



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,  
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2004131970/13, 03.11.2004

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
03.11.2004

(43) Дата публикации заявки: 10.04.2006

(45) Опубликовано: 10.03.2007 Бюл. № 7

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: SU 629548 A1, 25.10.1978. JP 2004000060, 08.01.2004. CA 2477002, 04.09.2003. HUGHES S.R., GOYAL S., SUN J.E., GONZALEZ-DEWHITT P., FORTES M.A., RIEDEL N.G., SAHASRABUDHE S.R., Two-hybrid system as a model to study the interaction of beta-amyloid peptide monomers, Proc Natl Acad Sci USA. 1996 Mar 5; 93(5):2065-70. HINES V., ZHANG W., RAMAKRISHNA N., (см. прод.)

Адрес для переписки:

199034, Санкт-Петербург, Университетская  
наб., 7/9, Университет, Департамент  
интеллектуальной собственности и трансфера  
технологий, Т.И. Матвеевой

(72) Автор(ы):

Галкин Алексей Петрович (RU),  
Цапонина Ольга Евгеньевна (RU),  
Рубель Александр Анатольевич (RU),  
Наволоцкая Виктория Васильевна (RU),  
Лада Артем Геннадиевич (RU),  
Петрова Ирина Томасовна (RU),  
Смирнов Александр Федорович (RU),  
Инге-Вечтомов Сергей Георгиевич (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Санкт-Петербургский государственный  
университет (СПбГУ) (RU)

(54) ГИБРИДНЫЙ ГЕН P<sub>cup1</sub> - A<sub>β</sub> SUP35MC ДЛЯ АНАЛИЗА ФАКТОРОВ, РЕГУЛИРУЮЩИХ ПРОДУКЦИЮ, АГРЕГАЦИЮ И ДИСАГРЕГАЦИЮ ПЕПТИДА АМИЛОИД β (A<sub>β</sub>) ЧЕЛОВЕКА В ДРОЖЖЕВОЙ СИСТЕМЕ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биотехнологии и может быть использовано в медицине. Гибридный ген P<sub>cup1</sub>-A<sub>β</sub>-SUP35MC получен на основе промотора CUP1, последовательности, кодирующей полноразмерный амилоидный пептид бета (A<sub>β</sub>-пептид) человека,

последовательности, кодирующей M и C домены белка Sup35 дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, и последовательности, терминирующей трансляцию. Применение изобретения позволяет проводить масштабный скрининг агентов, регулирующих агрегацию A<sub>β</sub>-пептида. 2 ил.

(56) (продолжение):

STYLES J., MEHTA P., KIM K.S., INNIS M., MILLER D.L., The expression and processing of human beta-amyloid peptide precursors in *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for a novel endopeptidase in the yeast secretory system, *Cell Mol Biol Res.* 1994; 40(4):273-84.



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,  
PATENTS AND TRADEMARKS

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**(21), (22) Application: **2004131970/13, 03.11.2004**(24) Effective date for property rights: **03.11.2004**(43) Application published: **10.04.2006**(45) Date of publication: **10.03.2007 Bull. 7**

Mail address:

**199034, Sankt-Peterburg, Universitetskaja  
nab., 7/9, Universitet, Departament  
intelektual'noj sobstvennosti i transfera  
tehnologij, T.I. Matveevoj**

(72) Inventor(s):

**Galkin Aleksej Petrovich (RU),  
Tsaponina Ol'ga Evgen'evna (RU),  
Rubel' Aleksandr Anatol'evich (RU),  
Navolotskaja Viktorija Vasil'evna (RU),  
Lada Artem Gennadievich (RU),  
Petrova Irina Tomasovna (RU),  
Smirnov Aleksandr Fedorovich (RU),  
Inge-Vechtomov Sergej Georgievich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Sankt-Peterburgskij gosudarstvennyj  
universitet (SPbGU) (RU)**

(54) **P<sub>CUP1</sub>-A<sub>β</sub>-SUP35MC HYBRID GENE FOR ANALYSIS OF FACTORS REGULATING  
PRODUCTION, AGGREGATION AND DISAGGREGATION OF HUMAN AMYLOID β (A<sub>β</sub>) PEPTIDE IN  
YEAST SYSTEM**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology, medicine.

SUBSTANCE: P<sub>CUP1</sub>-A<sub>β</sub>-SUS35MC hybrid gene is produced on the base of CUP1 promoter, sequence encoding of full-length human amyloid beta (A<sub>β</sub>)

peptide, sequence encoding of M and C domains of Sup35 protein of *Saccharomyces cerevisiae*, and translation terminating sequence.

EFFECT: method for scale screening of A<sub>β</sub>-peptide aggregation regulating agents.  
2 dwg

Изобретение относится к генной инженерии и биомедицинской промышленности и представляет собой последовательность нуклеотидов ДНК, кодирующих гибридный ген  $A_{\beta}$ -SUP35MC.

Изобретение имеет большой практический, медицинский и нравственный аспект, поскольку касается, в частности, не только проблемы увеличения средней продолжительности жизни человека, но и его психического здоровья. С увеличением средней продолжительности жизни в развитых странах закономерно увеличивается число людей, страдающих нейродегенеративными заболеваниями. В связи с этим исследование механизмов нейродегенеративных заболеваний и поиски пути их лечения являются одним из приоритетных направлений современной биомедицины. Наибольший практический интерес представляют исследования болезни Альцгеймера (одной из широко распространенных форм старческого маразма), связанной с формированием в тканях центральной нервной системы так называемых амилоидных бляшек, основным компонентом которых является пептид  $A_{\beta}$ .  $A_{\beta}$ -пептид представляет собой продукт одного из двух путей протеолиза белка APP (Amyloid Precursor Protein) (1) - Wisniewski T., Ghiso J., Frangione B. Biology of  $A_{\beta}$  amyloid in Alzheimer's disease. // Neurobiology of disease. 1997. 4: 313-328. Есть основания полагать, что формирование амилоидных бляшек является результатом нарушения процессинга, что может приводить к увеличению продукции  $A_{\beta}$ -пептида (2) - Citron M., Westaway D., Xia W., Carlson G. et al. Mutant presenilins of Alzheimer's disease increase production of 42-residue amyloid beta-protein in both transfected cells and transgenic mice. // Nat Med. 1999 V3. P.67-72; (3) - Suzuki N., Cheung T.T., Cai X.D., Odaka A. et al. An increased percentage of long amyloid beta protein secreted by familial amyloid beta protein precursor (beta APP717) mutants. // Science. 1994. 264. P.1336-1340; (4) - Tamaoka A., Odaka A., Ishibashi Y., Usami M. et al. APP717 missense mutation affects the ratio of amyloid beta protein species (A beta 1-42/43 and a beta 1-40) in familial Alzheimer's disease brain. J Biol Chem. 1994. 269(52). P. 32721-32724. В олигомерной изоформе  $A_{\beta}$ -пептид представлен в виде  $\beta$ -слоев и вызывает нейротоксический эффект (5) - Price D.L., Sisodia S.S. Mutant genes in familial Alzheimer's disease and transgenic models. Annu Rev Neurosci. 1998. V21. P.479-505. У людей среднего возраста это заболевание встречается достаточно редко, однако после 85 лет болезнью Альцгеймера страдает каждый третий. Так, по прогнозам нобелевского лауреата Стенли Прусинера к 2025-му году число американцев, страдающих этим заболеванием, составит 10 миллионов, а к 2050-му 50 миллионов (6) - Prusiner S.B. Shattuck lecture - neurodegenerative diseases and prions. // N Eng J Med. 2001. V.344. No.20. P.1516-1526. Болезнь Альцгеймера неизбежно приводит к нарушению психической и физической активности и, в конечном итоге, имеет летальный исход. До настоящего времени не существует способов борьбы с этим неизлечимым недугом. В связи с этим исследование биологических аспектов этого заболевания и поиски лекарственных средств против болезни Альцгеймера чрезвычайно актуальны.

Характеристика гибридного гена.

Гибридный ген  $P_{\text{cup1}}-A_{\beta}$ -SUP35MC для анализа факторов, регулирующих продукцию, агрегацию и дисагрегацию пептида амилоид  $\beta$  ( $A_{\beta}$ ) человека в дрожжевой системе, имеющий размер 2493 пар оснований, состоит из следующих элементов:

фрагмента XhoI-BamHI размером 477 п.о., представляющего последовательность, индуцибельного CUP1-промотора для экспрессии последовательностей в дрожжевой клетке. Уровень экспрессии последовательностей под контролем CUP1-промотора зависит от концентрации ионов меди в питательной среде. С увеличением концентрации ионов меди увеличивается уровень экспрессии последовательностей, контролируемых CUP1-промотором;

BamHI-BamHI фрагмента размером 135 пар оснований, представляющего собой последовательность, кодирующую амилоидный пептид бета ( $A_{\beta}$ -пептид) человека, размером 40 аминокислот, фланкированную ТАТА-боксом и старт-кодоном (АТО) с 5'-конца;

VamHI-SacI фрагмента размером 1879 пар оснований, представляющего собой последовательность, кодирующую М и С домены белка Sup35 дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, фланкированную сайтом рестрикции VamHI с 5', а также последовательностями, терминирующими транскрипцию и трансляцию, и сайтом Sad с 3'-

5 конца. Функции М домена неизвестны. С домен является вспомогательным фактором терминации трансляции eRF3 (7) - Zhouravleva G., Frolova L., Le Goff X., Le Guellec R., Hige-Vechtomov S., Kisselev L., Philippe M. Termination of translation in eukaryotes is governed by two interacting polypeptide chain release factors, eRF1 and eRF3. // EMBO J. 1995. 14:4065-4072. Инактивация С домена приводит к снижению

10 точности терминации трансляции и индукции нонсенс-супрессии.

Взаимное расположение элементов гибридного гена P<sub>CUPI</sub>-A<sub>β</sub>-SUP35MC представлено на фиг.1.

На фиг.1 указаны сайты рестрикции (XhoI, VamHI, VamHI и Sad), фланкирующие элементы гибридного гена (CUPI-промотор, последовательность, кодирующая A<sub>β</sub>-пептид

15 человека и фрагмент, кодирующий М и С домены дрожжевого гена SUP35). Цифрами указаны номера нуклеотидов кодирующей цепи, вслед за которыми соответствующая рестриктаза гидролизует последовательность.

Элементы (последовательности, кодирующие A<sub>β</sub>-пептид и Sup35MC) находятся под контролем CUPI-промотора, фланкированы сайтами рестрикции и представляют собой

20 одну открытую рамку считывания.

В конкретном примере ген встроен в центромерную плазмиду [P<sub>CUPI</sub>-A<sub>β</sub>-SUP35MC(UBA3)] , которая содержит бактериальный и дрожжевой орижины репликации, ген устойчивости к ампицилину - AmpR и ген URE3.

Нуклеотидная последовательность гибридного гена P<sub>CUPI</sub>-A<sub>β</sub>-SUP35MC:

25 ctcgagaagccgatccattaccgacattggcgctatacgtgcatatgttcatgtatgtatctgtattaaacacatttgtatt  
 attttctcatatagtgtataggttatacggatgatttaattattactcaccacccttatttcaggctgatatctagccttgttactagt  
 tagaaaaagacatttttctgctcagtcactgtcaagagattcttttctgctggcatttctctagaagcaaaaagagcgcgtctttcc  
 gctgaaccggtccagcaaaaagactaccaacgcaatattgattgtcagaatcatataaaagagaagcaataactccttcttctgt  
 atcaattgcattataatattcttcttctgttagtgcataatcatatagaagtcatcgaatagatattaagaaaaaactgtacaatcaatc  
 30 aatcaatcatcacataaaatgttcaaggatcctatatgtctgatgcagaattccgacatgactcaggatataagttcatcaaaaa  
 ttggtgttcttgcagaagatgtgggttcaacaagggtgcaatattggactcatggggcggtgttctcggatccatgtctttaa  
 cgacttcaaaaagcaaaaaagcaggccgctcccaaaccaagaagacttgaagcttctccagttccggatcaagttggcc  
 aatgctaccaagaaggttggcacaacacctgccaatctgataagaagaggagaagctgctgaaccaagaaccaac  
 35 taaagagccaacaaggtcgaagaaccagttaaaaaggaggagaaccagtcagactgaagaaaagacggaggaaaaatc  
 ggaacttcaaaaggtagaagaccttaaatctctgaaatcaacacataatcaacaatgccaatgttaccagtctgatgcctgat  
 caaggaacaggaagaagaagtgatgacgaagtgttaacgatagatctgaattccatggatgtttggtgtaaaagatcacgtt  
 cttaatttctatgggtcatgtttagtccggtaaatctactatgggtgtaaatctactatactgactggctctgtggataagagaactat  
 tgagaatatgaaagagaagccaaggatgcaggcagacaagggttgacttgcattgggtcatggataccaacaagaagaaa  
 gaaatgatgtaagactatcgaagttgtaaggcctacttgaactgaaaaagggcgttataccatattggatgctcctggtcataa  
 40 aatgtacgttccgagatgatcgggtgcttcaagctgatgttggtgttttggcatttccgccagaaggggtgagtacgaaacc  
 ggtttgagagaggtggtcaaacctgtgaacacgcctattggccaagaccaaggtgtaataagatggttctcgtcgtaaataa  
 gatggatgaccaaccgttaactggtctaaaggaacgttacgaccaatgtgtgagtaatgtcagcaatttctgagagcaattggtta  
 caacattaagacagacggtgtattatgccagatccggctacagtggtgcaaatgtgaaagatcacgtagatccaaaagaatgcc  
 atggtacaccggcccaactctgttagaatatctggatacaatgaaccacgtcgaccgtcacatcaatgtccattcatgttgcctatt  
 45 gccgctaagatgaaggatctaggtaccatcgttgaaggtaaaatgaatccggctcatatcaaaaagggtcaatccaccctactgat  
 gcctaacaacaccgctgtgaaattcaaaatattacaacgaaactgaaatgaagttgatggctatgttggtgagcaagttaa  
 actaagaatcaaaaggtgtgaaagaagacatttaccaggtttgtactaacatcgccaaagaaccctatcaagaggtttaccaa  
 gttttagctcaaatgctattgtagaattaaatctatcatagcagccgggttttcatgtgttatgcatgttcatacagcaattgaagag  
 gtacataattgtaagttatgcacaattagaagaagggtaccaaccgtaagtaagaaccacctgcttttgtaagaagggtatga  
 50 aggtcatcgtgttttagaaactgaagctccagtttgttggaacttaccagattaccctcaattaggttagattcactttgagagat  
 caaggtaccacaatagcaattgtaaaattgttaaaattgccgagtaaatcttgcaacataagtaaatgcaaacacaataatacc  
 gatcataaagcatttctctatattaaaaacaagggttaataaagctgttatatatatatatatatagacgtataattagtttagttct  
 tttgtaccatataaccataaacaagggtgagctc

Получение гибридного гена  $P_{cup1}$ - $A_{\beta}$ -SUP35MC и пример реализации.

Последовательность, кодирующая  $A_{\beta}$ -пептид, была получена при помощи стандартного метода «RT-PCR» из тотальной РНК мозга абортуса (протокол приведен ниже). Праймеры содержат регуляторные последовательности (ТАТА-бок и кодон АТГ, иницирующий транскрипцию), сайты рестрикции *Vam*HI и *Sad* и последовательности комплиментарные 5' и 3' концам  $A_{\beta}$ , кодирующего 40 аминокислот.

Нуклеотидная последовательность праймеров:

F-primer: 5' GGGTCCAC GGATCC TAT ATG TCT GATGCAGAATTCCGACAT 3'

R-primer: 5' GTTATAAA GGATCC GACAACACCGCCACCCAT 3'

Для получения односторонней копии сДНК была проведена реакция обратной транскрипции:

Тотальная РНК из мозга абортуса - 1  $\mu$ l (1  $\mu$ g/ $\mu$ l)

Праймер F - 1  $\mu$ l (100 ng)

H<sub>2</sub>O - 10  $\mu$ l

70°C 5 мин

охлаждать до RT 15 мин

Добавить:

5 × буфер - 4  $\mu$ l

dNTP - 3  $\mu$ l (2mM)

ревертаза - 1  $\mu$ l

инкубировать 1 ч при 40°C

Полимеразная цепная реакция:

кДНК - 2  $\mu$ l

10 × буфер - 5

dNTP - 2  $\mu$ l (2mM)

праймер F - 1  $\mu$ l (100 ng)

праймер R - 1  $\mu$ l (100 ng)

H<sub>2</sub>O - 38  $\mu$ l

- полимеразы "Vent" - 1  $\mu$ l

Полимеразная цепная реакция:

Фаза 1 94° 1 мин

Фаза 2 94° 1 мин

41° 1 мин 1 цикл

72° 1 мин

Фаза 3 94° 1 мин

63° 1 мин 40 циклов

72° 1 мин

Плаزمида [ $P_{sup35}$ -SUP35MC(URA3)] (Werzyn et al., 2001) была гидролизована с помощью рестриктаз *Xho*I и *Vam*HI, что позволило заместить промотор SUP35 на последовательность, кодирующую промотор CUP1 (нуклеотидная последовательность промотора CUP1 представлена). Реакция лигирования проводилась по стандартному протоколу фирмы "Promega". Таким образом, была сконструирована плазмида [ $P_{cup1}$

SUP35MC(URA3)].

Аmplифицированная последовательность, кодирующая A $\beta$ -пептид, была проверена секвенированием (фирма «Хеликс») и, затем, с помощью лигирования, встроена в плазмиду [P<sub>cupl</sub>-SUP35MC(URA3)] по сайтам BamHI и Sad, расположенными вслед за CUP1-  
 5 промотором. Полученная нами центромерная плазида [P<sub>cupl</sub>-A $\beta$ -SUP35MC(URA3)] содержит последовательность гибридного гена A $\beta$ -SUP35MC под контролем индуцибельного CUP1-промотора, бактериальный и дрожжевой орижины репликации, ген устойчивости к ампицилину - AmpR и ген URE3.

Пример использования гибридного гена P<sub>cupl</sub>-A $\beta$ -SUP35MC

10 Поиск агентов, блокирующих агрегацию A $\beta$ -пептида, планируется проводить с использованием дрожжевой тест-системы, которая позволит вести масштабный скрининг белков, пептидов и химических агентов, блокирующих и (или) предотвращающих агрегацию A $\beta$ -пептида. Ключевым элементом такой тест-системы является заявляемый гибридный ген P<sub>cupl</sub>-A $\beta$ -SUP35MC. Данный гибридный ген экспрессируется в дрожжевом штамме и  
 15 кодирует гибридный белок A $\beta$ -Sup35MC. Последовательность, соответствующая M и C доменам дрожжевого белка Sup35, выполняет функцию фактора терминации трансляции. Аминокислотные последовательности A $\beta$ -пептида человека способны агрегировать друг с другом, что приводит к агрегации и частичной инактивации гибридного белка Ap-Sup35MC. Используемый дрожжевой штамм имеет делецию хромосомной копии гена SUP35 и  
 20 маркирован нонсенс-мутацией adel-14. Агрегация и инактивация A $\beta$ -Sup35MCp приводит к снижению точности терминации трансляции, что приводит к супрессии нонсенс-мутации adel-14 и детектируется по критерию «рост - отсутствие роста на селективной среде без аденина». Таким образом, использование гибридного гена P<sub>cupl</sub>-A $\beta$ -SUP35MC позволяет выявлять агрегацию A $\beta$ -пептида человека на фенотипическом уровне. Это дает  
 25 возможность быстро и дешево проводить первичный масштабный поиск белков, пептидов и химических соединений, блокирующих и предотвращающих болезнетворную агрегацию A $\beta$ -пептида. В частности, планируется провести полный скрининг кДНК библиотеки из мозга человека и выявить белки, контролирующие олигомеризацию A $\beta$ -пептида. Такие белки можно рассматривать в качестве потенциальных  
 30 терапевтических средств против болезни Альцгеймера.

Другие тест-системы

Заявителю неизвестны из патентной и научной литературы аналогичные тест-системы, позволяющие вести указанный выше масштабный скрининг агентов, блокирующих агрегацию A $\beta$ -пептида. Поиск факторов, контролирующих агрегацию A $\beta$ , проводится в  
 35 экспериментах на млекопитающих, в культуре клеток, или в системе in vitro.

В частности, получена трансгенная линия мышей, которые несут ген APP человека и предрасположены к развитию нейродегенеративного заболевания в результате отщепления A $\beta$ -пептида (8) - Sturchler-Pierrat Ch., Abramowski D., Duke M., Wiederhold K. et al. Two amyloid precursor protein transgenic mouse models with  
 40 Alzheimer disease-like pathology. // Proceeding of National Academy of Sciences of USA. 1997. Vol.94, P.13287-13292). Тестирование каждого потенциального лекарственного средства требует эксперимента с целой группой животных и длится не менее года.

Эксперименты с культурами клеток и в системе in vitro требуют использования биохимических методов (9) - Pike C.J., Walencewicz A.J., Glabe C.G., Cotman C.W. In vitro aging of beta-amyloid protein causes peptide aggregation and neurotoxicity. Brain Research. 1991 Nov 1; 563(1-2), P.311-314); (10) - Lorenzo A., Yankner B.A. Beta-amyloid neurotoxicity requires fibril formation and is inhibited by congo red. Proc Natl Acad Sci USA. 1994 Dec 6; 91(25), P.12243-12247). Совершенно очевидно, что  
 45 данные подходы не позволяют осуществлять масштабный скрининг агентов, блокирующих формирование амилоидов.  
 50

Анализ проводился при помощи стандартного метода дифференциального центрифугирования с последующей Вестерн-блот гибридизацией (Ma and Lindquist, 1999, Nature Cell Biol, 1(6): 358-361).

Тотальный белок был выделен из штамма *Saccharomyces cerevisiae*, содержащего гибридный ген P<sub>cup1</sub>-A $\beta$ -SUP35MC, и разделен с помощью ультрацентрифугирования в градиенте сахарозы на различные фракции. Верхняя (самая легкая) фракция содержит белок в мономерной изоформе. Во всех других фракциях (осадочных) белок может  
 5 выявляться только в том случае, если он формирует в клетках высокомолекулярные агрегаты за счет агрегации. После этого белок из всех полученных фракций денатурировали до мономерного состояния и наносили на полиакриламидный гель для проведения белкового электрофореза. Белки переносили с геля на нитроцеллюлозную мембрану и проводили Вестерн-блот гибридизацию с моноклональными антителами (4F  
 10 "Sigma") к A $\beta$ -пептиду. Во всех проанализированных фракциях выявляется специфичный сигнал гибридизации в районе 80-90 kDa, что соответствует размеру белка A $\beta$ -Sup35MC. На второй дорожке специфический сигнал соответствует мономерной фракции белка A $\beta$ -Sup35MC. Наличие специфического сигнала на 2-й, 3-й, 4-й и 5-й дорожках свидетельствует о наличии в клетках дрожжей агрегатов A $\beta$ -Sup35MC различного размера  
 15 (фиг.2).

Поскольку значительная доля белка выявляется в осадочных фракциях, можно утверждать, что белок A $\beta$ -Sup35MC агрегирует в дрожжевой клетке. Поскольку укороченный белок Sup35MC не способен к агрегации (Ter-Avanesyan et al., 1994, Genetics, 137:671-676), то можно утверждать, что агрегация обусловлена наличием в составе гибридного  
 20 белка последовательности A $\beta$ -пептида.

Список использованной литературы

1. Wisniewski T., Ghiso J., Frangione B. Biology of Ap amyloid in Alzheimer's disease. // Neurobiology of disease. 1997. 4: 313-328.
2. Citron M., Westaway D., Xia W., Carlson G. et al. Mutant presenilins of  
 25 Alzheimer' s disease increase production of 42-residue amyloid beta-protein in both transfected cells and transgenic mice. // Nat Med. 199 V3. P.67-72.
3. Suzuki N., Cheung T.T., Cai X.D., Odaka A. et al. An increased percentage of long amyloid beta protein secreted by familial amyloid beta protein precursor (beta APP717) mutants. // Science. 1994. 264. P.1336-1340.
- 30 4. Tamaoka A., Odaka A., Ishibashi Y., Usami M. et al. APP717 missense mutation affects the ratio of amyloid beta protein species (A beta 1-42/43 and a beta 1-40) in familial Alzheimer's disease brain. J Biol Chem. 1994. 269(52). P.32721-32724.
5. Price D.L., Sisodia S.S. Mutant genes in familial Alzheimer' s disease and transgenic models. Annu Rev Neurosci. 1998. V21. P.479-505.
- 35 6. Prusiner S.B. Shattuck lecture - neurodegenerative diseases and prions. // N Eng J Med. 2001. V.344. No.20. P.1516-1526].
7. Zhouravleva G., Frolova L., Le Goff X., Le Guellec R., Inge-Vechtomov S., Kisselev L., Philippe M. Termination of translation in eukaryotes is governed by two interacting polypeptide chain release factors, eRF1 and eRF3. // EMBO J. 1995. 14:4065-4072.
- 40 8. Sturchler-Pierrat Ch., Abramowski D., Duke M., Wiederhold K. et al. Iwo amyloid precursor protein transgenic mouse models with Alzheimer disease-like pathology. // Proceeding of National Academy of Sciences of USA. 1997. Vol.94, P.13287-13292.
9. Pike C.J., Walencewicz A.J., Glabe C.G., Cotman CW. In vitro aging of beta-amyloid protein causes peptide aggregation and neurotoxicity. Brain Research. 1991  
 45 Nov 1; 563(1-2), P.311-314.
10. Lorenzo A., Yankner B.A. Beta-amyloid neurotoxicity requires fibril formation and is inhibited by congo red. Proc Nati Acad Sci USA. 1994 Dec 6; 91(25), P.12243-12247.

#### Формула изобретения

50 Гибридный ген P<sub>cup1</sub>-A $\beta$ -SUP35MC для анализа факторов, регулирующих продукцию, агрегацию и дисагрегацию пептида амилоид  $\beta$  (A $\beta$ ) человека в дрожжевой системе, состоящий из фрагмента XhoI-VamHI размером 477 пар оснований, представляющего собой последовательность CUP1-промотора, VamHI-VamHI фрагмента размером 135 пар

оснований, представляющего собой последовательность, кодирующую полноразмерный амилоидный пептид бета ( $A\beta$ -пептид) человека, размером 40 аминокислот (см. нуклеотидную последовательность, представленную в перечне последовательностей под цифрой «2»), фланкированную ТАТА-боксом и старт-кодоном (ATG) с 5'-конца, BamHI-SacI  
5 фрагмента размером 1879 пар оснований, представляющего собой последовательность, кодирующую М и С домены белка Sup35 дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, фланкированную сайтом рестрикции BamHI с 5', а также последовательностью, терминирующей трансляцию и сайтом Sad с 3'-конца.

10

15

20

25

30

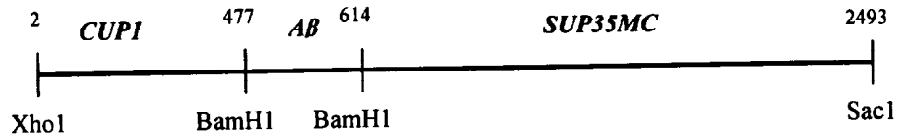
35

40

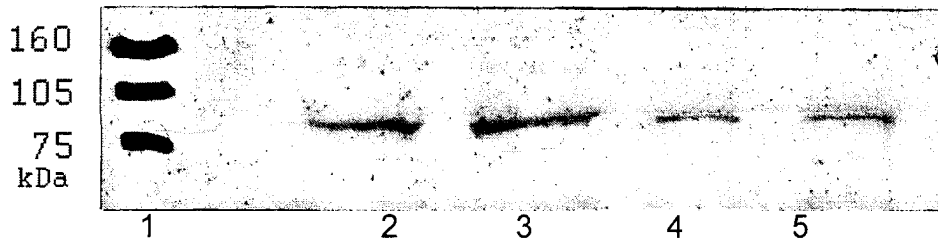
45

50





Фиг. 1



1- маркер молекулярных весов; 2 – белок из верхней фракции, соответствующий растворимой мономерной изоформе  $A_{\beta}$ -Sup35MC; 2-5 - осадочные фракции, в которых белок  $A_{\beta}$ -Sup35MC представлен в виде высокомолекулярных агрегатов.

Фиг. 2