. 2019. Origins of a pervasive, erroneous idea: the “green birefringence” of Congo red-stained amyloid // *International Journal of Experimental Pathology*. Vol. 100. Is. 4. P. 208-221.
117. Huang, B., Guo, Q., Niedermeier, M. L., Cheng, J., Engler, T., Maurer, M., Pautsch, A., Baumeister, W., Stengel, F., Kochanek, S., Fernández-Busnadiego, R. 2021. Pathological polyQ expansion does not alter the conformation of the Huntingtin-HAP40 complex // *Structure*. Vol. 29. Is. 8. P. 804–809.e5.
118. Hwang S., Jeong H., Hong E.H., Joo H.M., Cho K.S., Nam S.Y. 2019. Low-dose ionizing radiation alleviates A β 42-induced cell death via regulating AKT and p38 pathways in Drosophila Alzheimer's disease models // *Biology Open*. Vol. 8. Is. 2. bio.036657.
119. Inoue K., Kurabayashi A., Shuin T., Ohtsuki Y., Furihata M. 2012. Overexpression of p53 protein in human tumors // *Medical Molecular Morphology*. Vol. 45. P. 115-123.
120. Iourov I. Y., Vorsanova, S. G., Liehr, T., Yurov Y. B. 2009. Aneuploidy in the normal, Alzheimer's disease and ataxia-telangiectasia brain: differential expression and pathological meaning // *Neurobiology of Disease*. Vol. 34. Is. 2. P. 212–220.
121. Ishimaru D., Andrade L. R., Teixeira L. S., Quesado P. A., Maiolino L. M., Lopez P. M., Cordeiro Y., Costa L. T., Heckl W. M., Weissmüller G., Foguel D., Silva J. L. 2003. Fibrillar aggregates of the tumor suppressor p53 core domain // *Biochemistry*. Vol. 42. Is. 30. P. 9022–9027.
122. Itoh H., Kataoka H., Koita H., Nabeshima K., Inoue T., Kangawa K., Koono M. 1991. Establishment of a new human cancer cell line secreting protease nexin-II/amyloid beta protein

- precursor derived from squamous-cell carcinoma of lung // *International journal of cancer*. Vol. 49. Is. 3. P. 436–443.
123. Johnson A. D., Herzkowitz I. 1985. A repressor (MAT alpha 2 product) and its operator control expression of a set of cell type specific genes in yeast // *Cell*. Vol. 42. Is. 1. P. 237-247.
124. Julien C., Tomberlin C., Roberts C. M., Akram A., Stein G. H., Silverman M. A., Link C. D. 2018. *In vivo* induction of membrane damage by β -amyloid peptide oligomers // *Acta Neuropathologica Communications*. Vol. 6. Is. 1. P. 131.
125. Kachkin D. V., Volkov K. V., Sopova J. V., Bobylev A. G., Fedotov S. A., Inge-Vechtomov S. G., Galzitskaya O. V., Chernoff Y.O., Rubel A. A., Aksenova A.Y. 2022. Human RAD51 protein forms amyloid-like aggregates *in vitro* // *International Journal of Molecular Science*. Vol. 23. Is. 19. № 11657.
126. Kajava A. V., Baxa U., Steven A. C. 2010. Beta arcades: recurring motifs in naturally occurring and disease-related amyloid fibrils // *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. Vol. 24. Is. 5. P. 1311–1319.
127. Kalebina T. S., Plotnikova T. A., Gorkovskii A. A., Selyakh I. O., Galzitskaya O. V., Bezsonov, E. E., Gellissen G., Kulaev I. S. 2008. Amyloid-like properties of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall glucantransferase Bgl2p: prediction and experimental evidences // *Prion*. Vol. 2. Is. 2. P. 91–96.
128. Koç A., Wheeler L. J., Mathews C. K., Merrill G. F. 2004. Hydroxyurea arrests replication by a mechanism that preserves basal NTP pools // *Journal of biological chemistry*. Vol. 279. Is.1. P. 223-230.
129. Koval L., Proshkina E., Shaposhnikov M., Moskalev A. 2020. The role of DNA repair genes in radiation-induced adaptive response in *Drosophila melanogaster* is differential and conditional // *Biogerontology*. Vol. 21. Is. 1. P. 45-56.
130. Kumar D., Viberg J., Nilsson A.K., Chabes A. 2010. Highly mutagenic and severely imbalanced dNTP pools can escape detection by the S-phase checkpoint // *Nucleic Acid Research*. Vol. 38. Is. 12. P. 3975-3983.
131. Kunkel T. A., Erie D. A. 2015. Eukariotic mismatch repair in relation to DNA replication // *Annual Reviews of Genetics*. Vol. 49. P.291-313.
132. Kushnirov V. V., Ter-Avanesyan M. D. 1998. Structure and replication of yeast prions // *Cell*. Vol. 94. Is. 1. P. 13–16.
133. Kushnirov V. V., Dergaev A. A., Alexandrov A. I. 2021. Amyloid fragmentation and disaggregation in yeast and animals // *Biomolecules*. Vol. 11. Is. 12. P. 1884.
134. Lacroute F. 1971. Non-Mendelian mutation allowing ureidosuccinic acid uptake in yeast // *Journal of Bacteriology*. Vol. 106. № 2. P. 19–522.

135. Le Guen T., Ragu S., Guirouilh-Barbat J., Lopez B. S. 2014. Role of the double-strand break repair pathway in the maintenance of genomic stability // *Molecular & Cellular Oncology*. Vol. 2. Is. 1. e968020.
136. Lee C.-S., Haber J. E. 2015. Mating-type switching in *Saccharomyces cerevisiae* // *Microbiology spectrum*. Vol. 3. №. 2. MDNA3-0013-2014.
137. Lefouili M., Nam K. 2022. The evaluation of Bcftools mileup and GATK HaplotypeCaller for variant calling in non-human species // *Scientific reports*. Vol. 12. Article № 11331.
138. Lehrer S. 2018. Glioma and Alzheimer's disease // *Journal of Alzheimer's Disease Reports*. Vol. 2 Is. 1. P. 213-218.
139. Leong Y. Q., Lee S. W. H., Ng K. Y. 2021. Cancer Risk in Parkinson disease: an updated systematic review and meta-analysis // *European Journal of Neurology*. Vol. 28. Is. 12. P. 4219-4237.
140. LeVine H., 3rd. 1999. Quantification of beta-sheet amyloid fibril structures with thioflavin T // *Methods in Enzymology*. Vol. 309. P. 274–284.
141. Li H. 2014. Toward better understanding of artifacts in variant calling from high-coverage samples // *Bioinformatics*. Vol. 30. Is. 20. P. 2843-2851.
142. Li H., Handsaker B., Wysoker A., Fennell T., Ruan J., Homer N., Marth G., Abecasis G., Durbin R. 2009. Genome project data processing S: the sequence alignment/map format and SAMtools // *Bioinformatics*. Vol. 25. Is. 16. P. 2078–2079.
143. Li J. C., Kaminskas E. 1985. Deficient repair of DNA lesions in Alzheimer's disease fibroblasts // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Vol. 129. Is. 3. P.733-738.
144. Li X., Rayman J. B., Kandel E. R., Derkatch I. L. 2014. Functional role of Tia1/Pub1 and Sup35 prion domains: directing protein synthesis machinery to the tubulin cytoskeleton // *Molecular cell*. Vol. 55. Is. 2. P. 305–318.
145. Liang J., Pan Y., Zhang D., Guo C., Shi Y., Wang J., Chen Y., Wang X., Liu J., Guo X., Chen Z., Qiao T., Fan D. 2007. Cellular prion protein promotes proliferation and G1/S transition of human gastric cancer cells SGC7901 and AGS // *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. Vol. 21. Is. 9. P. 2247–2256.
146. Liberski P.P., Gajos A., Sikorska B., Lindenbaum S. 2019. Kuru, the first human prion disease // *Viruses*. Vol.11. Is. 3. № 232.
147. Liebman S. W., Chernoff Y. O. 2012. Prions in yeast // *Genetics*. Vol. 191. Is. 4. P. 1041–1072.
148. Liebman S. W., Sherman F. 1979. Extrachromosomal PSI+ determinant suppresses nonsense mutations in yeast // *Journal of Bacteriology*. Vol. 139. № 3. P. 1068–1071.
149. Lillenes M. S., Rabano A., Støen M., Riaz T., Misaghian D., Møllersen L., Esbensen Y., Günther C. C., Selnes P., Stenset V. T., Fladby T., Tønjum T. 2016. Altered DNA base excision

- repair profile in brain tissue and blood in Alzheimer's disease // *Molecular Brain*. Vol. 9. Is. 1. P. 61.
150. Lim S., Yoo B. K., Kim H. S., Gilmore H. L., Lee Y., Lee H. P., Kim S. J., Letterio J., Lee H. G. 2014. Amyloid- β precursor protein promotes cell proliferation and motility of advanced breast cancer // *BMC Cancer*. Vol. 14. № 928.
151. Lin X., Kapoor A., Gu Y., Chow M. J., Peng J., Zhao K., Tang D. 2020. Contributions of DNA damage to Alzheimer's disease // *International Journal of Molecular Sciences*. Vol. 21. Is. 5. № 1666.
152. Lindenbaum S. 2015. An annotated history of kuru // *Medicine Anthropology Theory*. Vol. 1. № 1. P. 95-126.
153. Lindquist S., Kim G. 1996. Heat shock protein 104 expression is sufficient for thermotolerance in yeast // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Vol. 93. Is. 11. P. 5301-5306.
154. Luk K. C., Kehm V., Carroll J., Zhang B., O'Brien P., Trojanowski J. Q., Lee V. M.-Y. 2012. Pathological α -synuclein transmission initiates Parkinson-like neurodegeneration in nontransgenic mice // *Science*. Vol. 16. Is. 338. P. 949-953.
155. Madabhushi R., Pan L., Tsai L. H. 2014. DNA damage and its links to neurodegeneration // *Neuron*. Vol. 83. Is. 2. 266–282.
156. Majumdar A., Cesario W. C., White-Grindley E., Jiang H., Ren F., Khan M. R., Li L., Choi E. M., Kannan K., Guo F., Unruh J., Slaughter B., Si K. 2012. Critical role of amyloid-like oligomers of *Drosophila* Orb2 in the persistence of memory // *Cell*. Vol. 148. Is. 3. P. 515–529.
157. Majumder M., House R., Palanisamy N., Qie S., Day T. A., Neskey D., Diehl J. A., Palanisamy V. 2016. RNA-Binding Protein FXR1 Regulates p21 and TERC RNA to Bypass p53-Mediated Cellular Senescence in OSCC // *PLoS Genetics*. Vol. 12. Is. 9. e1006306.
158. Málaga-Trillo E., Solis G. P., Schrock Y., Geiss C., Luncz L., Thomanetz V., Stuermer C. A. 2009. Regulation of embryonic cell adhesion by the prion protein // *PLoS Biology*. Vol. 7. Is. 3. e55.
159. Malovichko Y. V., Antonets K. S., Maslova A. R., Andreeva E. A., Inge-Vechtomov S. G., Nizhnikov A. A. 2019. RNA Sequencing Reveals Specific Transcriptomic Signatures Distinguishing Effects of the [SWI⁺] Prion and *SWII* Deletion in Yeast *Saccharomyces cerevisiae* // *Genes*. Vol. 10. Is. 3. P. 212.
160. Mao P., Reddy P. H. 2011. Aging and amyloid beta-induced oxidative DNA damage and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease: implications for early intervention and therapeutics // *Biochimica et Biophysica Acta*. Vol. 1812. Is. 11. P. 1359–1370.

161. Martínez-Montañés F., Rienzo A., Poveda-Huertes D., Pascual-Ahuir A., Proft M. 2013. Activator and repressor functions of the Mot3 transcription factor in the osmostress response of *Saccharomyces cerevisiae* // *Eukaryotic Cell*. Vol. 12. № 5. P. 636-547.
162. Matveenko A. G., Barbitoff Y. A., Jay-Garcia L. M., Chernoff Y. O., Zhouravleva G. A. 2018. Differential effects of chaperones on yeast prions: CURrent view // *Current Genetics*. Vol. 64. P. 317-325.
163. Mecocci P., MacGarvey U., Beal M. F. 1994. Oxidative damage to mitochondrial DNA is increased in Alzheimer's disease // *Annals of Neurology*. Vol. 36. Is. 5. P. 747–751.
164. Michaelis S. 1993. *STE6*, the yeast a-factor transporter // *Seminars in cell biology*. Vol. 4. Is. 1. P.17-27.
165. Migliore L., Botto N., Scarpato R., Petrozzi L., Ciprian G., Bonuccelli U. 1999. Preferential occurrence of chromosome 21 malsegregation in peripheral blood lymphocytes of Alzheimer disease patients // *Cytogenetics and Cell Genetics*. Vol. 87. Is. 1-2. P. 41–46.
166. Migliore L., Scarpato R., Coppede F., Petrozzi L., Bonuccelli U., Rodilla V. 2001. Chromosome and oxidative damage biomarkers in lymphocytes of Parkinson's disease patients // *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. Vol. 204. Is. 1. 61–66.
167. Miyazaki T., Ikeda K., Horie-Inoue K., Inoue S. 2014. Amyloid precursor protein regulates migration and metalloproteinase gene expression in prostate cancer cells // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Vol. 452. Is. 3 P. 828–833.
168. Moh C., Kubiak J. Z., Bajic V. P., Zhu X., Smith M. A., Lee H. G. 2011. Cell cycle deregulation in the neurons of Alzheimer's disease // *Results and Problems in cell Differentiation*. Vol. 53. P. 565–576.
169. Molina-Garcia L., Moreno-Del Álamo, M., Botias P., Martín-Moldes Z., Fernández M., Sánchez-Gorostiaga A., Alonso-Del Valle A., Nogales J., García-Cantalejo J., Giraldo R. 2017. Outlining Core Pathways of Amyloid Toxicity in Bacteria with the RepA-WH1 Prionoid // *Frontiers in Microbiology*. Vol. 8. № 539.
170. Montañés F. M., Pascual-Ahuir A., Proft M. 2011. Repression of ergosterol biosynthesis is essential for stress resistance and is mediated by Hog1 MAP kinase and the Mot3 and Rox1 transcription factors. // *Molecular Microbiology*. Vol. 79. Is.4. P.100-1023.
171. Morati F., Modesti M. 2021. Insights into the control of RAD51 nucleoprotein filament dynamics from single-molecule studies // *Current Opinion in Genetics & Development*. Vol. 71. P.182-187.
172. Muche A., Arendt T., Schiebs R. 2017. Oxidative stress affects processing of amyloid precursor protein in vascular endothelial cells // *PLOS One*. Vol. 12. Is. 6. e178127.

173. Mullaart E., Boerrigter M. E., Ravid R., Swaab D. F., Vijg J. 1990. Increased levels of DNA breaks in cerebral cortex of Alzheimer's disease patients // *Neurobiology of Aging*. Vol. 11. Is. 3. P. 169–173.
174. Musicco M., Adorni F., Di Santo S., Prinelli F., Pettenati C., Caltagirone C., Palmer K., Russo A. 2013. Inverse occurrence of cancer and Alzheimer disease: a population-based incidence study // *Neurology*. Vol. 81. Is. 4. P. 322–328.
175. Navalkar A., Ghosh S., Pandey S., Paul A., Datta D., Maji S. K. 2022. Prion-like p53 amyloid in cancer // *Biochemistry*. Vol. 59. Is. 2. P. 146-155.
176. Navalkar A., Pandey S., Singh N., Patel K., Datta D., Mohanty B., Jadhav S., Chaudhari P., Maji S. K. 2021. Direct evidence of cellular transformation by prion-like p53 amyloid infection // *Journal of Cell Science*, Vol. 134. Is. 11. jcs258316.
177. Neiryneck N., Glorieux G., Boelaert J., Schepers E., Liabeuf S., Dhondt A., Massy Z., Vanholder R. 2013. Uremia-related oxidative stress in leukocytes is not triggered by β 2-microglobulin // *Journal of Renal Nutrition*. Vol. 23. Is. 6. P. 456-63.
178. Nieznanski K., Nieznanska H., Skowronek K. J., Osiecka K. M., Stepkowski D. 2005. Direct interaction between prion protein and tubulin // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Vol. 334. Is. 2. P. 403–411.
179. Nieznanski K., Podlubnaya Z. A., Nieznanska H. 2006. Prion protein inhibits microtubule assembly by inducing tubulin oligomerization // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Vol. 349. Is. 1. P. 391–399.
180. Nizhnikov A. A., Antonets K. S., Bondarev S. A., Inge-Vechtomov S. G., Derkach I. L. 2016. Prions, amyloids, and RNA: Pieces of a puzzle // *Prion*. Vol. 10. Is. 3. P. 182–206.
181. Northam M. R., Robinson H. A., Kochenova O. V., Shcherbakova P.V. 2010. Participation of DNA polymerase ζ in replication of undamaged DNA in *Saccharomyces cerevisiae* // *Genetics*. Vol. 184. Is. 1. P. 27-42.
182. Nunomura A., Honda K., Takeda A., Hirai K., Zhu X., Smith M. A., Perry G. 2006. Oxidative damage to RNA in neurodegenerative diseases // *Journal of Biomedicine & Biotechnology*. Vol. 2006. № 82323.
183. Ohyagi Y., Asahara H., Chui D. H., Tsuruta Y., Sakae N., Miyoshi K., Yamada T., Kikuchi H., Taniwaki T., Murai H., Ikezoe K., Furuya H., Kawarabayashi T., Shoji M., Checler F., Iwaki T., Makifuchi T., Takeda K., Kira J., Tabira T. 2005. Intracellular Abeta42 activates p53 promoter: a pathway to neurodegeneration in Alzheimer's disease // *The FASEB Journal*. Vol. 2. P. 255-257.
184. Oliver C., Holland A. J. 1986. Down's syndrome and Alzheimer's disease: a review // *Psychological Medicine*. Vol. 16 Is. 2. P. 307–322.

185. Olsen J. H., Friis S., Frederiksen K. 2006. Malignant melanoma and other types of cancer preceding Parkinson disease // *Epidemiology*. Vol. 17. Is. 5. P. 582–587.
186. Olsen J. H., Friis S., Frederiksen K., McLaughlin J. K., Mellemkjaer L., Møller H. 2005. Atypical cancer pattern in patients with Parkinson's disease // *British Journal of Cancer*. Vol. 92. Is. 1. P. 201–205.
187. Oromendia A. B., Dodgson S. E., Amon A. 2012. Aneuploidy causes proteotoxic stress in yeast // *Genes & Development*. Vol. 26. Is. 24. P. 2696–2708.
188. Otzen D., Riek R. 2019. Functional Amyloids // *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. Vol. 11. Is. 12. a033860.
189. Oyama F., Cairns N. J., Shimada H., Oyama R., Titani K., Ihara Y. 1994. Down's syndrome: up-regulation of beta-amyloid protein precursor and tau mRNAs and their defective coordination // *Journal of Neurochemistry*. Vol. 62. Is. 3. P. 1062–1066.
190. Patel B. K., Gavin-Smyth J., Liebman S. W. 2009. The yeast global transcriptional co-repressor protein Cyc8 can propagate as a prion // *Nature Cell Biology*. Vol. 11. Is. 3. P. 344–349.
191. Patterson D., Costa A. C. S. 2005. Dawn syndrome and genetics - a case of linked histories // *Nature Reviews Genetics*. Vol. 6. Is. 2. P. 137–147.
192. Patterson D., Gardiner K., Kao F. T., Tanzi R., Watkins P., Gusella J. F. 1988. Mapping of the gene encoding the beta-amyloid precursor protein and its relationship to the Down syndrome region of chromosome 21 // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Vol. 85. Is. 21. P. 8266–8270.
193. Pellegrini L., Yu D. S., Lo T., Anand S., Lee M., Blundell T.L., Venkitaraman A. R. 2002. Insights into DNA Recombination from the Structure of a RAD51-BRCA2 Complex // *Nature*. Vol. 420. P. 287–293.
194. Peters H. L., Yan Y., Nordgren T. M., Cutucache C. E., Joshi S. S., Solheim J. C. 2013. Amyloid precursor-like protein 2 suppresses irradiation-induced apoptosis in Ewing sarcoma cells and is elevated in immune-evasive Ewing sarcoma cells // *Cancer Biology & Therapy*. Vol. 14. Is. 8. P. 752–760.
195. Picken M. M. 2020. The pathology of Amyloidosis in Classification: a review // *Acta Haematologica*. Vol. 143. Is. 4. P. 3322–3334.
196. Popovitch E. R., Wisniewski H. M., Barcikowska M., Silverman W., Bancher C., Sersen E., Wen G. Y. 1990. Alzheimer neuropathology in non-Down's syndrome mentally retarded adults // *Acta Neuropathologica*. Vol. 80. Is. 4. P. 362–367.
197. Potter H. 1991. Review and hypothesis: Alzheimer disease and Down syndrome--chromosome 21 nondisjunction may underlie both disorders // *American Journal of Human Genetics*. Vol. 48. Is. 6. P. 1192–1200.

198. Prasher V. P., Farrer M. J., Kessling A. M., Fisher E. M., West R. J., Barber P. C., Butler A. C. 1998. Molecular mapping of Alzheimer-type dementia in Down's syndrome // *Annals of Neurology*. Vol. 43. Is. 3. P. 380–383.
199. Prusiner S. B. 1982a. Research on scrapie // *The Lancet*. Vol. 320 Is. 8296. P. 494-495.
200. Prusiner S. B. 1982b. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie // *Science*. Vol. 216. Is. 4542. P. 136-144.
201. Prusiner S. B. 1984. Prions // *Scientific American*. Vol. 251. № 4. P. 50-59.
202. Prusiner S. B. 1989. Scrapie prions // *Annual Review of Microbiology*. Vol.43. P. 345-347.
203. Prusiner S. B. 1998. Prions // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Vol .95. Is. 23. P. 13363-13383.
204. Prusiner S. B. 2001. Shattuck lecture--neurodegenerative diseases and prions // *The New England journal of medicine*. Vol. 344. Is. 20. P. 1516–1526.
205. Prusiner S. B., Scott M. R. 1997. Genetics of prions// *Annual review of genetics*. Vol. 31.P. 139–175.
206. Ramsook C. B., Tan C., Garcia M. C., Fung R., Soybelman G., Henry R., Litewka A., O'Meally S., Otoo H. N., Khalaf R. A., Dranginis A. M., Gaur N. K., Klotz S. A., Rauceo J. M., Jue C. K., Lipke P. N. 2010. Yeast cell adhesion molecules have functional amyloid-forming sequences // *Eukaryotic cell*, Vol. 9. Is. 3. P. 393–404.
207. Roberts B. T., Wickner R. B. 2003. Heritable activity: a prion that propagates by covalent autoactivation // *Genes & Development*. Vol. 17. P. 2083-2087.
208. Robison, S. H., Munzer, J. S., Tandan, R., Bradley, W. G. 1987. Alzheimer's disease cells exhibit defective repair of alkylating agent-induced DNA damage // *Annals of Neurology*. Vol. 21. Is. 3. P. 250–258.
209. Roe C. M., Fitzpatrick A. L., Xiong C., Sieh W., Kuller L., Miller J. P., Williams M. M., Kopan R., Behrens M. I., Morris J. C. 2010. Cancer linked to Alzheimer's disease but not vascular dementia // *Neurology*. Vol. 74. Is. 2. P. 106-112.
210. Rose M., Winston F., Hieter P. *Methods in yeast genetics – a laboratory course manual*. - New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1990. — 198 pp.
211. Rovelet-Lecrux A., Hannequin D., Raux G., Le Meur N., Laquerrière A., Vital A., Dumanchin C., Feuillette S., Brice A., Vercelletto M., Dubas F., Frebourg T., Campion D. 2006. APP locus duplication causes autosomal dominant early-onset Alzheimer disease with cerebral amyloid angiopathy // *Nature Genetics*. Vol. 38. Is. 1. P. 24–26.
212. Ryzhova T. A., Sopova J. V., Zadorsky S. P., Siniukova V. A., Sergeeva A. V., Galkina S. A., Nizhnikov A. A., Shenfeld A. A., Volkov K. V., Galkin A. P. 2018. Screening for amyloid proteins in the yeast proteome // *Current Genetics*. Vol. 64. 2. P. 469–478.

213. Santaguida S., Vasile E., White E., Amon A. 2015. Aneuploidy-induced cellular stresses limit autophagic degradation // *Genes & Development*. Vol. 29. Is. 19. P. 2010–2021.
214. Sarkar N., Dubey V. K. 2013. Exploring critical determinants of protein amyloidogenesis: a review // *Journal of Peptide Science*. Vol. 19. Is. 9. P. 529-536.
215. Sawaya M. R., Sambashivan S., Nelson R., Ivaniva M. I., Sievers S. A., Apostol M. I., Thompson M. J., Balbirnie M., Wiltzius J. J. W., McFarlane H. T., Madsen A. Ø., Riekel C., Eisenberg D. 2007. Atomic structure of amyloid cross-beta spines reveals varied steric zippers // *Nature*. Vol. 447. P. 453-457.
216. Schaaper R. M. 1998. Antimutator mutants in bacteriophage T4 and *Escherichia coli* // *Genetics*. Vol. 148. Is. 4. P. 1579-1585.
217. Schurp N., Kapell D., Lee J. H., Ottman R., Mayeux R. 1994. Increased risk of Alzheimer's disease in mothers of adults with Down's syndrome // *Lancet*. Vol. 344. Is. 8919. P. 353-356.
218. Sengupta P., Cochran B. H. 1991. Mat alpha 1 can mediate gene activation by a-mating factor // *Genes and Development*. Vol. 5. Is. 10. P. 1924-1934.
219. Sergeeva A. V., Galkin A. P. 2020. Functional amyloids of eukaryotes: criteria, classification, and biological significance // *Current Genetics*. Vol. 66. Is. 5. P. 849-866.
220. Sergeeva A. V., Sopova J. V., Belashova T. A., Siniukova V. A., Chirinskaite A. V., Galkin, A. P., Zadorsky S. P. 2019. Amyloid properties of the yeast cell wall protein Toh1 and its interaction with prion proteins Rnq1 and Sup35 // *Prion*. Vol. 13 Is. 1. P. 21–32.
221. Sherman F., Fink G. R., Hicks J. B. *Methods in yeast genetics*. — New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1986. — 235 pp.
222. Shoup D., Priola S. A. 2023. Cell biology of prions in vivo and in vitro // *Cell and Tissue Research*. Vol. 392. P.269-283.
223. Sideri T. C. Koloteva-Levine N., Tuite M. F., and Grant C. M. 2011. Methionine oxidation of Sup35 protein induces formation of the [PSI⁺] prion in a yeast peroxiredoxin mutant // *Journal of biological chemistry*. Vol. 286. P. 38924–38931.
224. Sideri T. C., Stojanovski K., Tuite M. F., Grant C. M. 2010. Ribosome-associated peroxiredoxins suppress oxidative stress-induced *de novo* formation of the [PSI⁺] prion in yeast // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Vol. 107. Is. 4. P. 6394–6399.
225. Sigurdsson B. 1954. RIDA, A chronic encephalitis of sheep: with general remarks on infections which develop slowly and some of their special characteristics // *British Veterinary Journal*. Vol. 110. Is. 9. P. 341-344.

226. 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. Is. 1. P. 9-27.
227. Sondheimer N., Lindquist S. 2000. Rnq1: an epigenetic modifier of protein function in yeast // *Molecular Cell*. Vol. 5. P.163–172.
228. Sopova J. V., Koshel E. I., Belashova T. A., Zadorsky S. P., Sergeeva A. V., Siniukova V. A., Shenfeld A. A., Velizhanina M. E., Volkov K. V., Nizhnikov A. A., Kachkin D. V., Gaginskaya E. R., Galkin A. P. 2019. RNA-binding protein FXR1 is presented in rat brain in amyloid form // *Scientific Reports*. Vol. 9. Is. 1. № 18983.
229. Sørensen S. A., Fenger K., Olsen J. H. 1999. Significantly lower incidence of cancer among patients with Huntington disease: An apoptotic effect of an expanded polyglutamine tract? // *Cancer*. Vol. 86. Is. 7. P. 1342–1346.
230. Stingele S., Stoehr G., Peplowska K., Cox J., Mann M., Storchova Z. 2012. Global analysis of genome, transcriptome and proteome reveals the response to aneuploidy in human cells // *Molecular Systems Biology*. Vol. 8. № 608.
231. Suram A., Hegde M. L., Rao K. S. 2007. A new evidence for DNA nicking property of amyloid beta-peptide (1-42): relevance to Alzheimer's disease // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. Vol. 463. Is. 2. P. 245–252.
232. Suzuki G., Shimazu N., Tanaka M. 2012. A yeast prion, Mod5, promotes acquired drug resistance and cell survival under environmental stress // *Science*. Vol. 336. Is. 6079. P. 355–359.
233. Symington L. S. 2002. Role of *RAD52* epistasis group genes in homologous recombination and double-strand break repair // *Microbiology and molecular biology reviews*. Vol. 6. № 4. P. 630-670.
234. Taglialegna A., Lasa I., Valle J. 2016. Amyloid structures as biofilm matrix scaffolds // *Journal of Bacteriology*. Vol. 198. Is. 19. P. 2579–2588.
235. Talevich E., Shain A. H., Botton T., Bastian B.C. 2014. CNVkit: Genome-wide copy number detection and visualization from targeted sequencing // *PLOS Computational Biology*. Vol. 12. Is. 4. E1004873.
236. Tanaka M. 2010. A protein transformation protocol for introducing yeast prion particles into yeast // *Methods in enzymology*. Vol. 470. P. 681-693.
237. Tang Y. C., Williams B. R., Siegel J. J., Amon A. 2011. Identification of aneuploidy-selective antiproliferation compounds // *Cell*. Vol. 144. Is. 4. P. 499–512.

238. Tikhomirova V. L., Inge-Vechtomov S. G. 1996. Sensitivity of *sup35* and *sup45* suppressor mutants in *Saccharomyces cerevisiae* to the anti-microtubule drug benomyl // *Current Genetics*. Vol. 30. Is. 1. P. 44–49.
239. Timofeeff-Ressovsky N. W., Zimmer K. G., Delbruck M. 1935. Über die Natur der Genmutation und der Genstruktur // *Nachr. Ges. Wiss. Göttingen. Fachr.* VI. N. F. Bd. 1. № 13. S. 189-245. (Русский перевод см: Тимофеев-Ресовский Н. В. Избр. труды. М.: Наука, 2009. С. 437-480).
240. Torres E. M., Sokolsky T., Tucker C. M., Chan L. Y., Boselli M., Dunham M. J., Amon A. 2007. Effects of aneuploidy on cellular physiology and cell division in haploid yeast // *Science*. Vol. 317. Is. 5840. P. 916–924.
241. Torres E.M., Williams B.R., Tang Y.C., Amon A. 2010. Thoughts on aneuploidy // *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. Vol. 75. P. 445–451.
242. Trippi F., Botto N., Scarpato R., Petrozzi L., Bonuccelli U., Latorraca S., Sorbi S., Migliore L. 2001. Spontaneous and induced chromosome damage in somatic cells of sporadic and familial Alzheimer's disease patients // *Mutagenesis*. Vol. 16. Is. 4. P. 323–327.
243. Turnbull S., Tabner B. J., Brown D. R., Allsop D. 2003. Generation of hydrogen peroxide from mutant forms of the prion protein fragment PrP121-231 // *Biochemistry*. Vol. 42. Is. 25. P. 7675–7681.
244. Tyedmers J., Madariaga M. L., Lindquist S. 2008. Prion switching in response to environment stress // *PLoS Biology*. Vol. 6. Is. 11. e294.
245. Tyedmers J., Mogk A., Bukau B. 2010. Cellular strategies for controlling protein aggregation // *Nature reviews. Molecular Cell Biology*. Vol. 11. Is. 11. P. 777–788.
246. Valouev I. A., Kushnirov V. V., Ter-Avanesyan M. D. 2002. Yeast polypeptide chain release factors eRF1 and eRF3 are involved in cytoskeleton organization and cell cycle regulation // *Cell Motility and the Cytoskeleton*. Vol. 52. Is. 3. P. 161–173.
247. Vasudevan S., Tong Y., Steitz J. A. 2007. Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation // *Science*. Vol. 318. Is. 5858. P. 1931–1934.
248. Watson J. D., Crick F. H. C. 1953. Molecular structure of nucleic acids // *Nature*. V. 171. P. 737-738.
249. Watt B., van Niel G., Raposo G., Marks M. S. 2013. PMEL: a pigment cell-specific model for functional amyloid formation // *Pigment Cell & Melanoma Research*. Vol. 26. Is. 3. P. 300–315.
250. Weissman L., Jo D. G., Sørensen M. M., de Souza-Pinto N. C., Markesbery W. R., Mattson M. P., Bohr V. A. 2007. Defective DNA base excision repair in brain from individuals with

- Alzheimer's disease and amnesic mild cognitive impairment // *Nucleic Acids Research*. Vol. 35. Is. 16. P. 5545–5555.
251. Wickner R. B. 1994. [URE3] as an altered URE2 protein: evidence for a prion analog in *Saccharomyces cerevisiae* // *Science*. Vol. 264. № 5158. P. 566–569.
252. Wickner R.B. 2016. Yeast and Fungal Prions // *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. Vol. 8.Is. 9. a023531.
253. Windl O., Dawson M. 2012. Animal prion diseases. In: Harris J. Protein Aggregation and Fibrillogenesis in Cerebral and Systemic Amyloid Disease. Subcellular Biochemistry. Vol. 65. Springer.
254. Wisniewski K. E., Dalton A. J., McLachlan C., Wen G. Y., Wisniewski H. M. 1985. Alzheimer's disease in Down's syndrome: clinicopathologic studies // *Neurology*. Vol. 35. Is. 7. P. 957–961.
255. Wu H. Y., Kuo P. C., Wang Y. T., Lin H. T., Roe A. D., Wang B. Y., Han C. L., Hyman B. T., Chen Y. J., Tai H. C. 2018. β -Amyloid induces pathology-related patterns of Tau hyperphosphorylation at synaptic terminals // *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*. Vol. 77. Is. 9. P. 814–826.
256. Yakupova E. I., Bobyleva L. G., Vichkyantsev I. M., Bobylev A. G. 2019. Congo red and amyloids: history and relationship // *Bioscience reports*. Vol. 39. Is. 1. BSR20181415.
257. Yamada M., Sasaki H., Mimori Y., Kasagi F., Sudoh S., Ikeda J., Hosoda Y., Nakamura S., Kodama K. 1999. Prevalence and risk of dementia in the Japanese population: RERF's adult health study Hiroshima subjects. Radiation effects research foundation // *Journal of the American Geriatrics Society*. Vol. 47. Is. 2. P.189-195.
258. Yang X., Cheng Z., Zhang L., Wu G., Shi R., Gao Z., Li C. 2017. Prion protein family contributes to tumorigenesis via multiple pathways // *Advances in experimental medicine and biology*. Vol. 1018. P. 207–224.
259. Yang Z., Fan Y., Deng Z., Wu B., Zheng Q. 2012. Amyloid precursor protein as a potential marker of malignancy and prognosis in papillary thyroid carcinoma // *Oncology letters*. Vol. 3. Is. 6. P. 1227–1230.
260. Yatin S. M., Varadarajan S., Link C. D., Butterfield D. A. 1999. *In vitro* and *in vivo* oxidative stress associated with Alzheimer's amyloid beta-peptide (1-42) // *Neurobiology of aging*. Vol. 20. Is. 3. P. 325–342.
261. Zhuk A.S., Shiriaeva A. A., Andreychuk Y.A., Kochenova O.V., Tarakhovskaya E. R., Bure V. M., Pavlov Y. I., Inge-Vechtomov S. G., Stepchenkova E. I. 2023. Detection of primary DNA lesions by transient changes in mating behavior in yeast *Saccharomyces cerevisiae* using the alpha-test // *International journal of Molecular Sciences*. Vol. 24. Is. 15. № 12163.