

*На правах рукописи*

Нижников Антон Александрович

**ХАРАКТЕРИСТИКА НОВОГО НЕХРОМОСОМНОГО ДЕТЕРМИНАНТА  
[NSI<sup>+</sup>] ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE***

специальность: 03.02.07. – генетика

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург  
2013

Работа выполнена в Санкт-Петербургском Государственном Университете на кафедре генетики и биотехнологии.

Научный руководитель: кандидат биологических наук  
Галкин Алексей Петрович  
Кафедра генетики и биотехнологии Санкт-Петербургского  
Государственного Университета, Санкт-Петербург

Официальные оппоненты: член-корреспондент РАН,  
доктор биологических наук  
Тер-Аванесян Михаил Давидович  
Институт биохимии им. А.Н. Баха Российской академии наук, Москва

доктор биологических наук  
Сойдла Тыну Рихович  
Институт Цитологии РАН, Санкт-Петербург

Ведущее учреждение: Федеральное государственное бюджетное  
учреждение Петербургский институт ядерной  
физики им. Б.П. Константинова, Санкт-Петербург.

Защита диссертации состоится “ \_\_\_\_\_ 2013 г. в \_\_\_\_\_ часов на заседании совета Д.212.232.12 по защите докторских и кандидатских диссертаций при Санкт-Петербургском Государственном университете по адресу: 199034 Санкт-Петербург, Университетская наб. 7/9, СПбГУ, биолого-почвенный факультет, кафедра генетики и биотехнологии, аудитория \_\_\_\_\_.

С диссертацией можно ознакомиться в центральной научной библиотеке им. М. Горького Санкт-Петербургского Государственного университета.

Автореферат разослан “ \_\_\_\_\_ 2013 г.

Ученый секретарь  
Диссертационного совета Д.212.232.12  
доктор биологических наук

Л.А. Мамон

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** Прионами называют белки, способные в одинаковых физиологических условиях существовать в двух или более конформациях, из которых как минимум одна обладает инфекционными свойствами. Прионизация связана с формированием упорядоченных белковых полимеров (амилоидов), образующихся за счёт образования межмолекулярных бета-структур. Помимо инфекционных амилоидов (прионов), выявлен целый ряд неинфекционных амилоидов, вызывающих летальные заболевания человека. Первый из открытых прионов, PrP<sup>Sc</sup>, является летальным патогеном человека и животных [Prusiner, 1982]. Наибольшее количество прионов идентифицировано у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. У этого организма известно как минимум восемь прионов: [PSI<sup>+</sup>], [URE3], [PIN<sup>+</sup>], [SWI<sup>+</sup>], [OCT<sup>+</sup>], [MOT3<sup>+</sup>], [ISP<sup>+</sup>] и [MOD<sup>+</sup>] [Wickner, 1994; Derkatch et al. 1997; Du et al. 2008; Patel et al. 2009; Alberti et al. 2009; Rogoza et al. 2010; Suzuki et al. 2012]. Открытие дрожжевых прионов изменило восприятие нуклеиновых кислот в качестве единственного носителя наследственной информации, что обуславливает фундаментальную значимость их исследования. Исторически одним из первых прионов дрожжей был выявлен [PSI<sup>+</sup>] – прионная изоформа белка Sup35 [Chernoff et al. 1993; Ter-Avanesyan et al. 1994; Wickner, 1994; Cox, 1965], выполняющего функцию фактора терминации трансляции [Zhouravleva et al. 1995; Frolova et al. 1994; Stanfield et al. 1995]. Прионизация Sup35 вызывает снижение эффективности терминации трансляции и нонсенс-супрессию – процесс считывания стоп-кодонов как значащих. В лаборатории физиологической генетики кафедры генетики и биотехнологии СПбГУ был выявлен новый нехромосомный детерминант [NSI<sup>+</sup>], также как и [PSI<sup>+</sup>] вызывающий нонсенс-супрессию, но не являющийся прионной изоформой Sup35p. Характеристике этого детерминанта, а также комплекса генов и факторов, влияющих на его проявление, и посвящена эта диссертация. Исследование прионов дрожжей актуально не только с фундаментальной, но и прикладной точки зрения, поскольку *S. cerevisiae* являются удобным объектом для исследования молекулярных механизмов прионизации.

**Степень разработанности проблемы.** К настоящему времени описан ряд прионов дрожжей, разработаны теоретические модели прионизации, получены данные, демонстрирующие различия между прионами и неинфекционными амилоидами. Несмотря на крайне активное исследование прионов дрожжей *S. cerevisiae*, вполне очевидно, что выявленные к настоящему времени прионы составляют лишь малую часть от их общего числа, поскольку просто не существует подходов для идентификации прионов в масштабах всего протеома. Таким образом, характеристика новых прионов, а также поиск генов и факторов, влияющих на их проявление, имеет большое фундаментальное значение.

**Цель и задачи исследования.** Цель работы – характеристика нового нехромосомного детерминанта [NSI<sup>+</sup>] дрожжей *S. cerevisiae* и выявление генов, влияющих на его проявление.

В соответствии с поставленной целью были сформулированы следующие задачи:

1. Выявить этапы матричных процессов, в регуляции которых участвует нехромосомный детерминант [NSI<sup>+</sup>].
2. Охарактеризовать проявления [NSI<sup>+</sup>], не связанные с нонсенс-супрессией.
3. Проанализировать прионные свойства детерминанта [NSI<sup>+</sup>].
4. Выявить гены, изменение уровня экспрессии которых влияет на проявление детерминанта [NSI<sup>+</sup>].
5. Выявить гены, эффекты сверхэкспрессии которых сходны с проявлением [NSI<sup>+</sup>].

**Научная новизна диссертационной работы.** В рамках работы впервые охарактеризованы прионные свойства нового нехромосомного детерминанта [*NSI*<sup>+</sup>] дрожжей *S. cerevisiae*. Показано влияние [*NSI*<sup>+</sup>] на эффективность терминации трансляции и вегетативный рост, а также участие этого детерминанта в регуляции количества мРНК некоторых генов. Выявлен ряд новых супрессоров нонсенс-мутаций: *ABF1*, *GLN3*, *FKH2*, *MCM1*, *MOT3*, *REB1* и *VTS1*. Впервые показано влияние приона [*PIN*<sup>+</sup>] на нонсенс-супрессию.

**Теоретическая и практическая значимость.** Полученные результаты обладают существенной фундаментальной значимостью, внося большой вклад в знание о генетических и эпигенетических регуляторах терминации трансляции у дрожжей. Также результаты работы могут иметь потенциальную прикладную значимость, так как целый ряд исследований последних лет показывают, что значительное количество наследственных заболеваний человека ассоциированы с преждевременными стоп-кодонами. Дрожжи *S. cerevisiae* являются одним из наиболее перспективных модельных объектов. Учитывая, что компоненты трансляционного аппарата обладают высокой эволюционной консервативностью у эукариот, выявление дрожжевых генов, влияющих на эффективность трансляции, может быть полезно для разработки подходов к терапии подобных болезней.

Результаты работы могут быть использованы при подготовке материалов лекций по курсам «Молекулярная генетика», «Частная генетика дрожжей», «Генетический контроль трансляции» и «Прионы», преподаваемым на кафедре генетики и биотехнологии СПбГУ, а также аналогичных курсов в других университетах России.

**Положения, выносимые на защиту.** Детерминант [*NSI*<sup>+</sup>] обладает свойствами дрожжевого приона и имеет плеiotропное фенотипическое проявление. Нонсенс-супрессия в штаммах [*NSI*<sup>+</sup>] связана с дефектами терминации трансляции и генами, кодирующими факторы терминации трансляции – *SUP35* и *SUP45*. Детерминант [*NSI*<sup>+</sup>] участвует в регуляции количества мРНК генов *SUP45* и *VTS1*. Прион [*PIN*<sup>+</sup>] усиливает нонсенс-супрессию в штаммах [*NSI*<sup>+</sup>]. Сверхэкспрессия гена *VTS1* влияет на эффективность терминации трансляции. Гены *ABF1*, *GLN3*, *FKH2*, *MCM1*, *MOT3* и *REB1* являются многокопийными нонсенс-супрессорами у *S. cerevisiae*.

**Степень достоверности и апробация результатов.** Результаты работы имеют высокую степень достоверности, подтвержденную публикацией в 4 статьях в журналах, рекомендованных ВАК, и 11 тезисных сообщениях. Материалы диссертации были представлены на IV конференции европейского общества молекулярных биологов “The 4<sup>th</sup> EMBO meeting” (Ницца, Франция, 2012), XXV международной конференции по дрожжевой генетике и молекулярной биологии “XXV YGMB” (Ольштын, Польша, 2011), Пятом съезде Вавиловского общества генетиков и селекционеров (Москва, Россия, 2009), XVII Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» (Москва, Россия, 2010), 14-16 международных конференциях «Биология – наука XXI века» (Пушино, Россия, 2010, 2011, 2012 и 2013), а также на научных семинарах лаборатории физиологической генетики кафедры генетики и биотехнологии СПбГУ.

**Объем и структура диссертации.** Работа изложена на 155 страницах и состоит из Введения, глав «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты», «Обсуждение» и «Выводы». Работа содержит 10 таблиц, 18 рисунков, список литературы из 301 наименования.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Штаммы *S. cerevisiae* и *E. coli*.** В работе использован штамм *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  следующего генотипа: *supE44 ΔlacU169 (φ80lacZΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1* [Hanahan, 1985]. Генотипы основных штаммов *S. cerevisiae* перечислены в Таблице 1.

**Таблица 1 – Основные штаммы *S. cerevisiae*, использованные в работе**

Штамм	Генотип	Источник
1-1-Д931	[ <i>NSI</i> <sup>+</sup> ] дериват штамма 1-Д931	Цапонина и др. 2005
1-1-1-Д931	[ <i>nsi</i> <sup>-</sup> ][ <i>pin</i> <sup>-</sup> ] дериват штамма 1-1-Д931	Saifitdinova et al. 2010
4-1-1-Д931	Дериват штамма 1-1-Д931, несущий плазмиду pL- $\Delta\beta$ -Sup35MC вместо плазмиды pU- $\Delta\beta$ -Sup35MC	Saifitdinova et al. 2010
1-4-1-1-Д931	[ <i>nsi</i> <sup>-</sup> ][ <i>pin</i> <sup>-</sup> ] дериват штамма 4-1-1-Д931	Saifitdinova et al. 2010
1-Д933	<i>MAT<math>\alpha</math> sup35<math>\Delta</math>::HIS3 ade1-14 his3 leu2 lys2 ura3 trp1-289</i> [pU- $\Delta\beta$ -Sup35MC] [ <i>nsi</i> <sup>-</sup> ][ <i>PIN</i> <sup>+</sup> ]	Saifitdinova et al. 2010
2-2-1-1-Д931	<i>MAT<math>\alpha</math> sup35<math>\Delta</math>::HIS3 ade1-14 his3 leu2 lys2 ura3 trp1-289</i> [pRS316-SUP35MC] [ <i>NSI</i> <sup>+</sup> ][ <i>PIN</i> <sup>+</sup> ]	Получен в данной работе
2-4-1-1-Д931	[ <i>nsi</i> <sup>-</sup> ][ <i>PIN</i> <sup>+</sup> ] дериват штамма 1-4-1-1-Д931	Получен в данной работе
5-1-4-1-1-Д931	[ <i>NSI</i> <sup>+</sup> ][ <i>pin</i> <sup>-</sup> ] дериват штамма 1-4-1-1-Д931	Получен в данной работе
1-2-2-1-1-Д931	<i>MAT<math>\alpha</math> sup35<math>\Delta</math>::HIS3 ade1-14 his3 leu2 lys2 ura3 trp1-289</i> [ <i>NSI</i> <sup>+</sup> ][ <i>PIN</i> <sup>+</sup> ] [pASB-2]	Получен в данной работе
2-1-1-Д931	<i>MAT<math>\alpha</math> sup35<math>\Delta</math>::HIS3 ade1-14 his3 leu2 lys2 ura3 trp1-289</i> [ <i>NSI</i> <sup>+</sup> ][ <i>PIN</i> <sup>+</sup> ] [pRS315-SUP35MC]	Получен в данной работе
1-2-1-1-Д931	<i>MAT<math>\alpha</math> sup35<math>\Delta</math>::HIS3 ade1-14 his3 leu2 lys2 ura3 trp1-289</i> [ <i>psi</i> <sup>-</sup> ][ <i>pin</i> <sup>-</sup> ] [pRS315-SUP35MC]	Получен в данной работе
Д935	<i>MAT<math>\alpha</math>/MAT<math>\alpha</math> sup35<math>\Delta</math>::SUP35P LEU2/sup35<math>\Delta</math>::SUP35P LEU2 his3/his3 ade1-14/ade1-14 trp1/trp1 LYS2/lys2 ura3/ura3-52 leu2/leu2-3,112</i> [ <i>NSI</i> <sup>+</sup> ][ <i>PIN</i> <sup>+</sup> ]	Получен в данной работе
1-4-2-1-1-Д931	<i>MAT<math>\alpha</math> sup35<math>\Delta</math>::HIS3 ade1-14 his3 leu2 lys2 ura3 trp1-289</i> [ <i>NSI</i> <sup>+</sup> ][ <i>PIN</i> <sup>+</sup> ] [pNR- $\Delta$ ABF1]	Получен в данной работе
1-5-2-1-1-Д931	<i>MAT<math>\alpha</math> sup35<math>\Delta</math>::HIS3 ade1-14 his3 leu2 lys2 ura3 trp1-289</i> [ <i>nsi</i> <sup>-</sup> ][ <i>pin</i> <sup>-</sup> ] [pNR- $\Delta$ ABF1]	Получен в данной работе
18-3-2-1-1-Д931	<i>MAT<math>\alpha</math> sup35<math>\Delta</math>::HIS3 ade1-14 his3 leu2 lys2 ura3 trp1-289</i> [ <i>nsi</i> <sup>-</sup> ][ <i>pin</i> <sup>-</sup> ] [pASB-2]	Получен в данной работе
6-2-1-1-Д931	<i>MAT<math>\alpha</math> sup35<math>\Delta</math>::HIS3 ade1-14 his3 leu2 lys2 ura3 trp1-289</i> <i>vti1<math>\Delta</math>::LEU2</i> [ <i>NSI</i> <sup>+</sup> ][ <i>PIN</i> <sup>+</sup> ] [pRS315-SUP35MC]	Получен в данной работе
1-1-2-1-1-Д931	<i>MAT<math>\alpha</math> sup35<math>\Delta</math>::HIS3<sup>*</sup> ade1-14<sup>*</sup> his3 leu2 lys2 ura3 trp1-289<sup>*</sup></i> [pASB-2]	Получен в данной работе
1-2-1-1-Д931	<i>MAT<math>\alpha</math> sup35<math>\Delta</math>::HIS3 ade1-14 his3 leu2 lys2 ura3 trp1-289</i> [pRS315-SUP35MC]	Получен в данной работе
12-Д953	<i>MAT<math>\alpha</math> sup35<math>\Delta</math>::HIS3 ade1-14 his3 leu2 lys2 ura3 rnrq1<math>\Delta</math>::KanMX</i> [pU- $\Delta\beta$ -Sup35MC] [ <i>NSI</i> <sup>+</sup> ][ <i>PIN</i> <sup>+</sup> ]	Получен в данной работе

**Примечание.** Генотипы штаммов дрожжей охарактеризованы в соответствии со стандартной трехбуквенной номенклатурой [Захаров и др. 1984; Sherman et al. 1986]. Аллель *ade1-14* содержит нонсенс-мутацию UGA; *trp1-289* – нонсенс-мутацию UAG; *ura3-52* – инсерцию дрожжевого мобильного элемента *Ty1* в кодирующую часть гена *URA3*; *leu2-3,112* – двойные мутации в гене *LEU2*.

**Плазмиды.** Основные плазмиды, использованные в ходе настоящего исследования, перечислены в Таблице 2. Также в работе получены плазмиды серии рU-CUP1 (рU-CUP1-DEF1, рU-CUP1-NAB2, рU-CUP1-NAB3, рU-CUP1-NRP1 и рU-CUP1-PIN3) предназначенные для сверхэкспрессии генов *DEF1*, *NAB2*, *NAB3*, *NRP1* и *PIN3* под контролем сильного индуцибельного промотора *CUP1*. Для сверхэкспрессии генов *ABF1*, *INO4*, *REB1*, *SFP1*, *FKH2*, *MCM1*, *MOT3*, *CYC8*, *GAL11*, *GLN3* и *PGD1* была использована серия из 11 многокопийных плазмид рU-CUP1, маркированных *URA3* и несущих соответствующие гены под контролем сильного индуцибельного промотора *CUP1* [Нижников и др. 2013].

**Таблица 2 – Основные плазмиды, использованные в работе**

Название	Тип/маркер	Промотор	Белок	Автор
pFL36	<i>CEN/LEU2</i>			Bonneaud et al. 1991
pRS315	<i>CEN/LEU2</i>			Sikorski and Hieter, 1989
pRS316	<i>CEN/URA3</i>			Sikorski and Hieter, 1989
pRS315-SUP35MC	<i>CEN/LEU2</i>	$P_{SUP35}$	Sup35MC	Любезно предоставлена проф. Ю.О. Черновым
pmCUPNMsGFP	$2\mu$ / <i>URA3</i>	$P_{CUP1}$	Sup35NM-GFP	Serio et al. 1999
pRS316-SUP35MC	<i>CEN/URA3</i>	$P_{SUP35}$	Sup35MC	Любезно предоставлена проф. Ю.О. Черновым
pYCH-U2	<i>CEN/URA3</i>	$P_{SUP35}$	Sup35	Derkatch et al. 1997
pASB-2	<i>CEN/LEU2</i>	$P_{SUP35}$	Sup35	Любезно предоставлена А.С. Борхсениусом
$P_{CUP1}$ -GFP( <i>URA3</i> )	$2\mu$ / <i>URA3</i>	$P_{CUP1}$	GFP	Рубель и др. 2008
pL-A $\beta$ -Sup35MC	$2\mu$ / <i>LEU2</i>	$P_{CUP1}$	A $\beta$ -Sup35MC	Saifitdinova et al. 2010
pU-A $\beta$ -Sup35MC	$2\mu$ / <i>URA3</i>	$P_{CUP1}$	A $\beta$ -Sup35MC	Цапоница и др. 2005
pNR- $\Delta$ ABF1	<i>CEN/LEU2</i>	$P_{SUP35\Delta abf1}$	Sup35	Любезно предоставлена Н.А. Рябинковой
pFL36-SUP45	<i>CEN/LEU2</i>	$P_{SUP45}$	Sup45	Получена в данной работе
pU-VTS1-GFP	$2\mu$ / <i>URA3</i>	$P_{CUP1}$	Vts1-GFP	Получена в данной работе
pT-VTS1	$2\mu$ / <i>TRP1</i>	$P_{CUP1}$	Vts1	Получена в данной работе
$P_{CUP1}$ -GFP( <i>TRP1</i> )	$2\mu$ / <i>TRP1</i>	$P_{CUP1}$	GFP	Рубель и др. 2008
$P_{CUP1}$ -GFP( <i>TRP1</i> )	$2\mu$ / <i>TRP1</i>	$P_{CUP1}$	GFP	Рубель и др. 2008
pU-CUP1-VTS1	$2\mu$ / <i>URA3</i>	$P_{CUP1}$	Vts1	Получена в данной работе
pLAN-VTS1-VTS1	<i>CEN/LEU2</i>	$P_{VTS1}$	Vts1	Получена в данной работе

**Примечание.** *CEN* – центромерная плазида,  $2\mu$ - многокопийная плазида. Все плазмиды в таблице содержат ген устойчивости к ампициллину для селекции в *E. coli*.

**Генетические методы.** В работе применяли стандартные методы дрожжевой генетики: методы селективных сред, отпечатков, посева истощающим штрихом, случайной выборки аскоспор и тетрадного анализа [Инге-Вечтомов, 1971, Захаров и др. 1984; Rose et al. 1990]. Детерминант [*NSI*<sup>+</sup>] элиминировали трехкратным пассированием на твердой среде YAPD с добавлением 5 мМ хлорида гуанидина (ГТХ) “QIAGEN”(США). Потерю плазмид, содержащих маркер *URA3*, производили на селективной среде с добавлением 5-FOA [Kaiser et al. 1994]. Для оценки нонсенс-супрессии соответствующие штаммы методом отпечатков переносили на селективную среду без аденина или триптофана и анализировали рост на пятые сутки инкубации

в термостате [Chernoff et al. 2002]. Тип спаривания исследуемых штаммов определяли путем скрещивания с тестерными штаммами 2Г-П2345 (*MAT $\alpha$  his5*) и 78А-П2345 (*MAT $\alpha$  his5*) (Таблица 1).

**Молекулярно-биологические методы.** Трансформацию дрожжей проводили по стандартной методике [Rose et al. 1990] с добавлением 7 мкг ДНК-носителя для повышения эффективности. Трансформацию бактерий также осуществляли по стандартной методике [Inoue et al. 1990]. Выделение плазмидной ДНК из *E. coli* осуществляли при помощи метода щелочного лизиса [Sambrook et al. 1989]. Геномную ДНК из дрожжей выделяли по стандартному методу, с рядом модификаций [Kaiser et al. 1994]. Использовали стандартные генно-инженерные методы [Маниатис и др. 1984]. Выделение тотальной РНК проводили с использованием реагента “Trizol” (“Invitrogene”) согласно протоколу производителя. Реакцию обратной транскрипции проводили с использованием набора Super Script III (“Invitrogene”) согласно протоколу производителя. Полимеразную цепную реакцию в реальном времени (ПЦРРВ) проводили в амплификаторе АНК-16 (ИАНП РАН). Для каждого эксперимента выделяли не менее пяти независимых проб тотальной мРНК. Анализ проводили при помощи метода  $2^{-\Delta\Delta CT}$  [Livak and Schmittgen, 2001].

Выделение белка проводили по стандартным методикам [Newnam et al. 1999] или [Chernoff et al. 2002]. Белки разделяли при помощи SDS-гель-электрофореза в 10% полиакриламидном геле и переносили на PVDF-мембрану (“Amersham Biosciences”, США). Выравнивание тотального белка проводили при помощи метода Бредфорд [Bradford, 1976], а также с помощью окрашивания геля кумасси R250. Для иммунодетекции использовали поликлональные антитела кролика против белка Sup35 [Chabelskaya et al. 2004] и моноклональные антитела кролика против белка Sup45 [Kiktev et al. 2009], а также моноклональные антитела мыши 3А9 против GFP (Институт биоорганической химии РАН, РФ). Сравнение интенсивностей сигналов анализируемых белков проводили с помощью денситометрического анализа в программном обеспечении ImageJ 1.37a.

Количественный анализ эффективности терминации трансляции проводили при помощи метода бицистронной люминесценции [по: Valouev et al. 2009] с использованием плазмид pDB691 (UGAC), pDB690 (CGAC), pDB720 (UAGC) и pDB721 (CAGC) [Keeling et al. 2006; Kallmeyer et al. 2006], любезно предоставленных М.Д. Тер-Аванесяном.

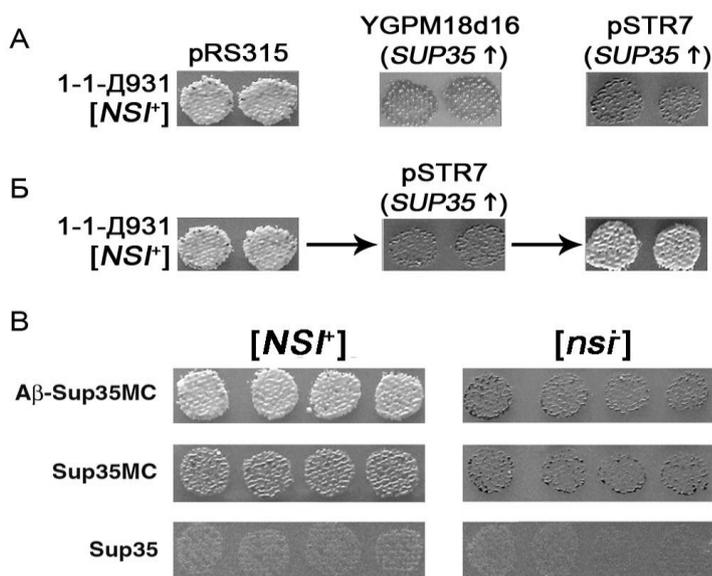
**Флуоресцентная микроскопия.** Флуоресцентный анализ агрегации белка Sup35NM-GFP проводили при помощи микроскопа Leica DM6000B (“Leica Microsystems GmbH”, Германия) с программным обеспечением “Leica QWin Standart” версии 3.2.0. Для анализа флуоресценции использовали комплект “GFP” (“Leica Microsystems GmbH”) с запирающим фильтром 515 нм и возбуждающим фильтром 480 нм.

**Статистический анализ.** Вычисления стандартного отклонения, ошибки среднего, а также сравнение выборок при помощи непараметрического критерия Манна-Уитни проводили при помощи пакета программного обеспечения “STATISTICA” версии 6.0. (“StatSoft Inc.”, США).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**Анализ особенностей фенотипического проявления [*NSI*<sup>+</sup>].** Детерминант [*NSI*<sup>+</sup>] был выявлен как омнипотентный супрессор, имеющий фенотипическое проявление на фоне делеции хромосомной копии гена *SUP35* и продукции гибридного белка А $\beta$ -Sup35МС под контролем промотора *CUP1* [Цапони́на и др. 2005; Saifitdinova et al. 2010]. Мы провели детальный анализ особенностей нонсенс-супрессии, опосредованной [*NSI*<sup>+</sup>]. Увеличение экспрессии *SUP35* в штамме 1-1-Д931 [*NSI*<sup>+</sup>] за счет введения

многокопийных плазмид pSTR7 или YGPM18d16 приводит к маскировке нонсенс-супрессии (Рисунок 1.А), но не элиминирует  $[NSI^+]$  (Рисунок 1.Б). Замена в штамме 4-1-1-Д931  $[NSI^+]$  плазмиды pL-Аβ-Sup35MC, на фоне которой  $[NSI^+]$  вызывает нонсенс-супрессию, на центромерную плазмиду pYCH-U2, продуцирующую полноразмерный Sup35, также приводит к маскировке  $[NSI^+]$  (Рисунок 1.В). Замена плазмиды pU-Аβ-Sup35MC на центромерную плазмиду pRS315-SUP35MC, продуцирующую Sup35MC, не вызывает элиминацию нонсенс-супрессии в штамме 1-1-Д931  $[NSI^+]$  (Рисунок 1.В). На основании этих данных можно было предположить, что нонсенс-супрессия в штаммах  $[NSI^+]$  возникает либо в отсутствие N-терминального домена Sup35, либо же используемые нами N-модифицированные варианты Sup35 сами вызывают криптическую супрессию, необходимую для проявления  $[NSI^+]$ .



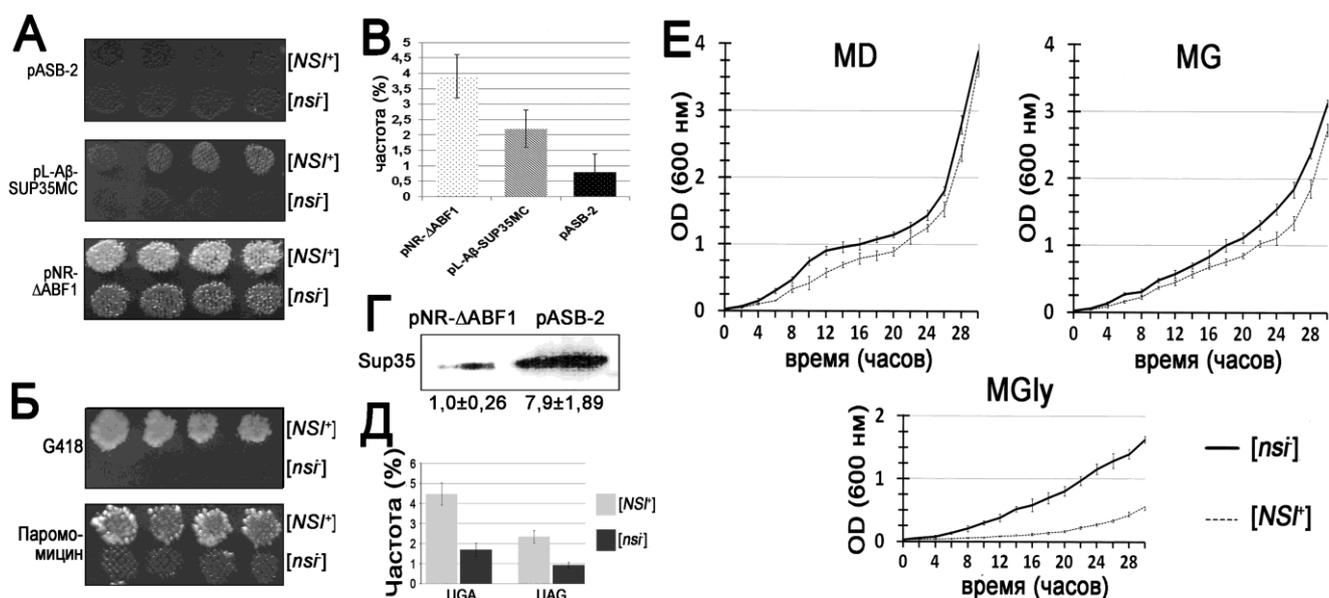
**Рисунок 1 – Влияние N-терминального домена Sup35 на нонсенс-супрессию в штаммах  $[NSI^+]$ .** А. Многокопийная экспрессия полноразмерного Sup35 подавляет нонсенс-супрессию в штамме 1-1-Д931  $[NSI^+]$ . Б. Временное увеличение уровня экспрессии Sup35 не вызывает элиминации  $[NSI^+]$ . В. Детерминант  $[NSI^+]$  вызывает нонсенс-супрессию на фоне N-замещенных вариантов Sup35. Фотографии получены на селективных средах без добавления аденина.

Для проверки этих предположений мы воспользовались плазмидой pNR-ΔABF1, любезно предоставленной Н.А. Рябинковой. Эта центромерная плаزمида несет полноразмерный ген *SUP35*, под контролем собственного промотора с делецией сайта связывания транскрипционного фактора Abf1p, за счет чего уровень экспрессии *SUP35* снижен приблизительно в семь раз (Рисунок 2.Г). Мы решили проверить, влияет ли снижение уровня экспрессии *SUP35* на нонсенс-супрессию, в штаммах  $[NSI^+]$  и  $[nsi^-]$ .

Для анализа влияния  $[NSI^+]$  на нонсенс-супрессию при снижении количества Sup35p использовали штаммы 1-4-2-1-1-Д931 и 1-5-2-1-1-Д931,  $[NSI^+]$  и  $[nsi^-]$ , соответственно, несущие делецию хромосомной копии *SUP35* и плазмиду pNR-ΔABF1. Анализ роста этих штаммов на селективной среде без аденина показал, что эффективность нонсенс-супрессии в штамме 1-4-2-1-1-Д931 существенно выше, чем в штамме 1-5-2-1-1-Д931 (Рисунок 2.А). Таким образом,  $[NSI^+]$  может вызывать нонсенс-супрессию и на фоне полноразмерного *SUP35* в случае снижения уровня экспрессии этого гена.

Мы провели количественный анализ эффективности терминации трансляции в изогенных штаммах  $[nsi^-]$ , экспрессирующих на плаزمиде три различных варианта *SUP35*: полноразмерный дикого типа (штамм 18-3-2-1-1-Д931, плазмиды pASB-2), полноразмерный с делецией сайта связывания Abf1p в промоторе (1-5-2-1-1-Д931, pNR-ΔABF1) и химерный белок Аβ-Sup35MC (1-4-1-1-Д931, pL-Аβ-SUP35MC). Данные штаммы были трансформированы плазмидами pDB691 (опыт) или pDB691 (контроль). Эти плазмиды несут гены, кодирующие два

различных фермента-люциферазы, позволяющие проводить оценку частоты прочтения стоп-кодона UGA как значащего методом бицистронной люминесценции. Полученные результаты представлены на Рисунке 2.В. Наибольшее снижение эффективности терминации трансляции происходит в штамме с делецией сайта связывания транскрипционного фактора Abf1, частота считывания стоп-кодона UGA в котором составляет  $3,9 \pm 0,71\%$ . Меньшая частота считывания ( $2,2 \pm 0,61$ ) наблюдается в штамме, содержащем гибридный ген *Ab-SUP35MC*. Тем не менее, это значение достоверно выше частоты считывания UGA в контрольном штамме 18-3-2-1-1-Д931, содержащем интактный ген *SUP35*. Таким образом, анализируемые плазмиды по эффективности компенсации функции eRF3 на фоне делеции *SUP35* располагаются следующим образом: pASB-2>pL-Ab-SUP35MC>pNR-ΔABF1. Результаты бицистронной люминесценции полностью соответствуют генетическим: детерминант [*NSI*<sup>+</sup>] не вызывает нонсенс-супрессии на фоне pASB-2 и вызывает сильную супрессию на фоне pL-Ab-SUP35MC и pNR-ΔABF1 (Рисунок 2.А). Отметим, что pNR-ΔABF1 обеспечивает достаточно высокий базовый уровень нонсенс-супрессии, детектируемый даже в [*nsi*<sup>-</sup>] штаммах (Рисунок 2.А). Таким образом, отсутствие N-терминального домена Sup35 не является критическим для нонсенс-супрессии в штаммах [*NSI*<sup>+</sup>]. Последняя возникает не при удалении данного фрагмента белка Sup35, а при снижении его функциональной активности в качестве фактора терминации трансляции, которое может быть вызвано, например, (как в случае pNR-ΔABF1) снижением уровня продукции этого белка.



**Рисунок 2 – Особенности фенотипического проявления [*NSI*<sup>+</sup>].** **А.** Рост штаммов [*NSI*<sup>+</sup>] и [*nsi*<sup>-</sup>], экспрессирующих полноразмерный *SUP35* (pASB-2), химерный ген *Ab-SUP35MC* (pL-Ab-SUP35MC) и полноразмерный *SUP35*, несущий в промоторе делецию сайта связывания Abf1p (pNR-ΔABF1) на селективной среде без аденина. **Б.** Рост штаммов [*NSI*<sup>+</sup>] и [*nsi*<sup>-</sup>], продуцирующих полноразмерный Sup35, на селективных средах без аденина с добавлением 50 мкг/мл G418 или с добавлением 100 мкг/мл паромомицина. **В.** Сравнительный анализ частот считывания стоп-кодонов UGA и UAG как значащих в штаммах [*NSI*<sup>+</sup>] и [*nsi*<sup>-</sup>]. **Г.** Сравнение относительных количеств белка Sup35 в штаммах [*nsi*<sup>-</sup>], несущих плазмиды pASB-2 и pNR-ΔABF1. Значения представлены со стандартными отклонениями (далее обозначены как CO). **Д.** Сравнительный анализ частот считывания стоп-кодона UGA как значащего в штаммах [*nsi*<sup>-</sup>], несущих плазмиды pNR-ΔABF1, pL-Ab-SUP35MC и pASB-2 при помощи метода бицистронной люминесценции. Результаты представлены со стандартными отклонениями. **Е.** Кривые роста штаммов 2-1-1-Д931 [*NSI*<sup>+</sup>] и 1-2-1-1-Д931 [*nsi*<sup>-</sup>] на средах MD, MG и MGly. Показаны стандартные ошибки [по: Nizhnikov et al. 2012].

Мы проанализировали влияние антибиотиков паромомицина и генетицина, снижающих эффективность трансляции, на нонсенс-супрессию в штаммах  $[NSI^+]$  1-1-2-1-1-Д931 и  $[nsi^-]$  18-3-2-1-1-Д931, содержащих полноразмерный ген *SUP35*. Без добавления антибиотиков эти штаммы не отличаются по росту на селективной среде без аденина (Рисунок 2.А). Добавление в среду паромомицина в концентрации 100 мкМ и 50 мкМ генетицина приводит к сильной нонсенс-супрессии исключительно в штамме  $[NSI^+]$  (Рисунок 2.Б). В штамме  $[nsi^-]$  данные концентрации антибиотиков супрессорных эффектов не вызывают (Рисунок 2.Б). То, что нонсенс-супрессия в штаммах  $[NSI^+]$  опосредована фактором терминации трансляции eRF3 (Sup35), а также возникает на фоне общих дефектов трансляции, навело нас на предположение, что  $[NSI^+]$  может непосредственно влиять на эффективность терминации трансляции. Для проверки этой гипотезы мы использовали метод бицистронной люминесценции. Изогенные штаммы  $[NSI^+]$  и  $[nsi^-]$  были трансформированы плазмидами pDB691 или pDB721 в опыте, а также pDB690 или pDB720 и использованы для проведения эксперимента. Полученные данные показали (Рисунок 2.Д), что  $[NSI^+]$  вызывает статистически достоверное увеличение частот прочтения стоп-кодонов UGA и UAG как значащих. Таким образом, детерминант  $[NSI^+]$  вызывает снижение эффективности терминации трансляции, и этот эффект может проявляться в виде omnipotentной нонсенс-супрессии при снижении эффективности работы Sup35 как фактора терминации трансляции или на фоне общих нарушений трансляции.

Дефекты терминации трансляции, которые вызывает  $[NSI^+]$ , могут оказывать общее неблагоприятное воздействие на клетку. В связи с этим мы проанализировали влияние  $[NSI^+]$  на вегетативный рост дрожжей. Для анализа этого эффекта мы проанализировали динамику роста штаммов 2-1-1-Д931  $[NSI^+]$  и 1-2-1-1-Д931  $[nsi^-]$  (Рисунок 2.Е). В результате было установлено, что  $[NSI^+]$  вызывает подавление вегетативного роста вне зависимости от источника углерода. Во-вторых, штаммы  $[NSI^+]$  фактически перестают расти на среде MGly, едва достигая плотности в 0,5 OD<sub>600nm</sub>. Дальнейшая инкубация этих штаммов в MGly до трех суток не приводит к увеличению плотности культуры. Таким образом,  $[NSI^+]$  обладает плейотропным фенотипическим проявлением, вызывая нонсенс-супрессию на фоне общих дефектов трансляции или снижения функциональной активности Sup35 как фактора терминации трансляции, а также общий дефект вегетативного роста [по: Nizhnikov et al. 2012].

**Характеристика прионных свойств  $[NSI^+]$ .** Исходя из того, что  $[NSI^+]$  эффективно изгоняется ГГХ и на фоне делеции *HSP104*, мы предположили, что этот детерминант может иметь прионную природу. Для дрожжевых прионов свойственен комплекс из трех особенностей: инфекционности, способности к спонтанному возникновению *de novo* и нехромосомного наследования 4:0 в мейозе, которые и анализировались в данном разделе. Одной из методик анализа цитоплазматической инфекционности прионов является белковая трансформация [Tanaka and Weissman, 2006]. Штаммы 1-Д933  $[nsi^-][PIN^+]$  или 1-1-1-Д931  $[nsi^-][pin^-]$  котрансформировали белковым лизатом, выделенным из штамма 4-1-1-Д931  $[NSI^+][PIN^+]$  и вектором pRS315. В качестве контроля трансформировали штаммы 1-Д933 и 1-1-1-Д931 белковым лизатом, выделенным из штамма 1-4-1-1-Д931  $[nsi^-][pin^-]$ . Полученные результаты приведены в Таблице 3. В опыте происходила передача фактора  $[NSI^+]$  с эффективностью 5-7%, в то время как в контрольных экспериментах не было отмечено возникновения ни одного  $[NSI^+]$  клона. Эти данные позволяют констатировать, что фактор  $[NSI^+]$  обладает цитоплазматической инфекционностью.

Способность к спонтанному возникновению *de novo* является одной из ключевых особенностей дрожжевых прионов, позволяющей отличить их от большинства других нехромосомных детерминантов [по: Wickner et al. 2007]. Для анализа способности  $[NSI^+]$  к спонтанному возникновению *de novo* был использован штамм 2-4-1-1-Д931  $[nsi^-][PIN^+]$ . В результате, среди отобранных нами 88 клонов, проторофных по аденину, мы выявили 11 клонов, которые

стабильно наследовали ГТХ-зависимый супрессорный фенотип в ряду клеточных поколений, то есть клонов  $[NSI^+]$  (Таблица 4). Этот результат показывает, что фактор  $[NSI^+]$ , как и известные дрожжевые прионы, обладает способностью к спонтанному возникновению *de novo* после элиминации.

Мы провели анализ наследования  $[NSI^+]$  при помощи тетрадного анализа. Фактор  $[NSI^+]$  вызывает нонсенс-супрессию на фоне замещения нативного *SUP35* ортологом из *Pichia methanolica* (далее – *SUP35P.m.*). Путем скрещивания гаплоидных штаммов  $[NSI^+]$  и  $[nsi^-]$  был получен диплоидный штамм Д935. Этот штамм содержал  $[NSI^+]$ , что подтверждает доминантные свойства этого детерминанта. Данный штамм был использован для проведения тетрадного анализа. В тетрадах, которые образовали четыре жизнеспособные аскоспоры, наблюдалось соотношение  $4[NSI^+]:0[nsi^-]$  (Таблица 5). Таким образом, для фактора  $[NSI^+]$ , как и для известных дрожжевых прионов, характерно нехромосомное наследование 4:0 в мейозе. Этот факт, наряду с данными о цитоплазматической инфекционности и о спонтанном возникновении *de novo*, свидетельствует в пользу прионной природы фактора  $[NSI^+]$ . В целом, полученные данные позволяют рассматривать  $[NSI^+]$  в качестве прионоподобного детерминанта *S. cerevisiae*.

**Таблица 3 – Результаты белковой трансформации**

Штамм-донор белкового лизата	Штамм-реципиент	Номер эксперимента	Отобрано трансформантов	Количество трансформантов $[NSI^+]$	Процент трансформантов $[NSI^+]$
4-1-1-Д931 $[NSI^+][PIN^+]$	1-Д933 $[nsi^-][PIN^+]$	1	100	5	$5,0 \pm 2,2$
		2	100	7	$7,0 \pm 2,6$
		3	100	6	$6,0 \pm 2,4$
1-4-1-1-Д931 $[nsi^-][pin^-]$	1-Д933 $[nsi^-][PIN^+]$	1	100	0	$0 + 0,3$
		2	100	0	$0 + 0,3$
		3	100	0	$0 + 0,3$
4-1-1-Д931 $[NSI^+][PIN^+]$	1-1-1-Д931 $[nsi^-][pin^-]$	4	100	5	$5,0 \pm 2,2$
		5	100	6	$6,0 \pm 2,4$
1-4-1-1-Д931 $[nsi^-][pin^-]$	1-1-1-Д931 $[nsi^-][pin^-]$	4	100	0	$0 + 0,3$
		5	100	0	$0 + 0,3$

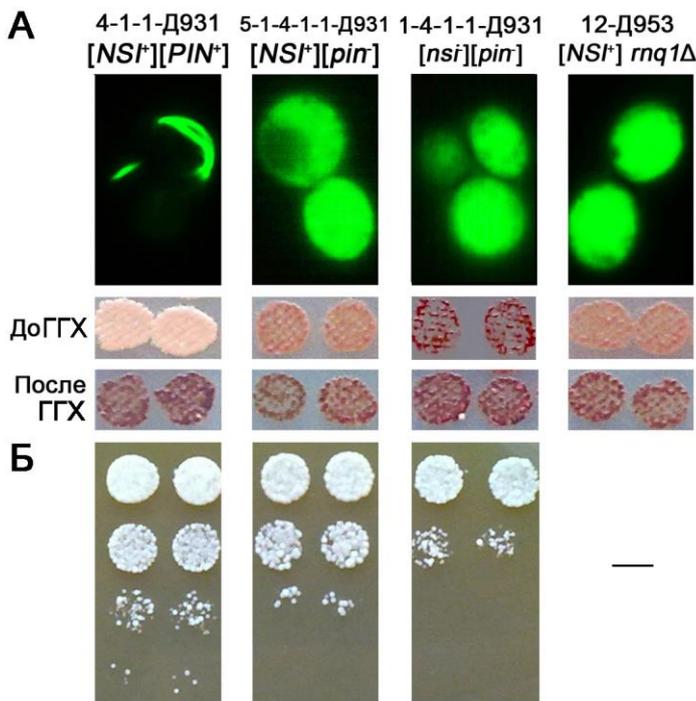
**Таблица 4 – Анализ спонтанного возникновения  $[NSI^+]$  *de novo***

Штамм	Количество клеток в разведении	Количество клонов, прототрофных по аденину			Всего
		Нестабильные в митозе	Митотически стабильные		
			Ревертанты	$[NSI^+]$	
2-4-1-1-Д931 $[nsi^-][PIN^+]$	$2 \cdot 10^4$	2	1	0	88
	$2 \cdot 10^5$	7	12	3	
	$2 \cdot 10^6$	25	30	8	

**Таблица 5 – Анализ наследования фактора  $[NSI^+]$**

Диплоидный штамм	Количество тетрад	Количество тетрад с соотношением $[NSI^+]:[nsi^-]$				
		4:0	3:1	2:2	1:3	0:4
$[NSI^+]$ Д935	12	12	0	0	0	0
$[nsi^-]$ Д936	14	0	0	0	0	14

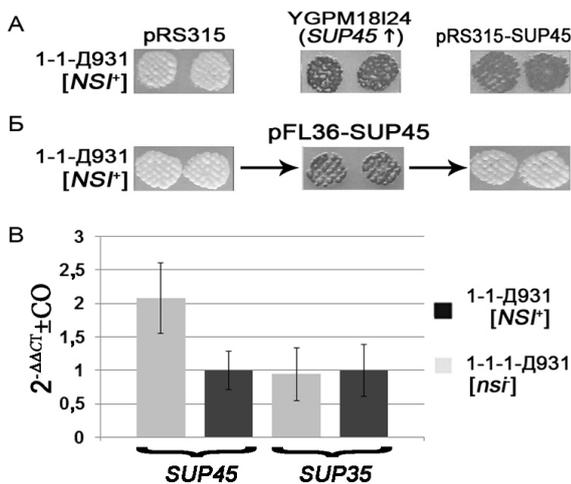
**Изучение взаимодействия  $[NSI^+]$  с детерминантом  $[PIN^+]$ .** Анализ штамма 12-Д953 *mql1Δ*  $[NSI^+]$  показал, что  $[NSI^+]$  в данном штамме стабильно поддерживается и лечится на ГГХ, но нонсенс-супрессия, которую он вызывает, выражена слабее, чем в исходном штамме 1-1-Д931  $[NSI^+][PIN^+]$  (Рисунок 3.А). Данный эффект мог быть вызван двумя причинами: либо собственно делецией гена *RNQ1*, либо утратой детерминанта  $[PIN^+]$ , который является прионной изоформой Rnq1. Для решения данного вопроса нам было необходимо получить штамм  $[NSI^+][pin^-]$ . В таком штамме белок Rnq1 присутствует, однако находится не в прионной изоформе, что позволяет сделать однозначный вывод о том, что влияет на проявление  $[NSI^+]$  – утрата или прионизация Rnq1. Мы котрансформировали  $[nsi^-][pin^-]$  штамм 1-4-1-1-Д931 лизатом  $[NSI^+][PIN^+]$  штамма 4-1-1-Д931 и плазмидой pmCUPNMsGFP. Трансформантов  $[NSI^+]$  отбирали на селективной среде без аденина, и, для контроля, пассировали на среде с ГГХ. Белок Sup35NM-GFP агрегирует в штаммах  $[PIN^+]$  и находится в мономерном состоянии в штаммах  $[pin^-]$  (Derkatch et al. 2001; Рисунок 3.А). Опираясь на этот факт, статус  $[pin^-]$  полученных клонов устанавливали при помощи флуоресцентной микроскопии. В результате отбора таких клонов был получен  $[NSI^+][pin^-]$  штамм 5-1-4-1-1-Д931. Данный штамм характеризовался сниженным, но хорошо детектируемым уровнем нонсенс-супрессии (Рисунок 3.А). На следующем этапе работы мы провели более точную оценку уровня нонсенс-супрессии в штаммах 4-1-1-Д931  $[NSI^+][PIN^+]$ , 5-1-4-1-1-Д931  $[NSI^+][pin^-]$  и 1-4-1-1-Д931  $[nsi^-][pin^-]$  с помощью теста на разведение. Полученные результаты (Рисунок 3.Б) позволяют констатировать, что прионный детерминант  $[PIN^+]$  усиливает нонсенс-супрессию, вызываемую  $[NSI^+]$ : штамм  $[NSI^+][pin^-]$  характеризуется промежуточным уровнем нонсенс-супрессии между штаммами  $[NSI^+][PIN^+]$  и  $[nsi^-][pin^-]$  (Рисунок 3.Б). Таким образом, детерминант  $[PIN^+]$  является аллосупрессором, усиливая нонсенс-супрессию в штаммах  $[NSI^+]$ .



**Рисунок 3 – Анализ влияния детерминанта  $[PIN^+]$  на проявление фактора  $[NSI^+]$ .** А. Анализ агрегации белка Sup35NM-GFP, а также нонсенс-супрессии в штаммах 4-1-1-Д931  $[NSI^+][PIN^+]$ , 5-1-4-1-1-Д931  $[NSI^+][pin^-]$ , 1-4-1-1-Д931  $[nsi^-][pin^-]$  и 12-Д953 *mql1Δ*  $[NSI^+]$ . Нонсенс-супрессию анализировали на селективной среде без аденина со 150 мкМ  $CuSO_4$ . Б. Оценка нонсенс-супрессии в штаммах 4-1-1-Д931  $[NSI^+][PIN^+]$ , 5-1-4-1-1-Д931  $[NSI^+][pin^-]$  и 1-4-1-1-Д931  $[nsi^-][pin^-]$ . Представлена серия десятикратных разведений культур соответствующих штаммов, выращенных в течение пяти суток в жидкой селективной среде без аденина со 100 мкМ  $CuSO_4$ . Фотография получена через трое суток выращивания штаммов на полной среде.

**Поиск генов, сверхэкспрессия которых маскирует фенотипическое проявление  $[NSI^+]$ .** Одним из этапов характеристики  $[NSI^+]$  является поиск генов, сверхэкспрессия которых подавляет фенотипическое проявление данного прионоподобного детерминанта. Данный подход может позволить идентифицировать гены, продукты которых опосредуют фенотипическое проявление  $[NSI^+]$  или участвуют в биогенезе этого детерминанта, а также

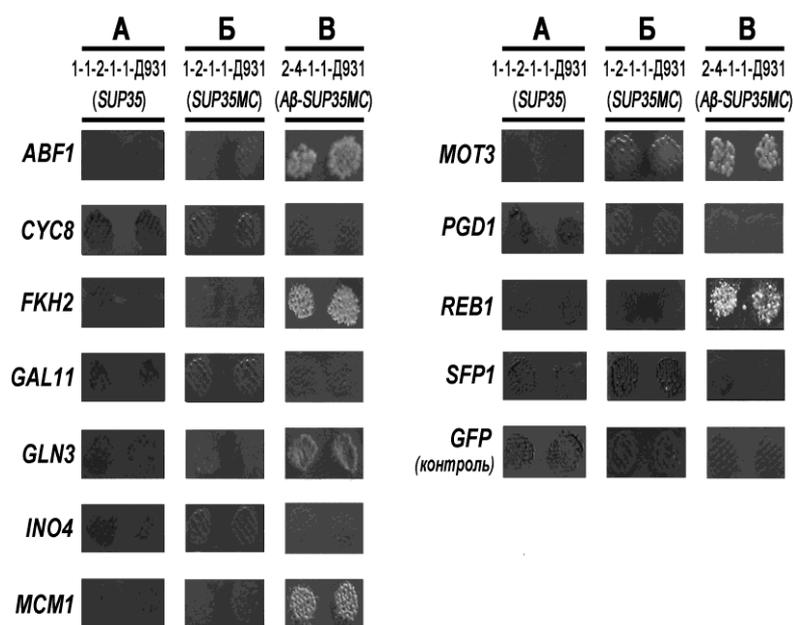
выявить рецессивные мутации, которые могут влиять на проявление  $[NSI^+]$ . Для выявления таких генов мы провели геномный скрининг, включающий в себя 1588 трансформаций штамма 2-2-1-1-Д931  $[NSI^+]$  плазмидами библиотеки YSC4613 “Open Biosystems” (США). Эти плазмиды являются многокопийными, содержат ген *LEU2* для селекции в дрожжах и вставку, несущую фрагмент дрожжевого генома с известной нуклеотидной последовательностью, включающий, в среднем, девять генов. Было отобрано по восемь трансформантов каждой плазмидой, которых затем переносили методом отпечатков на селективную среду без лейцина и аденина для анализа супрессии нонсенс-мутации *ade1-14*. Всего в работе было проанализировано 12700 трансформантов. В результате скрининга было установлено, что к подавлению нонсенс-супрессии в штаммах  $[NSI^+]$  приводит увеличение экспрессии гена *SUP45*. Для этого достаточно не только многокопийной экспрессии *SUP45* (Рисунок 4.А), но и введения дополнительной копии *SUP45* на центромерной плазмиде pRS315-SUP45 или pFL36-SUP45 (Рисунок 4.А и Б). При последующей потере данных плазмид нонсенс-супрессия восстанавливается, то есть увеличение экспрессии *SUP45* не элиминирует  $[NSI^+]$  (Рисунок 4.Б). Мы предположили, что этот эффект может быть связан с тем, что детерминант  $[NSI^+]$  участвует в регуляции *SUP45* на уровне мРНК. Для проверки этого предположения относительные количества мРНК *SUP45* в штаммах 1-1-Д931  $[NSI^+]$  и 1-1-1-Д931  $[nsi^-]$  были сравнены при помощи ПЦРПВ. Данные, полученные на 14 независимо выделенных пробах мРНК каждого из штаммов, показали (Рисунок 13.В), что в штамме  $[NSI^+]$  достоверно ( $p \leq 0,01$ ) снижено количество мРНК *SUP45* в сравнении со штаммом  $[nsi^-]$  (значения параметров  $\Delta Ct$  соответствуют  $2,08 \pm 0,521$  и  $1,00 \pm 0,289$  для  $[NSI^+]$  и  $[nsi^-]$  штаммов, соответственно). Следовательно, на фоне  $[NSI^+]$  действительно снижается количество мРНК *SUP45*, что объясняет антисупрессорный эффект введения дополнительной копии *SUP45*. Также, поскольку в данном скрининге был выявлен ген *SUP35*, мы предположили, что  $[NSI^+]$  может действовать на него аналогичным образом. Однако, проверка относительного количества мРНК *SUP35* в штаммах 1-1-Д931  $[NSI^+]$  и 1-1-1-Д931  $[nsi^-]$  не выявила отличий (Рисунок 13.В). Таким образом, детерминант  $[NSI^+]$  снижает количество мРНК *SUP45*, вызывая нонсенс-супрессию, фенотипически детектируемую на фоне снижения функциональной активности *Sup35* как фактора терминации трансляции.



**Рисунок 4 – Анализ влияния гена *SUP45* на нонсенс-супрессию в штаммах  $[NSI^+]$ .** А. Эффекты трансформации штамма  $[NSI^+]$  многокопийной плазмидой YGPM18I24, содержащей *SUP45*, и центромерной плазмидой pRS315-SUP45. Б. Штамм  $[NSI^+]$  трансформировали центромерной плазмидой pFL36-SUP45 и анализировали нонсенс-супрессию до и после потери плазмиды. В. Сравнительный анализ относительных количеств мРНК *SUP45* и *SUP35* в штаммах 1-1-Д931  $[NSI^+]$  и 1-1-1-Д931  $[nsi^-]$  при помощи ПЦРПВ. Значения представлены как  $2^{-\Delta\Delta Ct} \pm CO$ .

Поскольку мы установили, что нонсенс-супрессия в штаммах  $[NSI^+]$  опосредована снижением количества мРНК *SUP45*, было логично предположить, что детерминант  $[NSI^+]$  участвует в регуляции экспрессии *SUP45* или регулирует стабильность мРНК этого гена. Мы исследовали влияние сверхэкспрессии транскрипционных факторов *SUP45* на нонсенс-супрессию в штаммах  $[nsi^-]$ . Для анализа мы выбрали 11 генов. Четыре из них (*ABF1*, *INO4*, *REB1*, *SFP1*) кодируют охарактеризованные транскрипционные факторы *SUP45*, три –

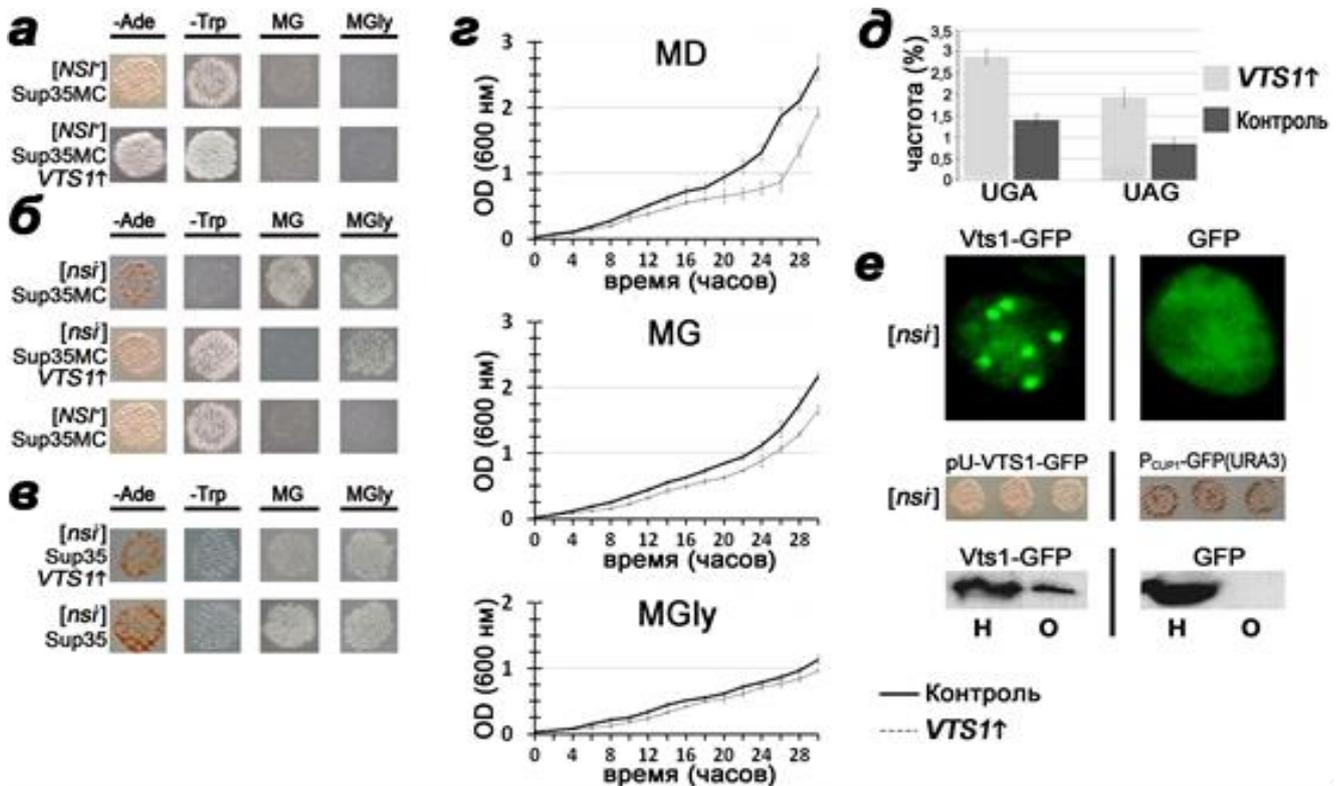
потенциальные (*FKH2*, *MCM1*, *MOT3*), четыре оставшихся гена (*CYC8*, *GAL11*, *GLN3*, *PGD1*) являются глобальными регуляторами транскрипции, которые влияют на экспрессию значительного количества генов дрожжевого генома. Все эти гены объединяет то, что они кодируют NQ-обогащенные белки, которые могут являться потенциальными прионами. Для сверхэкспрессии выбранных для анализа генов была использована серия из 11 многокопийных плазмид рU-CUP1, маркированных *URA3* и несущих соответствующие гены под контролем сильного индуцибельного промотора *CUP1* [Нижников и др. 2013]. Этими плазмидами были трансформированы [*nsi*] штаммы 1-1-2-1-1-Д931, 1-2-1-1-Д931 и 2-4-1-1-Д931. Данные штаммы содержат делецию хромосомной копии *SUP35*, и несут плазмидные копии *SUP35*, *SUP35MC* и *Δβ-SUP35MC*, соответственно. Результаты анализа нонсенс-супрессии на среде без аденина представлены на Рисунке 5. Полученные данные показывают, что сверхэкспрессия генов *ABF1*, *GLN3*, *FKH2*, *MCM1*, *MOT3* и *REB1* вызывает различную по эффективности нонсенс-супрессию на среде без аденина только на фоне продукции химерного белка Δβ-Sup35MC. Эта нонсенс-супрессия усиливается в присутствии детерминанта [*NSI*<sup>+</sup>], однако полностью элиминируется после потери плазмид для сверхэкспрессии (результат не представлен). Таким образом, наблюдаемая нонсенс-супрессия не связана с возможной прионизацией исследуемых белков. На основании полученных данных можно заключить, что гены *ABF1*, *GLN3*, *FKH2*, *MCM1*, *MOT3* и *REB1* являются многокопийными аллосупрессорами, проявляющимися на фоне нарушений функциональной активности Sup35 [по: Нижников и др. 2013].



**Рисунок 5 – Влияние сверхэкспрессии генов, кодирующих N/Q-обогащенные транскрипционные факторы, на супрессию аллели *ade1-14<sub>UGA</sub>* в штаммах с различными вариантами Sup35.** Анализ нонсенс-супрессии на среде без добавления урацила и аденина со 150 мкМ CuSO<sub>4</sub> на фоне сверхэкспрессии генов *ABF1*, *CYC8*, *FKH2*, *GAL11*, *GLN3*, *INO4*, *MCM1*, *MOT3*, *PGD1*, *REB1* и *SFP1*. **А.** В штамме 1-1-2-1-1-Д931. **Б.** В штамме 1-2-1-1-Д931. **В.** В штамме 2-4-1-1-Д931. Фотографии получены через семь дней инкубации на селективной среде без аденина со 150 мкМ CuSO<sub>4</sub> при 30<sup>0</sup>С. В качестве отрицательного контроля штаммы были трансформированы плазмидой рCUP1-GFP(*URA3*) [по: Нижников и др. 2013].

**Выявление генов, сверхэкспрессия которых сходна по фенотипическому проявлению с [*NSI*<sup>+</sup>].** В ходе нашей дальнейшей работы мы сосредоточились на поиске генов, сверхэкспрессия которых модифицирует проявление [*NSI*<sup>+</sup>] или сходна с ним. Для этого был проведен геномный скрининг в штамме 1-Д933 [*nsi*][*PIN*<sup>+</sup>]. Мы провели 1588 трансформаций штамма 1-Д933 плазмидами библиотеки YSC4613. По восемь трансформантов каждой плазмидой отбирали на селективную среду без лейцина, инкубировали в течение трех суток и переносили методом отпечатков на селективную среду без лейцина и аденина со 150 мкМ CuSO<sub>4</sub> для анализа супрессии нонсенс-мутации *ade1-14*. Всего в скрининге было проанализировано более 12700 трансформантов. В результате эксперимента нами было выявлено 24 плазмиды, несущие 178 генов, трансформация которыми вызывала нонсенс-супрессию в штамме 1-Д933. Результаты анализа части генов, выявленных в ходе скрининга,

показали, что сверхэкспрессия *NAB2*, *NAB3* и *VTS1*, вызывает нонсенс-супрессию на селективной среде без аденина, однако omnipotentную нонсенс-супрессию, свойственную [*NSI*<sup>+</sup>], вызывает только сверхэкспрессия *VTS1*. Мы провели анализ эффектов сверхэкспрессии *VTS1* при помощи плазмиды pU-CUP1-VTS1 в штаммах 2-1-1-Д931 [*NSI*<sup>+</sup>] и 1-2-1-1-Д931 [*nsi*], продуцирующих Sup35MC. Полученные данные показывают, что сверхэкспрессия *VTS1* в штамме 1-2-1-1-Д931 [*nsi*] вызывает супрессию нонсенс-аллелей *ade1-14*<sub>UGA</sub> и *trp1-289*<sub>UAG</sub>, а также подавляет вегетативный рост (Рисунок 6.Б), проявляя сходство с [*NSI*<sup>+</sup>] [Нижников и др. 2011; Nizhnikov et al. 2012].

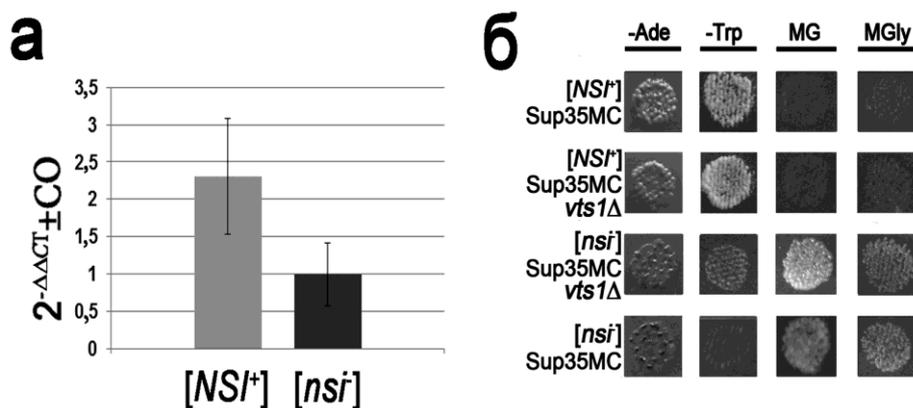


**Рисунок 6 – Анализ эффектов сверхэкспрессии гена *VTS1*.** **А.** Сверхэкспрессия *VTS1* усиливает нонсенс-супрессию в штамме 2-1-1-Д931 [*NSI*<sup>+</sup>]. **Б.** Сверхэкспрессия *VTS1* вызывает нонсенс-супрессию и подавление вегетативного роста на среде MG в штамме 1-2-1-1-Д931 [*nsi*], несущем плазмиду pRS315-SUP35MC. **В.** Сверхэкспрессия *VTS1* не вызывает нонсенс-супрессию в штамме 1-2-1-1-Д931 [*nsi*] на фоне продукции полноразмерного *SUP35*, однако подавляет рост на среде MG. **Г.** Сравнение роста штамма 1-2-1-1-Д931 [*nsi*] со сверхэкспрессией *VTS1* и в контроле, без сверхэкспрессии. Значения на кривых роста приведены со стандартными ошибками. **Д.** Сверхэкспрессия *VTS1* влияет на эффективность считывания стоп-кодона UGA и UAG как значащих. Частоты считывания стоп-кодона как значащих приведены со стандартными отклонениями. **Е.** Гибридный белок Vts1-GFP агрегирует при сверхпродукции. Приведены данные флуоресцентной микроскопии и вестерн-блот гибридализации с антителами против GFP. «Н» - надосадочная фракция, «О» - осадочная [по: Nizhnikov et al. 2012].

Мы предположили, что также, как и в случае [*NSI*<sup>+</sup>], нонсенс-супрессия, наблюдаемая на фоне сверхэкспрессии *VTS1*, является следствием снижения эффективности терминации трансляции. Полученные при помощи метода бицистронной люминесценции данные (Рисунок 6.Д) показали, что при сверхэкспрессии *VTS1* действительно наблюдается статистически достоверное повышение частоты считывания обоих проанализированных стоп-кодонов, что вполне объясняет наблюдаемое действие сверхэкспрессии этого гена на нонсенс-супрессию.

Белок Vts1 обогащен аспарагином и глутамином. Такие белки, зачастую, обладают способностью к агрегации [Alberti et al. 2009]. Мы решили проверить способность к агрегации Vts1. Для этого нами была получена плаزمида pU-VTS1-GFP, позволяющая сверхпродуцировать химерный белок Vts1-GFP под контролем промотора *CUP1*. Штамм 1-2-1-1-Д931 [*nsi*<sup>-</sup>] был трансформирован этой плазмидой, а также плазмидой P<sub>CUP1</sub>-GFP(URA3) в качестве контроля. Также как и плаزمида pU-CUP1-VTS эта плаزمида вызывает нонсенс-супрессию (Рисунок 6.Е). Анализ трансформантов, проведенный при помощи флуоресцентной микроскопии, показал, что белок GFP в контрольных трансформантах находится в растворимой форме, формируя равномерное свечение (Рисунок 6.Е). В то же время, химерный белок Vts1-GFP образует хорошо различимые флуоресцентные агрегаты (Рисунок 6.Е). Анализ белка Vts1-GFP при помощи дифференциального центрифугирования с последующей вестерн-блот гибридизацией показал, что этот белок выявляется в осадочной фракции, в отличие от белка GFP, присутствующего лишь во фракции растворимого белка (Рисунок 6.Е).

Анализ эффектов делеции гена *VTS1* показал, что она не оказывает влияния на вегетативный рост штамма (в качестве контроля были использованы штаммы 2-1-1-Д931 [*NSI*<sup>+</sup>] и 1-2-1-1-Д931 [*nsi*<sup>-</sup>]), а также не вызывает элиминацию [*NSI*<sup>+</sup>] (Рисунок 7.Б). Вместе с тем, после лечения штамма 6-2-1-1-Д931 на ГТХ наблюдается слабый рост на селективной среде без аденина (Рисунок 7.Б). Таким образом, делеция *VTS1* не влияет на поддержание [*NSI*<sup>+</sup>], однако оказывает незначительное влияние на нонсенс-супрессию.



**Рисунок 7 – Анализ эффектов сверхэкспрессии и делеции гена *VTS1*. А.** Сравнение относительных количеств мРНК *VTS1* в штаммах [*NSI*<sup>+</sup>] и [*nsi*<sup>-</sup>] при помощи ПЦРПВ. **Б.** Делеция *VTS1* в штамме 6-2-1-1-Д931 не приводит к элиминации детерминанта [*NSI*<sup>+</sup>] [по: Nizhnikov et al. 2012].

Из полученных данных стала очевидна взаимосвязь между генами *VTS1*, *SUP35* и детерминантом [*NSI*<sup>+</sup>]. Мы сравнили относительные количества мРНК *VTS1* в изогенных штаммах [*NSI*<sup>+</sup>] [*nsi*<sup>-</sup>]. В результате были получены данные, показывающие, что в штамме [*NSI*<sup>+</sup>] достоверно ( $p \leq 0,01$ ) повышено количество мРНК *VTS1* (Рисунок 7.А) приблизительно в 2,3 раза. Таким образом, *VTS1* является многокопийным омнипотентным супрессором, взаимодействующим на молекулярном уровне с детерминантом [*NSI*<sup>+</sup>], но не вовлеченным в его поддержание.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Работа продолжает исследование фундаментальной проблемы неоднозначности одного из основных процессов живой клетки – терминации трансляции. Знание об эпигенетических регуляторах нонсенс-супрессии расширено за счет обнаружения аллосупрессорных свойств приона [*PIN*<sup>+</sup>]. Выявление целого ряда новых генетических супрессоров – гена *VTS1*, кодирующего РНК-связывающий белок, и шести генов, *ABF1*, *GLN3*, *FKH2*, *MCM1*, *MOT3* и *REB1*, кодирующих транскрипционные факторы, расширяет представление об участниках системы регуляции эффективности нонсенс-супрессии и терминации трансляции. Полученные результаты позволяют предполагать,

что эта система имеет значительное количество тонких регуляторов, имеющих как эпигенетическую, так и генетическую природу и взаимодействующих между собой.

Центральное место в настоящем исследовании занимает характеристика детерминанта  $[NSI^+]$  *S. cerevisiae* и генов, опосредующих его фенотипическое проявление. Показаны прионные свойства  $[NSI^+]$  (нехромосомное наследование, цитоплазматическая инфекционность и способность к спонтанному возникновению *de novo*), охарактеризованы особенности и механизмы нонсенс-супрессии, наблюдаемой при его возникновении. Установлено, что  $[NSI^+]$  вызывает снижение эффективности терминации трансляции, уменьшая количество мРНК гена *SUP45*. Это вызывает фенотипически детектируемую нонсенс-супрессию на фоне общих дефектов трансляции или вариантов eRF3, обладающих сниженной функциональной активностью. Выявлено влияние  $[NSI^+]$  на вегетативный рост дрожжей. Полученные данные свидетельствуют в пользу того, что  $[NSI^+]$  является новым прионом дрожжей *S. cerevisiae*.

### ВЫВОДЫ

1. Детерминант  $[NSI^+]$  обладает плейотропным фенотипическим проявлением, вызывая нонсенс-супрессию и подавление вегетативного роста.
2.  $[NSI^+]$  вызывает фенотипически детектируемую нонсенс-супрессию на фоне общих дефектов трансляции или вариантов eRF3 со сниженной функциональной активностью.
3.  $[NSI^+]$  вызывает снижение эффективности терминации трансляции.
4.  $[NSI^+]$  обладает основными свойствами дрожжевого приона.
5. Прионный детерминант  $[PIN^+]$  усиливает нонсенс-супрессию в штаммах  $[NSI^+]$ .
6. Ген *VTS1* регулирует эффективность терминации трансляции, а фенотипические эффекты его сверхэкспрессии сходны с фенотипическими проявлениями  $[NSI^+]$ .
7. Детерминант  $[NSI^+]$  вовлечен в регуляцию количества мРНК у дрожжей *S. cerevisiae*, что показано на примере генов *SUP45* и *VTS1*.
8. Нонсенс-супрессия в штаммах  $[NSI^+]$  является следствием снижения количества мРНК *SUP45*.
9. Сверхэкспрессия генов *ABF1*, *GLN3*, *FKH2*, *MCM1*, *MOT3* и *REB1*, подобно детерминанту  $[NSI^+]$ , вызывает нонсенс-супрессию на фоне снижения функциональной активности eRF3.

### СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

#### Статьи в журналах, рекомендованных ВАК:

1. Нижников А.А., Кондрашкина А.М., Антонец К.С., Галкин А.П. Сверхэкспрессия генов, кодирующих аспарагин-глутамин обогатенные транскрипционные факторы, вызывает нонсенс-супрессию у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. // Экологическая генетика. 2013Б. Т. 11. С. 49-58.
2. Nizhnikov A.A., Magomedova Z.M., Rubel A.A., Kondrashkina A.M., Inge-Vechtomov S.G., Galkin A.P.  $[NSI^+]$  determinant has a pleiotropic phenotypic manifestation that is modulated by *SUP35*, *SUP45*, and *VTS1* genes. // Current Genetics. 2012. V. 58. P. 35-47.
3. Нижников А.А., Магомедова З.М., Сайфитдинова А.Ф., Инге-Вечтомов С.Г., Галкин А.П. Выявление генов, кодирующих потенциально амилоидогенные белки, участвующих в регуляции нонсенс-супрессии у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. // Экологическая генетика. 2011. Т. 9. С. 79-86.
4. Saifitdinova A.F., Nizhnikov A.A., Lada A.G., Rubel A.A., Magomedova Z.M., Ignatova V.V., Inge-Vechtomov S.G., Galkin A.P.  $[NSI^+]$ : a novel non-Mendelian nonsense suppressor determinant in *Saccharomyces cerevisiae*. // Current Genetics. 2010. V. 56. P. 467-478.

**Тезисные сообщения:**

5. Nizhnikov A.A., Magomedova Z.M., Kondrashkina A.M., Galkin A.P. [NSI+] determinant affects readthrough of termination codons by reducing the SUP45 mRNA amounts. // The 4<sup>th</sup> EMBO meeting. 2012. Nice, 22-25 September. Book of abstracts. 2012. V. 1. P. 97.

6. Nizhnikov A.A., A.F. Saifitdinova, A.G. Lada, Z.M. Magomedova, A.A. Rubel, V.V. Ignatova, S.G. Inge-Vechtomov, A.P. Galkin. [NSI<sup>+</sup>] – a novel prion-like determinant in *Saccharomyces cerevisiae*. // The 25<sup>th</sup> Conference on Yeast Genetics and Molecular Biology. Yeast. 2011. V. 28. Supplement 1. P. 132.

7. Нижников А.А., Галкин А.П. Выявление нового прионоподобного детерминанта [ABA] дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. // Пятый съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров, сборник тезисов. 21-27 июня 2009. Москва. Т. 2. С. 158.

8. Нижников А.А., Магомедова З.М. Геномный скрининг для выявления гена-детерминанта прионоподобного фактора [NSI<sup>+</sup>] дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. // Материалы XVII Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов». 2010. Т. 1. С. 89.

9. Нижников А.А., Галкин А.П. Поиск генов, влияющих на фенотипическое проявление прионоподобного фактора [NSI<sup>+</sup>] *Saccharomyces cerevisiae*. // Биология – наука XXI века: 14-я Пушинская международная школа-конференция молодых ученых. Пушино, 19 - 23 апреля 2010 года. Сборник тезисов. 2010. Т. 2. С. 163.

10. Нижников А.А., Галкин А.П. Демонстрация инфекционных свойств прионоподобного фактора [NSI<sup>+</sup>] при помощи белковой трансформации. // Биология – наука XXI века: 14-я Пушинская международная школа-конференция молодых ученых. Пушино, 19 - 23 апреля 2010 года. Сборник тезисов. 2010. Т. 2. С. 248.

11. Нижников А.А., Лада А.Г., Сайфитдинова А.Ф., Инге-Вечтомов С.Г., Галкин А.П. Фактор [PIN<sup>+</sup>] дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* влияет на фенотипическое проявление детерминанта [NSI<sup>+</sup>]. // Биология – наука XXI века: 15-я Пушинская международная школа-конференция молодых ученых. Пушино, 18 - 22 апреля 2011 года. Сборник тезисов. 2011. Т. 1. С. 22.

12. Нижников А.А., Магомедова З.М., Рубель А.А., Инге-Вечтомов С.Г., Галкин А.П. Фенотипическое проявление детерминанта [NSI<sup>+</sup>] дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* опосредовано генами SUP35 и SUP45. // Биология – наука XXI века: 15-я Пушинская международная школа-конференция молодых ученых. Пушино, 18 - 22 апреля 2011 года. Сборник тезисов. 2011. Т. 1. С. 23.

13. Кондрашкина А.М., Галкин А.П., Нижников А.А. Нонсенс-супрессия в штаммах дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, несущих детерминант [NSI<sup>+</sup>], опосредована снижением количества мРНК гена SUP45. // Биология – наука XXI века: 16-я Пушинская международная школа-конференция молодых ученых. Пушино, 16 - 21 апреля 2012 года. Сборник тезисов. 2012. Т. 1. С. 116.

14. Нижников А.А., Кондрашкина А.М., Инге-Вечтомов С.Г., Галкин А.П. Прионоподобный детерминант [NSI<sup>+</sup>] вызывает снижение эффективности терминации трансляции у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. // Биология – наука XXI века: 16-я Пушинская международная школа-конференция молодых ученых. Пушино, 16 - 21 апреля 2012 года. Сборник тезисов. 2012. Т. 1. С. 86-87.

15. Кондрашкина А.М., Галкин А.П., Нижников А.А. Взаимосвязь генов SUP45 и VTS1 в дрожжах *Saccharomyces cerevisiae*. // Труды II Всероссийской конференции с международным участием «Биология будущего: традиции и новации», сборник тезисов. 2012. Т. 1. С. 150-151.