

САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

На правах рукописи

Бондарев Станислав Александрович

**ВЛИЯНИЕ МУТАЦИЙ В ПРИОНИЗУЮЩЕМ ДОМЕНЕ БЕЛКА Sup35
НА СВОЙСТВА ПРИОНА [PSI⁺] ДРОЖЖЕЙ *Saccharomyces cerevisiae***

специальность: 03.02.07 - генетика

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург
2014

Работа выполнена на кафедре генетики и биотехнологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Санкт-Петербургский государственный университет».

Научный руководитель: Доктор биологических наук, доцент
Галина Анатольевна Журавлева,
профессор кафедры генетики и биотехнологии,
Санкт-Петербургский государственный
университет.

Официальные оппоненты: Доктор биологических наук,
старший научный сотрудник
Тыну Рихович Сойдла,
ведущий научный сотрудник Института
цитологии РАН (Санкт-Петербург).

Доктор биологических наук,
Светлана Владимировна Саранцева,
заместитель директора по научной работе
ФГБУ "ПИЯФ им. Б.П. Константинова"
НИЦ "Курчатовский институт" (Гатчина).

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего
профессионального образования «Московский
государственный университет им. Ломоносова»
(Москва).

Защита диссертации состоится “ ” 2014 г. в часов на заседании диссертационного совета Д 212.232.12 при Санкт-Петербургском государственном университете по адресу: 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб. 7/9, Санкт-Петербургский государственный университет, биологический факультет, кафедра генетики и биотехнологии, аудитория 1.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке им М. Горького Санкт-Петербургского государственного университета и на сайте Санкт-Петербургского государственного университета (<http://spbu.ru/>).

Автореферат разослан " " 2014 г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета Д 212.232.12,
доктор биологических наук

Людмила Андреевна Мамон

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Прионы – это белки, способные существовать в нескольких конформациях, одна из которых обладает инфекционными свойствами. У млекопитающих известен только один прион PrP, который вызывает различные нейродегенеративные заболевания. У низших эукариот, дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, известно более десяти различных прионов, и все они, как правило, не приводят к гибели клетки. Это позволяет использовать дрожжевые прионы в качестве удобной модельной системы для изучения феномена прионизации. Детерминант [*PSI*⁺] – это прионная изоформа белка Sup35, который является одним из факторов терминации трансляции. Его прионизация приводит к снижению эффективности терминации трансляции и нонсенс-супрессии, т.е. считыванию преждевременных стоп-кодонов как значащих. Таким образом, его присутствие в клетках дрожжей можно легко детектировать по фенотипу, во многом благодаря этому свойству [*PSI*⁺] является одним из наиболее детально исследованных прионов дрожжей.

В клетках дрожжей белки в прионной конформации обычно формируют крупные амилоидные агрегаты. Такие комплексы характеризуются высокой устойчивостью к нагреванию, действию протеиназ, обработке денатурирующими агентами и т.д. Эти свойства прионов связаны с особой конформацией белковых молекул. Несмотря на продолжительную историю исследований, вопрос о структурной организации этих агрегатов остается очень актуальным. Изучение этой проблемы осложняется невозможностью использования традиционных методов (например, рентгеноструктурного анализа), поскольку такие белки имеют тенденцию к спонтанному образованию крупных агрегатов. При этом гипотезы, выдвигаемые на основании экспериментов *in vitro*, не всегда применимы к живым системам. *In vivo* мутационный анализ остается практически единственным подходом, позволяющим получать сведения о структурной организации белков-прионов. Представленная диссертация посвящена изучению влияния мутаций в N-домеине белка Sup35 на свойства приона [*PSI*⁺]. В ходе представленной работы удалось описать эффекты мутантных аллелей *sup35^{KK}*, связанные с изменением свойств фактора [*PSI*⁺]. *In vivo* две из пяти исследованных мутаций приводят к необратимому исчезновению [*PSI*⁺], две другие — к формированию новых, отличных друг от друга вариантов приона. Для одной мутации не удалось обнаружить значимых эффектов. Полученные данные позволили установить молекулярные механизмы, лежащие в основе обнаруженных эффектов. Удалось уточнить фрагмент белка, необходимый для поддержания структуры исследованного варианта приона. Результаты проведенных *in vitro* экспериментов показали, что все исследованные мутации влияют на структуру агрегатов Sup35p. Представленные данные являются актуальными, поскольку описывают различные модификации свойств фактора [*PSI*⁺] под влиянием мутаций *sup35^{KK}* и вносят существенный вклад в понимание фундаментальных механизмов, определяющих свойства и особенности структурной организации дрожжевых прионов.

Целью работы стала идентификация молекулярных механизмов, лежащих в основе влияния мутаций в N-домеине Sup35p на свойства приона [*PSI*⁺]. В ходе исследования решали следующие **задачи**: (1) характеристика влияния мутантных аллелей *sup35^{KK}* на свойства приона [*PSI*⁺]; (2) изучение влияния комбинаций мутантных аллелей *sup35^{KK}* на стабильность приона [*PSI*⁺]; (3) проверка влияния мутантных аллелей *sup35^{KK}* на различные варианты приона [*PSI*⁺]; (4) исследование зависимости эффектов мутантных аллелей *sup35^{KK}* от [*PIN*⁺]-статуса клеток; (5)

характеристика фибрилл, образованных мутантными белками *in vitro*.

Научная новизна исследования. В представленной работе описано влияние новых мутаций в N-домене белка Sup35 на свойства приона [*PSI⁺*]. В отличие от большинства предшествующих работ, мутации были получены не случайным образом, а с помощью сайт-направленного мутагенеза на основании предсказаний модели супер-складчатой β -структуры, которая описывает принципы стабилизации прионных агрегатов Sup35p. Исследуемые мутации затрагивают участок белка, в котором раньше не было обнаружено аминокислотных замен, приводящих к потере приона. Важно также отметить, что впервые был обнаружен эффект «усиления» фактора [*PSI⁺*] под действием мутации *sup35*; ранее в литературе были описаны только аллели, приводящие к потере приона. С помощью сочетания методов классической генетики и молекулярной биологии удалось охарактеризовать молекулярные механизмы действия каждой из аллелей.

Теоретическая и практическая значимость работы. Представленная работа является полноценным и законченным исследованием, сочетающим в себе подходы классической генетики и современной молекулярной биологии. Полученные результаты вносят существенный вклад в понимание фундаментальных механизмов, определяющих свойства и особенности структурной организации дрожжевых прионов. В рамках представленной работы определен фрагмент белка, необходимый для поддержания исследованного варианта приона [*PSI⁺*]. Также показаны модификации структуры агрегатов Sup35p под действием мутантных аллелей *sup35^{KK}*. Кроме этого, описаны изменения свойств приона в присутствии мутаций и охарактеризованы молекулярные механизмы, лежащие в их основе. Исследование принципов, обеспечивающих поддержание структуры прионов, создает предпосылки для разработки подходов к терапии заболеваний, вызываемых накоплением аномально уложенных белков. Полученные данные также могут служить основой для создания методов направленного изменения свойств прионов, а также для создания лекарственных средств против заболеваний, вызываемых накоплением амилоидов.

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, и аналогичных курсов в других высших учебных учреждениях России.

Положения, выносимые на защиту. Исследованные мутации влияют на структуру агрегатов Sup35p, что может приводить как к потере фактора [*PSI⁺*], так и к изменению его свойств. Мутация в первом олигопептидном повторе затрудняет образование гомоагрегатов соответствующего белка. Белок Sup35-M2 при присоединении к прионному агрегату приводит к формированию ненаследуемых амилоидов. Мутация *sup35-M4* способствует образованию более «сильного» варианта приона из-за укорочения фрагмента белка, вовлеченного в формирование суперскладчатой β -структуры. Ослабление приона [*PSI⁺*] в клетках, несущих мутацию *sup35-M5*, связано с уменьшением числа пропagoнов в клетке.

Апробация работы. Данные, представленные в диссертации, опубликованы в виде пяти статей, три из которых в рецензируемых высокорейтинговых журналах и изданиях, рекомендованных ВАК. Материалы работы также были представлены на международных и российских конференциях: на V съезде ВОГиС (Москва, 2009), конференции “Yeast: an evergreen model system” (Rome, Italy, 2010), на V

Международной школе молодых ученых по молекулярной генетике «Непостоянство генома» (Звенигород, 2012), CNRS–Jacques Monod Conference “Protein misfolding in disease: molecular processes and translational research toward therapy” (Roscoff, France, 2013), 25-26th International Conference on Yeast Genetics and Molecular Biology (Olsztyn, Poland, 2011; Frankfurt/Main, Germany, 2013).

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 119 страницах и состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение, выводы, обзор литературы (223 источника). Работа содержит 7 таблиц и 43 рисунка.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Плазмиды. В работе использовали центромерные плазмиды pRSU1 и pRSU2 (Volkov et al., 2002) и их производные, несущие мутации *sup35^{KK}* (конструкции с мутацией *sup35-M1* получены в данной работе, остальные предоставлены В.В. Щепачевым). В ходе экспериментов по индукции [*PSI*⁺] дрожжевые штаммы трансформировали плазмидой CEN-GAL-SUP35 (pVK71) (Derkatch et al., 1996) и ее производными с мутациями *sup35^{KK}*. В ходе работы была получена серия плазмид на основе pET21b-SUP35NM для очистки из клеток *E. coli* белков Sup35NM-(His)₆, несущих исследуемые замены. Вектор pRS315-SUP35-3HA (Afanasieva et al., 2011) использовали для выявления коагрегации белка Sup35 дикого типа и его вариантов Sup35-M1p и Sup35-M2p. Конструкции для количественной оценки эффективности нонсенс-супрессии были получены ранее в лаборатории С.В. Пельца (Wang et al., 2001).

Штаммы. Штаммы 10-7A-D832 и 7A-D832 дрожжей *S. cerevisiae* были предоставлены А.С. Борхсениусом; их генотипы представлены в таблице 1. На их основе в ходе работы получены штаммы 9-10-7A-D832 и 9-7A-D832 (Табл. 1), несущие делецию гена *RNQ1*. Штаммы OT56([*PSI*⁺]^o) и OT55([*PSI*⁺]^w) (изогенные производные от 74-D694 (Chernoff et al., 1995)) были предоставлены Ю.О. Черновым, а субклоны OT56 ([*PSI*⁺]^{nss1}, [*PSI*⁺]^{nss2}) — А.Г. Матвеевко.

Таблица 1. Штаммы дрожжей *S. cerevisiae*, использованные в работе.

Штамм	Генотип
10-7A-D832	<i>MAT α adel-14 his7-1 leu2 lys2 trp1 ura3 SUP35::TRP1</i> [pYCM-U2-SUP35] [<i>PSI</i> ⁺][<i>PIN</i> ⁺]
7A-D832	<i>MAT α adel-14 his7-1 leu2 lys2 trp1 ura3 SUP35::TRP1</i> [pYCM-U2-SUP35] [<i>psi</i> ⁻][<i>PIN</i> ⁺]
9-10-7A-D832	<i>MAT α adel-14 his7-1 leu2 lys2 trp1 ura3 SUP35::TRP1 RNQ1::KanMX</i> [pYCM-U2-SUP35] [<i>PSI</i> ⁺][<i>pin</i> ⁻]
9-7A-D832	<i>MAT α adel-14 his7-1 leu2 lys2 trp1 ura3 SUP35::TRP1 RNQ1::KanMX</i> [pYCM-U2-SUP35] [<i>psi</i> ⁻][<i>pin</i> ⁻]
OT56	<i>MAT α adel-14 his3A-200 leu2-3,112 trp1-289 ura3-52</i> [<i>PSI</i> ⁺] ^o [<i>PIN</i> ⁺]
OT55	<i>MAT α adel-14 his3A-200 leu2-3,112 trp1-289 ura3-52</i> [<i>PSI</i> ⁺] ^w [<i>PIN</i> ⁺]

Для сверхпродукции гетерологичных белков использовали штамм BL21 *E. coli* (*fhuA2* [*lon*] *ompT gal* [*dcm*] *AhdsS*) (Sambrook et al., 1989).

Генетические методы. В работе использовали стандартные методики генетики дрожжей *S. cerevisiae*, а также методы работы с бактериальными культурами, описанные в литературе (Sambrook et al., 1989; Kaiser et al., 1994).

При работе с дрожжевыми штаммами использовали стандартные культуральные среды (Kaiser et al., 1994). Присутствие приона [*PSI*⁺] оценивали по способности клеток дрожжей супрессировать мутацию *ade1-14* (UGA), то есть расти на среде без аденина (–Ade), а также белому цвету колоний на ¼ YEPD (Eaglestone et al., 2000). Для получения большого количества биомассы *E. coli* использовали среду 2TYa (O'Brien and Aitken, 2001).

Оценку эффективности нонсенс-супрессии проводили согласно описанным ранее методикам (Guarente, 1983) с незначительными изменениями. Для оценки количества пропагонов клетки высевали на среду с 5 мМ гидрохлоридом гуанидина. Образовавшиеся колонии затем субклонировали на среде ¼ YEPD и подсчитывали клоны белого или розового цвета, их суммарное количество принимали за число пропагонов на клетку (Cox et al., 2003).

Молекулярно-биологические методы. В ходе работы использовали стандартные методы работы с нуклеиновыми кислотами: ПЦР, электрофорез ДНК в агарозном геле, рестрикцию, лигирование (Sambrook et al., 1989). При работе с белками применяли как стандартный протокол SDS-PAGE (Laemmli, 1970), так и специализированные методики SDS-PAGE с кипячением геля (сравнение состава белков в агрегированной и мономерной фракциях) (Kushnirov et al., 2006), SDD-AGE (оценка размера агрегатов Sup35p) (Kryndushkin et al., 2003; Halfmann and Lindquist, 2009). Белки визуализировали либо с помощью окраски Кумасси (Sambrook et al., 1989), либо по гибридизации с антителами (Towbin et al., 1979). Для идентификации Sup35p были использованы поликлональные антитела SE4290 к eRF3 (Chabelskaya et al., 2004).

Очистку рекомбинантных белков из клеток *E. coli* проводили на колонках с Ni-NTA Agarose («Invitrogen») согласно описанным методикам (Sambrook et al., 1989), с незначительными модификациями, предложенными для Sup35Nmp (Serio et al., 1999).

Просвечивающая электронная микроскопия. Агрегаты Sup35Nmp окрашивали 1 % уранил ацетатом согласно методике позитивного контрастирования (Brum and Steward, 2010). Анализировали препараты на электронном микроскопе JEM Jeol-2100 на базе ресурсного центра «Развитие молекулярных и клеточных технологий» СПбГУ. Обработку изображений проводили в программе ImageJ 1.47i (Wayne Rasband National Institutes of Health, USA).

Всю статистическую обработку, а также построение графиков осуществляли с помощью пакета R v. 2.4.11 (R Development Core Team, 2011). Для оценки достоверности отличий между выборками использовали критерий Манна-Уитни (Урбах, 1975).

РЕЗУЛЬТАТЫ

1. Характеристика влияния мутантных аллелей *sup35^{KK}* на стабильность и свойства приона [*PSI⁺*]

В ходе работы мы исследовали эффекты мутаций *sup35^{KK}*: *sup35-M1* (YQ46-47KK), *sup35-M2* (QQ61-62KK), *sup35-M3* (QQ70-71KK), *sup35-M4* (QQ80-81KK) и *sup35-M5* (QQ89-90KK), каждая из них располагается в одном из олигопептидных повторов (OR) Sup35p. N-домен Sup35p необходим для поддержания фактора [*PSI⁺*] (Ter-Avanesyan et al., 1994) и имеет суперскладчатую β -структуру в составе прионных агрегатов (Shewmaker et al., 2006, 2011). Замены полярных незаряженных остатков аминокислот на заряженные будут приводить к локальному расталкиванию молекул белка из-за кулоновских взаимодействий между одноименными зарядами (Kajava et al., 2004).

Для работы были выбраны два изогенных штамма [*PSI⁺*] и [*psi⁻*] (10-7A-D832 и 7A-D832 соответственно) (Табл. 1). Эти штаммы несут хромосомную делецию гена *SUP35* (*SUP35::TRP1*), компенсируемую его копией, локализованной на центромерной плазмиде. Мутация *ade1-14* (UGA), которая присутствует в этих штаммах, позволяет легко выявлять наличие в клетках фактора [*PSI⁺*] по их нонсенс-супрессорному фенотипу. Штаммы с прионом могут расти на среде без аденина (фенотип Ade⁺) и имеют белый цвет колоний на среде ¼ YEPD. Штаммы [*psi⁻*], наоборот, не могут самостоятельно синтезировать аденин (фенотип Ade⁻), а их клетки накапливают красный пигмент на ¼ YEPD. Штаммы [*PSI⁺*] и [*psi⁻*] были трансформированы плазмидами pRSU1, несущими мутации *sup35^{KK}*. Среди полученных трансформантов способность расти на среде без аденина потеряли только клетки, несущие мутации *sup35-M2* или *PNM2* (Рис. 1).

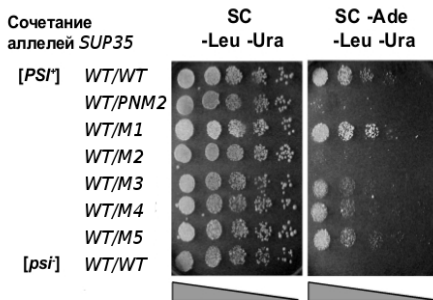


Рисунок 1. Потеря прионного фенотипа в присутствии *PNM2* и *sup35-M2*. Клетки высеваны в серии пятикратных разведений. Стрелка отражает градиент концентрации клеток, слева указаны сочетания аллелей *SUP35*. Мутация *PNM2* была использована в качестве контроля, поскольку она приводит к потере приона (Doel et al., 1994).

Штаммы, полученные на основе проанализированных трансформантов, которые потеряли аллель дикого типа и сохранили мутации *PNM2*, *sup35-M1* и *sup35-M2*, не могли расти на среде без аденина (Рис. 2). Исчезновение фактора [*PSI⁺*] в этих случаях было необратимым, поскольку замена плазмид с мутациями на вектор с геном дикого типа не приводила к восстановлению способности расти на среде без аденина (Рис. 2). Мутации *sup35-M4* — *sup35-M5* могли поддерживать прион, при этом первая усиливала, а вторая ослабляла его фенотипическое проявление. Важно также отметить, что фактор [*PSI⁺*] исчезал при замене *sup35-M5* на *SUP35* (Рис. 2). Таким образом, мы предположили, что две из исследуемых мутаций *sup35^{KK}* приводят к потере приона, две другие — к изменению варианта [*PSI⁺*].

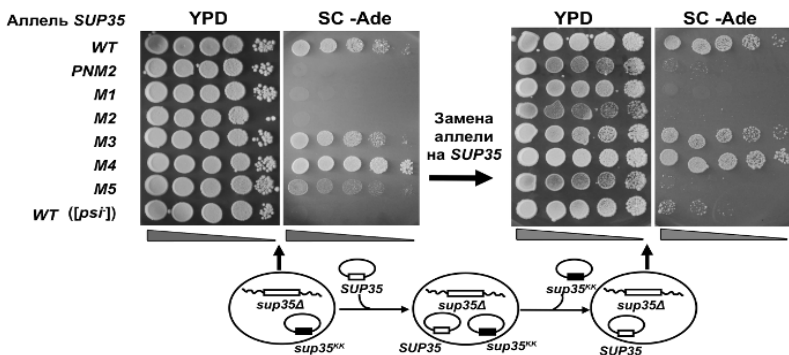


Рисунок 2. Мутации *sup35^{KK}* приводят к потере или изменению свойств приона $[PSI^+]$. Клетки, несущие одну из аллелей, высеяны в серии пятикратных разведений. Под фотографиями представлена схема эксперимента по замене аллелей *SUP35*.

Штаммы $[psi^-]$, несущие только мутантные аллели *SUP35*, имеют красный цвет на $\frac{1}{4}$ YEPD и не могут расти на среде без аденина. Этот факт позволил нам установить, что аллели *sup35^{KK}* не имеют собственного нонсенс-супрессорного фенотипа. Кроме этого, эффекты мутаций *sup35^{KK}* не связаны с изменением содержания белка Sup35 в клетке. Исследуемые мутации не оказывают влияния на функцию и стабильность белка.

В клетках, несущих фактор $[PSI^+]$, Sup35p образует амилоидные агрегаты (Patino et al., 1996; Paushkin et al., 1996; Glover et al., 1997; King et al., 1997). В штаммах, несущих мутации *sup35-M1* и *sup35-M2* и потерявших нонсенс-супрессорный фенотип, отсутствуют и агрегаты Sup35p, что еще раз подтверждает потерю приона. Такое заключение мы сделали на основании результатов электрофорезов клеточных лизатов с помощью методов SDD-AGE (Kryndushkin et al., 2003; Halfmann and Lindquist, 2009) и модифицированного SDS-PAGE (Kushnirov et al., 2006) (Рис. 3).

Для проверки способности мутантных белков включаться в прионные агрегаты Sup35p мы получили штамм $[PSI^+]$, в котором прион поддерживался на фоне химерной конструкции *SUP35*, слитой с фрагментом, кодирующим гемагглютинин (*SUP35-HA*) (Afanasieva et al., 2011). Благодаря различиям мутантных белков и белка дикого типа, слитого с гемагглютинином, по молекулярной массе, мы могли отличать их по электрофоретической подвижности. С помощью модифицированного SDS-PAGE с кипячением геля (Kushnirov et al., 2006) мы показали, что оба мутантных белка способны коагрегировать с белком дикого типа в штамме $[PSI^+]$ (Рис. 4).

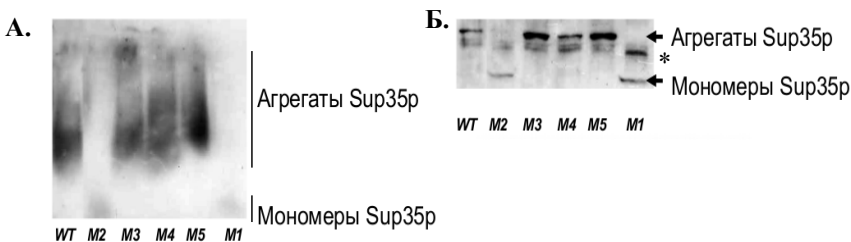


Рисунок 3. Аллели *sup35-M1* и *sup35-M2* приводят к потере агрегатов Sup35p. Наличие агрегатов Sup35p в лизатах клеток, несущих только мутантные аллели *sup35^{KK}*, проверено с помощью SDD-AGE (А) и модифицированного SDS-PAGE (Б). * - неспецифичный сигнал.

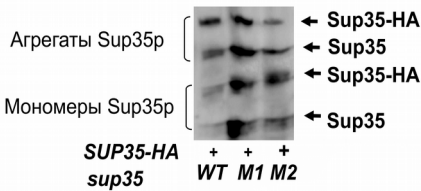


Рисунок 4. Мутантные белки Sup35 M1 и Sup35-M2 могут входить в состав агрегатов Sup35р. Белки из лизатов штаммов $[PSI^+]$, содержащих Sup35-HAр в сочетании с Sup35-M1р или Sup35-M2р, были разделены с помощью модифицированного SDS-PAGE.

Одним из возможных объяснений потери приона $[PSI^+]$ в присутствии $sup35-M1$ или $sup35-M2$ могла быть неспособность соответствующих белков претерпевать прионный переход. Для проверки этого предположения были сконструированы плазмиды, в которых эти мутации находились под контролем индуцибельного галактозного промотора. Штаммы $[psi^-][PIN^+]$, трансформированные этим конструкциями, приобретали нонсенс-супрессорный фенотип после роста на среде с галактозой. Это подтвердило, что исследуемые мутации могут индуцировать появление приона, а потеря фактора $[PSI^+]$ в присутствии мутаций $sup35-M1$ и $sup35-M2$ не связана с неспособностью этих аллелей поддерживать прион.

Для более детального исследования молекулярных механизмов элиминации приона под действием $sup35-M1$ и $sup35-M2$ мы проследили динамику потери $[PSI^+]$ во времени. В присутствии мутации $sup35-M1$ не удалось обнаружить дестабилизации приона. Потерю $[PSI^+]$ в клетках $SUP35/sup35-M2$ наблюдали только в ходе первых 20 клеточных делений. Затем доля клеток с прионом стабилизировалась на уровне примерно 30 % (Рис. 5А), и такое соотношение сохранялось вплоть до 50 поколения. Клоны, сохранившие прион несмотря на присутствие $sup35-M2$, имели одинаковую скорость роста на среде без аденина, но немного отличались по размерам агрегатов Sup35р (Рис. 5Б).

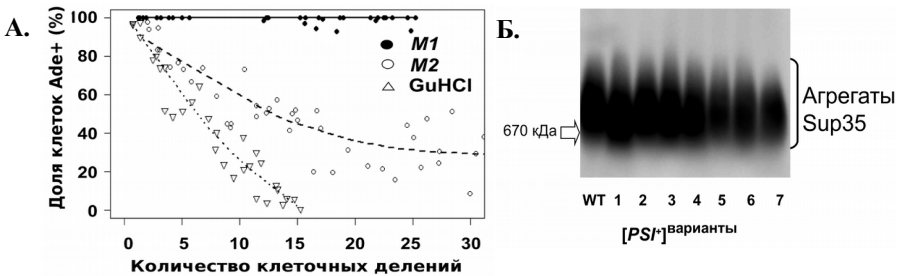


Рисунок 5. Дестабилизация $[PSI^+]$ в присутствии $sup35-M2$ зависит от количества клеточных делений. (А) Зависимость доли клеток с прионом от количества клеточных делений в присутствии мутаций $sup35-M1$ (M1) или $sup35-M2$ (M2), а также 4 мМ ГГХ (использовали в качестве контроля). (Б) Результаты SDD-AGE лизатов, полученных из штаммов с $SUP35$, которые содержали $sup35-M2$, в течение более чем 50 клеточных делений. В качестве маркера молекулярного веса использован тироглобулин (670 кДа).

Штаммы $[PSI^+]$, несущие только аллели $sup35-M4$ или $sup35-M5$, отличаются от контрольного варианта по своему фенотипу (Рис. 2). С помощью специальной тест-системы на основе конструкций с β -галактозидазой осуществили

количественную оценку эффективности нонсенс-супрессии. Для каждого из штаммов измеряли активность β -галактозидазы и рассчитывали относительную эффективность нонсенс-супрессии. Мы обнаружили значимое увеличение этого параметра в штаммах $[PSI^+]$ с *sup35-M4* по сравнению с контрольным вариантом (штамм $[PSI^+]$ с *SUP35*) (Рис. 6). Важно отметить, что эти отличия сохранились и после замены мутации *sup35-M4* на аллель дикого типа. Штаммы $[PSI^+]$ и $[psi^-]$ также достоверно отличались друг от друга по этому параметру. В использованной системе мы не зафиксировали достоверного снижения частоты прочтения стоп-кодонов в штамме $[PSI^+]$ с мутацией *sup35-M5* (Рис. 6).

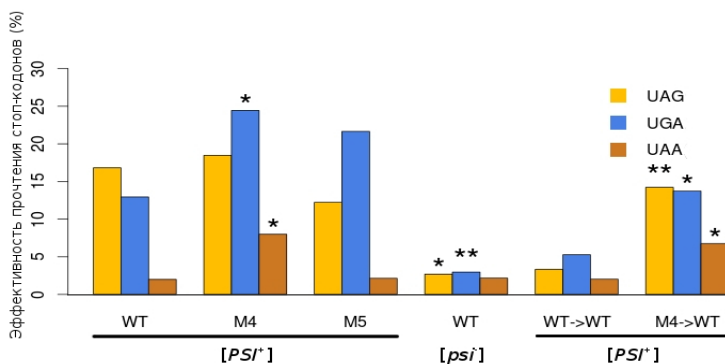


Рисунок 6. Аллель *sup35-M4* приводит к формированию нового варианта приона с более сильной нонсенс-супрессией. Приведены результаты оценки относительной эффективности прочтения стоп-кодонов в штаммах, несущих мутантные аллели *SUP35*, или их производных. Достоверные отличия от штамма $[PSI^+]$ с геном дикого типа (либо до, либо после замены плазмид) отмечены «*» (* – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$; критерий Манна-Уитни). WT → WT и M4 → WT — штаммы $[PSI^+]$, в которых соответствующую аллель *SUP35* (WT или M4) заменили на ген дикого типа.

Эффективность нонсенс-супрессии в присутствии $[PSI^+]$ зависит от количества мономерного Sup35p, что во многом связано с количеством пропагонов в клетке (Tanaka et al., 2006). Мы обнаружили, что только в клетках с *sup35-M5* количество пропагонов достоверно меньше по сравнению с штаммом $[PSI^+]$, несущим аллель дикого типа (Рис. 7). Этот факт хорошо согласуется с ослаблением нонсенс-супрессорного фенотипа этого штамма (Рис. 2).

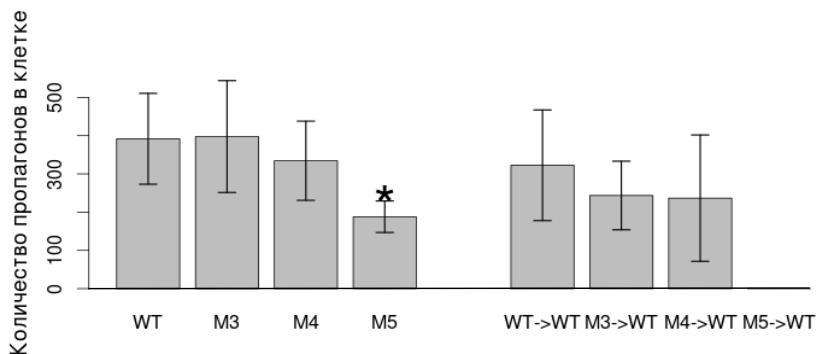


Рисунок 7. Аллель *sup35-M5* приводит к уменьшению числа пропагонов на клетку. Представлено среднее значение количества пропагонов в клетке для штаммов, несущих мутантную аллель, либо их производных. На графиках отложены среднеквадратичные отклонения. Достоверные отличия от штамма [*PSI⁺*] с аллелью дикого типа отмечены «*» ($p < 0,05$; критерий Манна-Уитни).

2. Изучение влияния комбинаций мутантных аллелей *sup35^{KK}* на стабильность приона [*PSI⁺*]

Для изучения эффектов комбинаций аллелей *sup35^{KK}* использовали штаммы [*PSI⁺*], несущие аллели *sup35-M3*, *sup35-M4* и *sup35-M5*, так как они могли поддерживать прион. Эти штаммы трансформировали серией плазмид rRSU2, несущих аллели *sup35-M1* — *sup35-M5*. У полученных трансформантов проверяли способность расти на среде без аденина. Для каждой из комбинаций аллелей было проверено по 16 трансформантов (Табл. 2). Мутантная аллель *sup35-M2* во всех случаях приводила к дестабилизации приона. Такой же эффект был обнаружен для сочетаний *sup35-M4* с *sup35-M3*, или *sup35-M4* с *sup35-M5*, но только у половины трансформантов (Табл. 2). Все остальные комбинации мутаций *sup35^{KK}* не приводили к дестабилизации приона.

Таблица 2. Дестабилизация приона [*PSI⁺*] при сочетании *sup35-M2* или *sup35-M4* с другими аллелями. Указано количество трансформантов с нестабильным [*PSI⁺*]

Вносимая аллель	Аллель, поддерживающая прион		
	<i>sup35-M3</i>	<i>sup35-M4</i>	<i>sup35-M5</i>
<i>sup35-M1</i>	0	0	0
<i>sup35-M2</i>	16	15	16
<i>sup35-M3</i>	0	0	0
<i>sup35-M4</i>	9	0	8
<i>sup35-M5</i>	0	0	0

3. Проверка влияния мутантных аллелей *sup35^{KK}* на различные варианты приона [*PSI⁺*]

Эффекты мутаций, влияющих на стабильность [*PSI⁺*], зачастую являются вариант-специфичными (Derkatch et al., 1999; King, 2001; Lin et al., 2011). В связи с этим мы сравнили влияние мутаций *sup35^{KK}* на стабильность различных вариантов приона. Для этой части работы были выбраны штаммы дрожжей, несущие варианты приона, отличающиеся от варианта, ранее использованного в работе. Эти штаммы трансформировали плазмидами pRSU1, несущими различные аллели *sup35^{KK}*. Для проверки нонсенс-супрессорного фенотипа полученных трансформантов переносили на среду ¼ YEPD. Влияние мутаций *sup35^{KK}* на стабильность приона в большой степени зависело от варианта [*PSI⁺*]. При этом какой-либо корреляции выявить не удалось.

4. Проверка эффектов мутантных аллелей *sup35^{KK}* в зависимости от присутствия приона [*PIN⁺*]

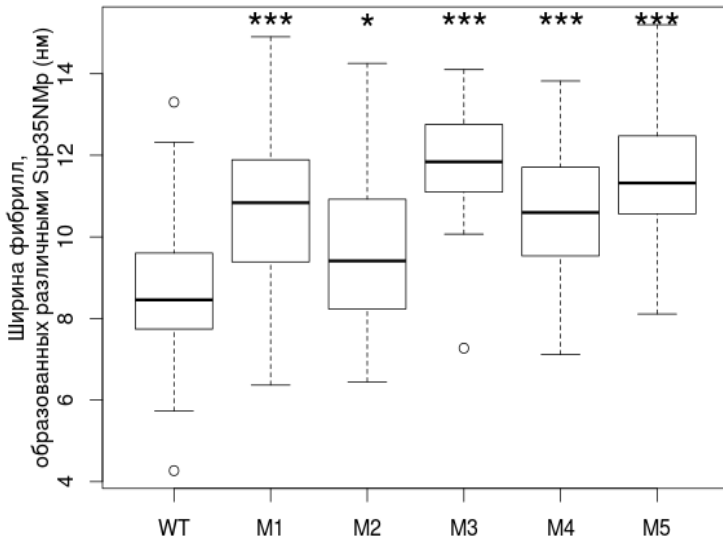
Для того, чтобы проверить, могут ли описанные эффекты мутаций *sup35^{KK}* быть опосредованы присутствием фактора [*PIN⁺*], мы получили производные [*PSI⁺*] и [*psi⁻*] штаммов с делецией гена *RNQ1*. У производных этих штаммов, несущих мутации *sup35^{KK}*, проверяли наличие нонсенс-супрессорного фенотипа. Мы не обнаружили отличий в эффектах исследуемых мутаций между клетками [*PIN⁺*] и [*pin⁻*], это говорит о том, что влияние *sup35^{KK}* на свойства приона [*PSI⁺*] не связано с наличием [*PIN⁺*].

5. Характеристика фибрилл, образованных мутантными белками *in vitro*

Для получения фибрилл, образованных различными вариантами Sup35NMr, соответствующий белок, слитый с шестью остатками гистидина в С-концевой части белка, очищали из клеток *E. coli* в денатурирующих условиях. В ходе эксперимента белок разводили как минимум в 100 раз в 5мМ фосфатном буфере (pH 7,4) с 150 мМ NaCl до конечной концентрации в 5 мкМ. Полученный раствор инкубировали при 25°C и аккуратном перемешивании. Процесс образования агрегатов Sup35NMr отслеживали по уменьшению количества мономерного белка с помощью SDS-PAGE.

Исследование морфологии агрегатов Sup35NMr проводили с помощью просвечивающей электронной микроскопии (микроскоп JEM Jeol-2100 на базе ресурсного центра «Развитие молекулярных и клеточных технологий» СПбГУ). Во всех случаях нам удалось обнаружить фибриллы, образованные Sup35NMr. Затем мы сравнили их линейные характеристики: длину и ширину. Оба этих параметра измеряли по микрофотографиям в программе ImageJ. Результаты сравнения ширины фибрилл, образованных мутантными белками, продемонстрировали, что все они достоверно шире контрольного варианта (белка дикого типа) (Рис. 8). Это доказывает, что исследуемые мутации действительно оказывают влияние на структуру агрегатов Sup35p. Фибриллы Sup35NM-M1p и Sup35NM-M2p короче по сравнению с Sup35NMr, в тоже время белок Sup35NM-M4p образует более длинные фибриллы (Рис. 8)

А.



Б.

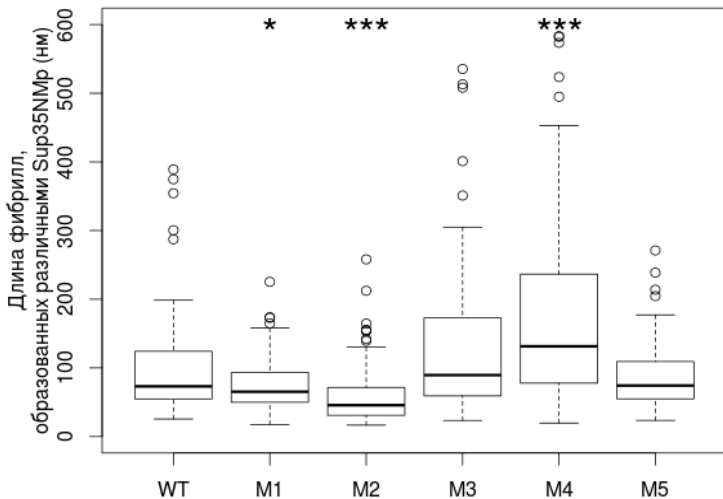


Рисунок 8. Сравнение линейных характеристик фибрилл, образованных различными вариантами Sup35NMr. Представлены распределения по ширине (А) и длине (Б) фибрилл, образованных различными вариантами Sup35NMr. Достоверные отличия по сравнению с белком дикого типа отмечены «*» (* – $p < 0,05$, *** – $p < 0,001$; критерий Манна-Уитни). Прямоугольниками на графике ограничены значения, попадающие между первым и третьим квартилями распределения, линия в середине — медиана распределения. Концы «усов» — края статистически значимой выборки (без выбросов). Выбросы отмечены кружками.

ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе работы мы описали эффекты пяти мутаций, которые содержат двойные замены соседних полярных незаряженных аминокислотных остатков на заряженные. Каждая из мутаций локализуется в одном из пяти олигопептидных повторов N-домена Sup35p. Разработанная система аллелей позволила нам выделить фрагмент белка, вовлеченный в формирование суперскладчатой β -структуры. Мутации, такие как *sup35^{KK}*, в этом регионе приводят к дестабилизации всей структуры и потере фактора $[PSI^+]$. Две из исследованных нами мутаций, *sup35-M1* и *sup35-M2*, обладают таким эффектом при замене аллели *SUP35* дикого типа на *sup35^{KK}* (Рис. 2). Остальные три мутации способны поддерживать прион, но в разной степени меняют его свойства. Мы предположили, что для варианта $[PSI^+]$, исследованного в ходе работы, С-терминальная граница участка, необходимого для поддержания суперскладчатой β -структуры, локализуется между 63 и 69 аминокислотными остатками Sup35p.

Обнаруженные эффекты мутаций *sup35^{KK}* не связаны с изменением стабильности соответствующего белка или с их собственным фенотипическим проявлением. Потеря приона в присутствии *sup35-M1* и *sup35-M2* не связана с неспособностью этих аллелей индуцировать $[PSI^+]$. Кроме этого, мутантные белки могут образовывать агрегаты *in vitro*. Все эти факты свидетельствуют о том, что эффекты мутаций *sup35-M1* и *sup35-M2* связаны именно с их влиянием на структуру агрегатов, результатом которого является потеря $[PSI^+]$.

Факторы $[PSI^+]$ и $[PIN^+]$ связаны друг с другом. Прион $[PIN^+]$ необходим для появления $[PSI^+]$ *de novo* (Derkatch et al., 1997), а точечные мутации или делеции в гене *RNQ1* оказывают влияние на поддержание $[PSI^+]$ (Kurahashi et al., 2009, 2011). Поэтому можно было ожидать, что эффекты *sup35^{KK}* будут зависеть от присутствия $[PIN^+]$, однако подобных закономерностей обнаружено не было.

Важно отметить, что все описанные эффекты *sup35^{KK}* характерны для конкретного варианта $[PSI^+]$. При исследовании других штаммов приона мы обнаружили, что полученные нами мутации оказывают различное влияние на свойства различных вариантов $[PSI^+]$. Это закономерно, поскольку варианты $[PSI^+]$ отличаются по структурной организации агрегатов Sup35p (Toyama et al., 2007; Chang et al., 2008). Известно, что многие мутации в *SUP35*, влияющие на стабильность $[PSI^+]$, являются «вариант-специфичными» (Derkatch et al., 1999; King, 2001).

1. Влияние мутаций *sup35-M1* и *sup35-M2* на стабильность $[PSI^+]$

Полученные данные позволяют предположить несколько причин потери приона $[PSI^+]$ в присутствии мутаций *sup35^{KK}*. Эти предположения основываются на отличиях в эффектах мутаций *sup35-M1* и *sup35-M2*. Из них только мутация *sup35-M2* дестабилизирует прион в присутствии копии гена дикого типа (Рис. 1). С другой стороны, обе эти мутации не могут поддерживать исследованный вариант $[PSI^+]$ (Рис. 2). Об исчезновении приона в этих случаях свидетельствуют необратимая утрата нонсенс-супрессорного фенотипа, которая сохраняется даже после замены мутантной аллели на ген *SUP35* дикого типа (Рис. 2), а также отсутствие агрегатов Sup35p (Рис. 3).

Исчезновение $[PSI^+]$ под действием *sup35-M1*, судя по всему, вызвано неспособностью Sup35-M1p формировать гомоагрегаты, но это характерно только для исследованного варианта приона. В пользу этой гипотезы говорит отсутствие влияния мутации на стабильность $[PSI^+]$ в присутствии аллели дикого типа (Рис. 1), а также то, что при этом Sup35-M1p включается в агрегаты белка дикого типа (Рис. 4). Мы

считаем, что *sup35-M1* поддерживает прион в присутствии *SUP35* только потому, что в составе гетероагрегата молекулы Sup35-M1р чередуются с Sup35р. Иными словами, Sup35-M1р может коагрегировать с Sup35р дикого типа, но не с таким же мутантным белком Sup35-M1 (Рис. 9).

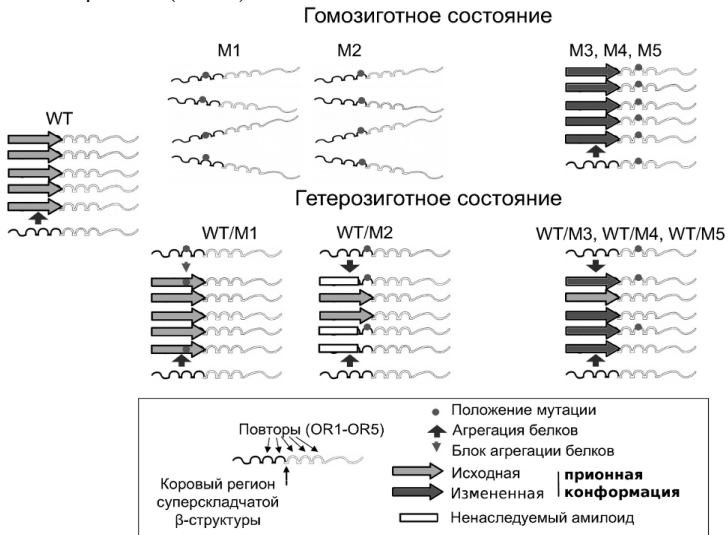


Рисунок 9. Влияние мутаций *sup35^{KK}* на свойства приона $[PSI^+]$.

Мутация *sup35-M2* не может поддерживать исследованный вариант $[PSI^+]$ (Рис. 3) и приводит к дестабилизации приона даже в гетерозиготном состоянии (Рис. 1). Потеря приона при сочетании *sup35-M2* и *SUP35* неполная и составляет порядка 70 %, а эффективность этого процесса зависит от количества клеточных делений (Рис. 5А). Это не связано с ослаблением $[PSI^+]$, поскольку сохранившиеся варианты приона не отличаются по силе нонсенс-супрессорного фенотипа. Мы предполагаем, что только часть прион-формирующего участка Sup35-M2р может связываться с агрегатами белка дикого типа и изменять суперскладчатую β-структуру. Следующая молекула, которая присоединится к такому гетероагрегату, копирует это изменение. Свидетельства таких модификаций удалось выявить при сравнении размеров агрегатов среди клеток $[PSI^+]$, которые потеряли плазмиду с *sup35-M2* (Рис. 5Б). Вероятно, в большинстве случаев это приводит к формированию ненаследуемых амилоидов, что и приводит к исчезновению приона.

2. Влияние мутаций *sup35-M3*, *sup35-M4* и *sup35-M5* на свойства приона $[PSI^+]$

Мутации *sup35-M3*, *sup35-M4* и *sup35-M5* не приводят к потере $[PSI^+]$ (Рис. 2). Это позволяет предположить, что соответствующие аминокислотные замены расположены за пределами региона, необходимого для поддержания суперскладчатой β-структуры. Тем не менее, в их присутствии свойства $[PSI^+]$ изменяются. Мутации *sup35-M4* и *sup35-M5* меняют нонсенс-супрессорный фенотип, вызванный прионом $[PSI^+]$. Штамм $[PSI^+]$, несущий *sup35-M4*, лучше растет на среде без аденина по сравнению с диким типом, а штамм с *sup35-M5*, наоборот, хуже (Рис. 2). Различия в уровне нонсенс-супрессии в присутствии *sup35-M4* также подтверждаются при использовании специализированных методов количественной оценки, в частности, измерения

активности β-галактозидазы (Рис. 6). Мы предположили, что эти две мутации приводят к формированию новых вариантов [*PSI⁺*]. Кроме этого, усиление приона в присутствии *sup35-M4* сохраняется даже после замены мутантной аллели на *SUP35* (Рис. 2,6). В то же время вариант [*PSI⁺*], который сохранился в присутствии мутации *sup35-M5*, отличается от остальных по способности передаваться на аллель *SUP35* дикого типа, он теряется при замене мутации на *SUP35* (Рис. 2).

Количество пропагонов во многом определяет эффективность агрегации Sup35p в клетке [*PSI⁺*], это отражается и на уровне нонсенс-супрессии (Kryndushkin et al., 2003; Tanaka et al., 2006). Среди исследованных нами вариантов [*PSI⁺*] этот параметр был снижен только в клетках с мутацией *sup35-M5* (Рис. 7). Этот факт позволяет предположить, что шапероны клетки, в частности Hsp104p, хуже разрезают агрегаты Sup35-M5p, поэтому новые пропагоны образуются реже. Важно также отметить, что в присутствии *sup35-M4* количество пропагонов не отличается от штамма с аллелью дикого типа (Рис. 7). Поэтому мы считаем, что усиление нонсенс-супрессорного фенотипа в случае этой мутации скорее связано с изменением скорости агрегации Sup35p.

По длине фибрилл, образованных *in vitro*, мы также смогли косвенно оценить скорость агрегации мутантных белков, поскольку в этой системе этот процесс ничем не ограничен. Агрегаты Sup35NM-M4p значительно превосходят по длине контрольный вариант (Sup35NMp) (Рис. 8Б). Исходя из перечисленных результатов, мы считаем, что Sup35-M4p формирует фибриллы, которые с большей скоростью присоединяют мономерный белок.

Мутации *sup35-M3*, *sup35-M4* и *sup35-M5* локализуются за пределами участка, необходимого для поддержания суперскладчатой β-структуры, однако оказывают влияние на свойства приона и, вероятно, приводят к возникновению новых вариантов [*PSI⁺*]. В экспериментах *in vitro* нам удалось зафиксировать различия в структуре фибрилл, образованных мутантными белками Sup35NM, от агрегатов белка дикого типа: все они были шире (Рис. 8А). Рассматриваемые мутации *sup35^{KK}* изменяют укладку белковых молекул в составе агрегатов Sup35p, но не дестабилизируют структуру в целом (Рис. 9).

3. Влияние комбинаций мутаций *sup35^{KK}* на стабильность приона [*PSI⁺*]

Сконструированные нами мутации *sup35^{KK}*, согласно теоретическим предпосылкам, оказывают влияние на стабильность приона [*PSI⁺*] только если они находятся в регионе, образующем суперскладчатую β-структуру. Мутации *sup35-M1*, *sup35-M2*, а также *sup35-M4* оказывают влияние на стабильность приона [*PSI⁺*] сами по себе, или в сочетании с другими аллелями *sup35^{KK}*. Таким образом, мы предполагаем, что в прионных агрегатах белка дикого типа, характерных для исследованного варианта приона, соответствующие повторы участвуют в образовании суперскладчатой β-структуры. При этом только первые два олигопептидных повтора входят в состав региона, необходимого для поддержания суперскладчатой β-структуры, поскольку только *sup35-M1* и *sup35-M2* сами по себе приводят к потере [*PSI⁺*]. Четвертый повтор может участвовать в формировании β-структуры, но не является необходимым для ее поддержания, поскольку мутация *sup35-M4* сама по себе не приводит к потере фактора [*PSI⁺*] и дестабилизирует прион только в сочетании с другими аллелями. Также необходимо уточнить, что в данном случае мы говорим о конформации белка дикого типа, характерной для исходного варианта [*PSI⁺*], до изменения его свойств под влиянием аллелей *sup35^{KK}* (Рис. 10). Мутация *sup35-M3* не

имеет каких-либо эффектов, даже при сочетании с другими аллелями *sup35^{KK}*. Поэтому, следуя той же логике, мы предполагаем, что третий повтор не вовлечен в формирование суперскладчатой β -структуры.

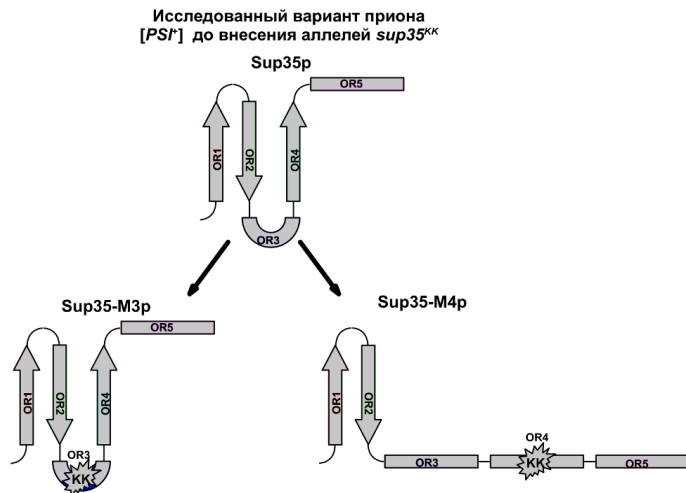


Рисунок 10. Возможные схемы организации β -слоев в исследованных прионных агрегатах. OR – олигопептидные повторы N-домена Sup35p. Стрелками обозначены повторы, предположительно формирующие β -слои.

Внесение аллели *sup35-M4* в штаммы [PSI⁺] с *sup35-M3* или *sup35-M5* приводит к дестабилизации приона (Табл. 2). Эта же мутация усиливает прион, поддерживающийся в присутствии SUP35 дикого типа. Согласно данным литературы данным, сильные варианты приона [PSI⁺] характеризуются менее протяженной β -структурой (Toyama et al., 2007; Chang et al., 2008). Совокупность этих фактов позволяет нам предположить, что четвертый повтор мутантного белка Sup35-M4 не может участвовать в образовании β -структуры (Рис. 10). Это влечет за собой укорочение фрагмента белка, вовлеченного в формирование супер-складчатой β -структуры, и усиление приона.

4. Заключение

В ходе работы мы описали влияние аллелей *sup35^{KK}* на свойства [PSI⁺] и выявили конкретные молекулярные механизмы, лежащие в основе соответствующих эффектов. В зависимости от своего положения мутации приводят либо к потере приона, либо к формированию его новых вариантов. Аминокислотные замены в Sup35-M3p по нашим данным локализованы за пределами региона, участвующего в формировании супер-складчатой β -структуры, поэтому соответствующая аллель имеет минимальное влияние на свойства [PSI⁺]. Белок Sup35-M1 не может образовывать гомоагрегаты на основе исследованного варианта приона, и в этом случае [PSI⁺] сохраняется только благодаря присутствию аллели SUP35 дикого типа. Включение белка Sup35-M2 в агрегаты Sup35p приводит к изменению их структуры, что в большинстве случаев приводит к образованию ненаследуемых амилоидов и потере приона. Аллели *sup35-M1* и *sup35-M2* располагаются в пределах региона, необходимого для

поддержания суперскладчатой β -структуры, поэтому они и приводят к исчезновению [PSI^+]. Мутации в четвертом и пятом олигопептидных повторах приводят к появлению новых вариантов приона. [PSI^+], сохраняющийся в присутствии *sup35-M4*, имеет более короткий участок белка, участвующий в образовании β -структуры, поэтому эффективнее присоединяет мономеры Sup35p. Вариант [PSI^+], образованный Sup35-M5p, характеризуется сниженным количеством пропагонов и поэтому более слабым нонсенс-супрессорным фенотипом. Вероятно, Hsp104p хуже фрагментирует соответствующие белковые агрегаты.

ВЫВОДЫ

1. Мутации, которые расположены в пределах фрагмента белка, вовлеченного в формирование суперскладчатой β -структуры (*sup35-M1* и *sup35-M2*), приводят к потере фактора [PSI^+]. Мутации *sup35-M4* и *sup35-M5* приводят к формированию новых вариантов приона.
2. Первый, второй и четвертый олигопептидные повторы N-домена Sup35p участвуют в образовании суперскладчатой β -структуры.
3. Эффекты мутаций *sup35^{KK}* зависят от варианта приона [PSI^+] и не зависят от [PIN^+]-статуса клетки.
4. Все исследованные мутации *sup35^{KK}* влияют на структуру агрегатов Sup35p *in vitro*.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Бондарев С. А.**, Ширококолобова Е. Д., Трубицина Н. П., Журавлева Г. А. Изменение свойств приона [PSI^+] при комбинировании аминокислотных замен в N-домене белка Sup35 // Молекулярная биология. 2014. – Т. 48, – № 2. – С. 314-328.
2. Zhouravleva G.A., **Bondarev S.A.** Evolution of the translation termination factors // Paleontological Journal. 2013. — Vol. 47, — № 9. — P. 1065-1069.
3. **Bondarev S.A.**, Shchepachev V.V., Kajava A.V., Zhouravleva G.A. Effect of charged residues in the N-domain of Sup35 protein on prion [PSI^+] stability and propagation // Journal of Biological Chemistry. 2013. — Vol. 288, — № 40. — P. 28503-28513.
4. Инге-Вечтомов С.Г., Журавлева Г.А., **Бондарев С.А.** Пространственные матрицы в эволюции и эволюция пространственных матриц // Проблемы эволюции биосферы. Серия «Гео-биологические системы в прошлом». — г. М.: ПИН РАН. — 2013. — С. 48-65.
5. Zhouravleva G., **Bondarev S.** Gene duplication and origin of translation factors // Gene Duplication. — Croatia: InTech. 2011. — 400 pp., 151-172 P.

Тезисы:

1. **Bondarev S.A.**, Shirokolobova E.D., Trubitzina N.P., Zhouravleva G.A. Effects of *sup35^{KK}* alleles on propagation and stability of the yeast prion [PSI^+] and their molecular mechanisms // 26th International Conference on Yeast Genetics and Molecular Biology (Frankfurt/Main, Germany).— 2013. — P. S120.
2. **Bondarev S.A.**, Trubitzina N.P., Shirokolobova E.D., Zhouravleva G.A. Effects of *sup35^{KK}* alleles on propagation and stability of the yeast prion [PSI^+] // CNRS – Jacques Monod Conference "Protein misfolding in disease: molecular processes and translational research toward therapy". — 2013. — P. 43.
3. **Бондарев С.А.**, Трубицина Н.П., Журавлева Г.А. Изучение молекулярных механизмов потери приона [PSI^+] на фоне мутаций в N-домене белка Sup35 // V школа молодых ученых по молекулярной генетике «Непостоянство генома» (Звенигород). — 2012. — С. 15.

4. **Bondarev S.**, Shepatchev V., Kajava A., Zhouravleva G. Influence of mutations at N-domain of Sup35p on propagation and stability of the yeast prion [*PSI⁺*] // 25th International Conference on Yeast Genetics and Molecular Biology (Olsztyn, Poland). — 2011. — P. S126.
5. **Bondarev S.A.**, Shepatchev V.V., Kajava A.V., Zhouravleva G.A. Influence of cryptic mutations at N-domain of Sup35p on propagation and stability of the yeast prion [*PSI⁺*] // Conference “Yeast: an evergreen model system. Tribute to P. Slonimski (Rome, Italy). — 2010. — P. 14.
6. Щепачев В.В., **Бондарев С.А.**, Каява А.В., Инге-Вечтомов С.Г., Журавлева Г.А. Поиск экспериментальных доказательств модели суперскладчатой β -структуры, описывающей строение амилоидной формы белка Sup35 // Сборник тезисов V съезда ВОГиС (Москва). — 2009. — С. 101