

Санкт-Петербургский государственный университет

на правах рукописи

Трубицина Нина Павловна

Изучение механизмов влияния нонсенс-мутаций в гене *SUP35* на свойства приона [*PSI*⁺] у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*

Научная специальность 1.5.7. Генетика

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук, профессор
Журавлева Галина Анатольевна

Санкт-Петербург
2024

Оглавление

| | |
|--|----|
| Введение | 4 |
| Глава 1. Обзор литературы. Терминация трансляции и факторы, модифицирующие ее эффективность, у дрожжей <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 9 |
| 1.1 Общие сведения о процессе трансляции у эукариот..... | 9 |
| 1.2 Терминация трансляции эукариот..... | 10 |
| 1.2.1 Фактор терминации трансляции eRF1 | 11 |
| 1.2.2 Фактор терминации трансляции eRF3 | 13 |
| 1.2.2.1 Белки, с которыми взаимодействует Sup35 | 15 |
| 1.3 Эффективность терминации трансляции..... | 17 |
| 1.3.1 Нонсенс- и миссенс-мутации в гене <i>SUP35</i> | 20 |
| 1.3.2 Прион [<i>PSI</i> ⁺]..... | 23 |
| 1.3.2.1 Возникновение приона [<i>PSI</i> ⁺]..... | 24 |
| 1.3.2.2 Структура агрегатов [<i>PSI</i> ⁺]..... | 25 |
| 1.3.2.3 Варианты приона..... | 28 |
| 1.3.2.4 Факторы, влияющие на поддержание [<i>PSI</i> ⁺] | 29 |
| 1.3.2.5 Мутации в гене <i>SUP35</i> , влияющие на поддержание [<i>PSI</i> ⁺]..... | 31 |
| 1.3.2.6 Жизнеспособность клеток <i>S. cerevisiae</i> в присутствии [<i>PSI</i> ⁺] | 33 |
| 1.4 Заключение | 34 |
| Глава 2. Материалы и методы..... | 36 |
| 2.1 Штаммы | 36 |
| 2.2 Плазмиды..... | 37 |
| 2.3 Среды и методы культивирования | 38 |
| 2.4 Методы генетики дрожжей..... | 39 |
| 2.4.1 Белковая трансформация дрожжей..... | 40 |
| 2.5 Методы работы с ДНК..... | 41 |
| 2.5.1 Электрофорез ДНК в агарозном геле | 41 |
| 2.5.2 ПЦР | 41 |
| 2.5.3 Секвенирование | 42 |
| 2.6 Методы работы с белками | 43 |
| 2.6.1 Выделение и разделение белков в денатурирующих условиях | 43 |
| 2.6.2 Выделение и разделение белков в полуденатурирующих условиях | 43 |
| 2.6.3 Электрофорез белков в полиакриламидном геле с докипячиванием | 45 |
| 2.6.4 Детекция белков с помощью гибридизации с антителами..... | 45 |
| 2.7 Методы микроскопии | 46 |
| 2.8 Анализ данных | 46 |
| Глава 3. Результаты | 47 |
| 3.1 Эффекты нонсенс-мутаций в гене <i>SUP35</i> на жизнеспособность клеток дрожжей..... | 47 |

| | | |
|---------------------------|---|-----|
| 3.1.1 | Характеристика нонсенс-мутаций <i>sup35-n</i> | 47 |
| 3.1.2 | Мутации <i>sup35-n</i> могут приводить к появлению более стабильного и функционально активного белка Sup35 в клетках дрожжей..... | 49 |
| 3.1.3 | Короткие белки Sup35-n стабильны и сохраняются длительное время после блокирования общего синтеза белка в клетке | 51 |
| 3.1.4 | Доминантное проявление мутаций <i>sup35-n</i> | 53 |
| 3.2 | Влияние нонсенс-мутаций в гене <i>SUP35</i> на поддержание приона [<i>PSI</i> ⁺].. | 54 |
| 3.2.1 | Общая схема эксперимента | 54 |
| 3.2.2 | Прион [<i>PSI</i> ⁺] совместим с мутациями <i>sup35-n</i> в присутствии аллеля <i>SUP35</i> дикого типа у гаплоидных и диплоидных штаммов..... | 56 |
| 3.2.3 | Гаплоидные и диплоидные штаммы сохраняют агрегаты приона [<i>PSI</i> ⁺] в присутствии мутаций <i>sup35-n</i> и гена <i>SUP35</i> дикого типа | 58 |
| 3.2.4 | Нонсенс-мутации <i>sup35-21</i> , <i>-74</i> и <i>-218</i> приводят к летальности у гаплоидных штаммов [<i>PSI</i> ⁺]..... | 60 |
| 3.2.5 | Мутация <i>sup35-240</i> приводит к изгнанию приона [<i>PSI</i> ⁺] в гаплоидных штаммах в отсутствие гена <i>SUP35</i> дикого типа..... | 61 |
| 3.2.6 | Несовместимость мутаций <i>sup35-n</i> и приона [<i>PSI</i> ⁺] в диплоидных клетках зависит от метода получения таких клеток | 63 |
| 3.2.7 | Мутации <i>sup35-n</i> изменяют свойства приона [<i>PSI</i> ⁺] в диплоидных штаммах..... | 65 |
| 3.2.8 | Агрегаты белка Sup35 у мутантов <i>sup35-n</i> имеют сниженную инфекционность по сравнению с диким типом | 68 |
| 3.3 | Мутация <i>sup35-240</i> предотвращает поддержание приона [<i>PSI</i> ⁺] в клетке | 70 |
| 3.3.1 | Короткий белок Sup35-240 включается в агрегаты приона [<i>PSI</i> ⁺]..... | 70 |
| 3.3.2 | Увеличение содержания белка Sup35-240 в клетках приводит к дестабилизации приона [<i>PSI</i> ⁺] | 71 |
| 3.3.3 | Дополнительная копия гена <i>SUP35</i> снижает дестабилизирующее воздействие мутации <i>sup35-240</i> на прион [<i>PSI</i> ⁺] | 72 |
| Глава 4. Обсуждение | | 75 |
| 4.1 | Последствия возникновения нонсенс-мутаций в жизненно-важном гене <i>SUP35</i> | 75 |
| 4.2 | Совместимость мутаций <i>sup35-n</i> и приона [<i>PSI</i> ⁺]..... | 78 |
| 4.3 | Мутации <i>sup35-n</i> изменяют свойства приона [<i>PSI</i> ⁺]..... | 82 |
| 4.4 | Аллель <i>sup35-240</i> как новая мутация <i>PNM</i> | 84 |
| 4.5 | Заключение | 85 |
| Выводы..... | | 87 |
| Список сокращений..... | | 88 |
| Список литературы..... | | 89 |
| Благодарности..... | | 116 |

Введение

Актуальность темы исследования. Генетический контроль синтеза белка у дрожжей *S. cerevisiae* имеет длительную историю изучения. В лаборатории физиологической генетики СПбГУ был проведен мутационный анализ ключевых факторов, необходимых для осуществления завершающей стадии этого процесса — терминации трансляции. Нарушение работы факторов eRF1 и eRF3 у дрожжей может проявляться в виде супрессии, поэтому изучение супрессорных мутаций в генах *SUP45* и *SUP35* позволяет получать дополнительную информацию о процессах, происходящих при терминации трансляции. Также остается актуальным вопрос о роли прионов в эукариотической клетке. Исследование посвящено изучению совместимости мутаций в жизненно важном гене *SUP35* и приона [*PSI*⁺].

Степень разработанности темы. Белки Sup45 и Sup35 выполняют функцию факторов терминации трансляции eRF1 и eRF3 у *S. cerevisiae*, соответственно, и работают в комплексе. При недостатке одного из них, или при наличии мутаций в генах *SUP45* и *SUP35*, происходит снижение точности терминации трансляции, что характеризуется появлением нонсенс-супрессорного фенотипа у клеток дрожжей. Аналогичным фенотипом обладают и клетки, содержащие прион [*PSI*⁺], что позволило предположить его роль в процессах регуляции терминации трансляции. Ранее в работе Д.А.Киктева была продемонстрирована синтетическая летальность «сильного» варианта приона [*PSI*⁺] и мутаций в гене *SUP45*. Причиной летальности стало одновременное снижение в клетках белка Sup35 в результате прионизации и функционального белка Sup45 за счет нонсенс-мутаций *sup45*. В этой работе также были исследованы несколько нонсенс-мутаций *sup35*, в результате чего было показано, что несмотря на фенотипическое сходство с *sup45*, протестированные мутации *sup35* в присутствии гена *SUP35* дикого типа поддерживали жизнеспособность клеток с «сильным» и «слабым» вариантом приона [*PSI*⁺].

Целью работы явилось: изучить влияние нонсенс-мутаций *sup35* на жизнеспособность клеток *S. cerevisiae* с сильным вариантом приона [*PSI*⁺].

Для достижения поставленной цели требовалось решить следующие **задачи**:

1. Проверить жизнеспособность гаплоидных и диплоидных штаммов дрожжей, содержащих сильный вариант приона [*PSI*⁺] в сочетании с нонсенс-мутациями *sup35*;
2. Оценить влияние мутаций нонсенс-мутаций *sup35* на свойства приона [*PSI*⁺].

Научная новизна работы. В представленной работе продемонстрировано, что нонсенс-мутации в гене *SUP35* могут способствовать появлению более стабильного и функционально активного белка Sup35 и тем самым повышать жизнеспособность клеток *S. cerevisiae*. Для более детального анализа совместимости нонсенс-мутаций *sup35* и приона [*PSI*⁺] у клеток проводили замещение плазмид, несущих ген *SUP35* дикого типа на плазмиды с мутантными аллелями *sup35*. Впервые было обнаружено, что совместимость нонсенс-мутаций *sup35* и приона [*PSI*⁺] в отсутствие гена *SUP35* дикого типа зависит от того, присутствовала ли мутантная аллель в клетках изначально. Выполнение этого условия зависело от метода совмещения мутаций и приона — трансформации гаплоидных или диплоидных клеток [*psi*⁻], несущих на плазмиде ген *SUP35*, плазмидами с *sup35* или скрещивания штаммов [*psi*⁻] и [*PSI*⁺], несущих аллели *sup35* и *SUP35* соответственно. Кроме того, в работе показано, что изучаемые нонсенс-мутации в гене *SUP35* способны приводить к изменению варианта приона [*PSI*⁺] или к его потере.

Теоретическая и практическая значимость работы. Результаты представленной диссертации углубляют понимание механизмов работы трансляционного аппарата клетки и его регуляции и могут быть использованы в курсах «Частная генетика дрожжей», «Генетический контроль трансляции» и «Прионы», преподаваемых на кафедре генетики и биотехнологии биологического факультета СПбГУ, а также аналогичных курсах других учебных заведений.

Методология и методы исследования. В работе применяли подходы, традиционно используемые в генетике дрожжей, методы молекулярной биологии и микроскопии. В качестве модельного организма использовали пекарские дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*.

Степень достоверности и апробация результатов. Основные результаты диссертационной работы были доложены и обсуждены на 6 международных конференциях:

1. VI съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров (ВОГиС) и ассоциированные генетические симпозиумы (Ростов-на-Дону, 2014).
2. Protein misfolding in disease — Toxic aggregation-prone proteins in aging and age-related diseases: from structure to pathology and spreading (Роскоф, Франция, 2016).
3. The 43th FEBS congress (Прага, Чехия, 2018).
4. VI Съезд биохимиков России. IX Российский симпозиум «Белки и пептиды» (Сочи, 2019).
5. Международный конгресс «VII съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров, посвященный 100-летию кафедры генетики СПбГУ, и ассоциированные симпозиумы» (Санкт-Петербург, 2019).
6. EMBO Workshop Protein quality control. From mechanisms to disease (Майорка, Испания, 2019).

Публикации. Основные результаты по теме диссертации представлены в следующих статьях, опубликованных в рецензируемых изданиях, входящих в Перечень ВАК и приравненных к ним иностранных изданиях:

1. **Trubitsina, N. P.** From past to future: Suppressor mutations in yeast genes encoding translation termination factors / N. P. Trubitsina, O. M. Zemlyanko, S. E. Moskalenko, G. A. Zhouravleva // Biol Commun. — 2019. — Vol. 64(2). — P. 89-109.

2. **Trubitsina, N. P.** Nonsense mutations in the yeast *SUP35* gene affect the [*PSI*⁺] prion propagation / N. P. Trubitsina, O. M. Zemlyanko, S. A. Bondarev, G. A. Zhouravleva // *Int J Mol Sci.* — 2020. — Vol. 21(5). — P. 1648.
3. Zhouravleva G. A. How big is the yeast prion universe? / G. A. Zhouravleva, S. A. Bondarev, **N. P. Trubitsina** // *Int J Mol Sci.* — 2023. — Vol. 24(14). — P. 11651.

Основные научные результаты. В диссертационной работе представлены основные научные результаты исследования в виде публикации трех научных работ, выполненных соискателем в соавторстве.

1. В обзорной статье «From past to future: Suppressor mutations in yeast genes encoding translation termination factors» [216], опубликованной в *Biol. Commun. (Scopus)* в соавторстве с О.М. Землянко, С.Е. Москаленко, Г.А. Журавлевой обобщены литературные данные, а также результаты, полученные в лаборатории физиологической генетики СПбГУ о супрессорных мутациях в генах *SUP45* и *SUP35*.
2. В обзорной статье «How big is the yeast prion universe?» [245], опубликованной в *Int. J. Mol. Sci. (Scopus, Web of Science Core Collection)* в соавторстве с С.А. Бондаревым, Г.А. Журавлевой дан детальный обзор всех известных дрожжевых прионов и рассмотрены различные подходы, используемые для их идентификации. Обсуждены перспективы открытия новых дрожжевых прионов.
3. Одной из основополагающих публикаций исследователя является статья «Nonsense mutations in the yeast *SUP35* gene affect the [*PSI*⁺] prion propagation» [216] опубликованная в соавторстве с О.М. Землянко, С.А. Бондаревым, Г.А. Журавлевой в *Int. J. Mol. Sci. (Scopus, Web of Science Core Collection)*. В данной научной работе опубликованы основные результаты исследования, освещенные в диссертационной работе.

Во всех трех научных работах соискатель внес персональный вклад в виде разработки дизайна исследования, сбора экспериментального материала,

статистической обработки полученных данных, подготовки таблиц и рисунков и написания текста.

Основные положения, выносимые на защиту.

1. При трансляции транскрипта, содержащего преждевременный стоп-кодон в гене *SUP35*, в результате нонсенс-супрессии, возникающей из-за уменьшения содержания белка Sup35, может происходить подстановка ошибочной аминокислоты вместо стоп-кодона, в результате которого синтезируется полноразмерный белок Sup35, превосходящий по своим свойствам белок дикого типа.
2. Жизнеспособность клеток *S. cerevisiae* при совмещении в них нонсенс-мутаций в гене *SUP35* и приона [*PSI*⁺] зависит от того, прошли ли они до этого адаптацию в присутствии только мутантных аллелей *sup35*.
3. Нонсенс-мутации в гене *SUP35* могут приводить к изменению свойств или потере приона [*PSI*⁺] за счет образования укороченных белков Sup35, которые включаются в агрегаты предсуществующего приона, а также из-за снижения количества полноразмерного белка Sup35 в клетке.

Объём и структура работы. Диссертация состоит из введения, 4 глав, выводов и списка литературы. Полный объём диссертации составляет **116** страниц с **25** рисунками и **5** таблицами. Список литературы содержит **245** наименования.

Глава 1. Обзор литературы. Терминация трансляции и факторы, модифицирующие ее эффективность, у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*

1.1 Общие сведения о процессе трансляции у эукариот

Трансляция или синтез полипептидной цепи на матрице мРНК — это матричный процесс, который у эукариот включает четыре этапа: инициацию, элонгацию, терминацию и рециклинг. Во время инициации происходит сборка рибосомного комплекса, который состоит из большой и малой рибосомной субъединиц, мРНК, инициаторной метионил-тРНК и факторов инициации трансляции (eIFs) (Рисунок 1). У собранной 80S рибосомы выделяют три сайта: А (aminoacyl) — связывает поступающую аминоксил-тРНК (aa-тРНК), Р (peptidyl) — пептидилтрансферазный или каталитический центр рибосомы, принимает пептидил-тРНК во время элонгации и Е (exit) — участок для деацилированной тРНК. По окончании инициации трансляции на старт-кодоне AUG располагается антикодон инициаторной метионил-тРНК, занимающей Р-сайт рибосомы. Во время элонгации трансляции в А-сайт рибосомы поступают aa-тРНК. В случае совпадения антикодона aa-тРНК и кодона мРНК рибосома при участии факторов элонгации (eEFs) катализирует присоединение аминокислотного остатка (а.к.о.) к растущему полипептиду и сдвигается на следующий кодон мРНК, освобождая А-сайт для следующей aa-тРНК. По окончании открытой рамки считывания (ОРС) в рибосому поступает стоп-кодон, и синтезированный полипептид отделяется от пептидил-тРНК при участии факторов терминации трансляции (eRFs). На заключительном этапе происходит рециклирование рибосомы. Ключевой участник рециклинга – белковый фактор из семейства ABCE1 (ATP-binding cassette subfamily E member 1) способствует диссоциации субъединиц рибосомы от мРНК и высвобождению деацилированной тРНК (см. обзор [191]).

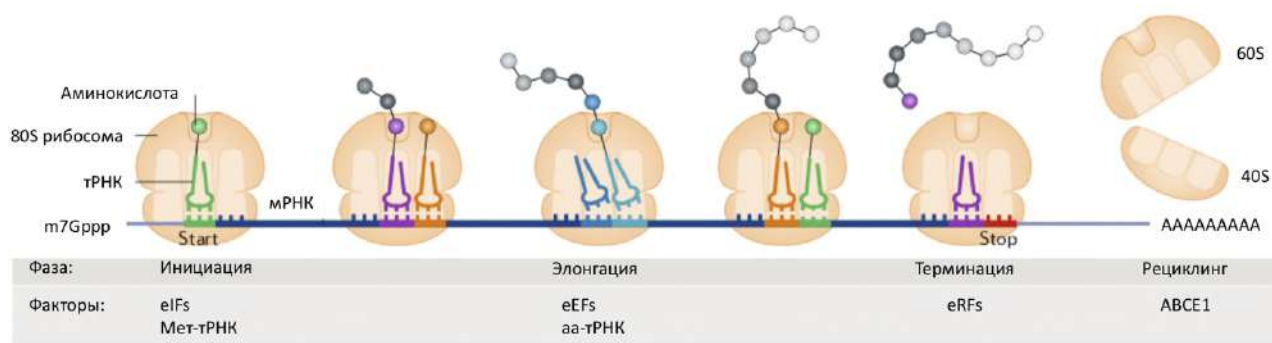


Рисунок 1. Схема процесса трансляции у эукариот. На схеме изображены этапы трансляции: инициация, элонгация, терминация и рециклинг. Внизу схемы указаны факторы, участвующие в этих этапах (модифицировано из [191]).

Далее в обзоре более подробно будут рассмотрены основные белки, участвующие в терминации трансляции у эукариот и факторы, влияющие на ее эффективность.

1.2 Терминация трансляции эукариот

Для осуществления терминации трансляции у эукариот требуется белковый фактор eRF1, который распознает все три стоп-кодона: UAA, UAG и UGA [78]. Фактор eRF1 связывается с рибосомой в комплексе с трансляционной ГТФазой eRF3 (Рисунок 2) [76, 203, 242]. Взаимодействие eRF1 и eRF3 возможно исключительно в том случае, если eRF3 ассоциирован с ГТФ [121]. В ГТФ-связанной форме он удерживает eRF1 в неактивной конформации, которая предотвращает взаимодействие М-домена eRF1 с каталитическим центром рибосомы [91, 195]. После того как eRF1 распознает стоп-кодон, eRF3 гидролизует ГТФ и покидает рибосому, высвобождая М-домен eRF1 для размещения в каталитическом центре рибосомы [91]. Для активации ГТФазной активности eRF3 требуется соединение комплекса с поли(А)-связывающими белками (PABP), располагающимися с 3'-конца мРНК [220] (Рисунок 2). Мотив GGQ eRF1 стимулирует гидролиз сложноэфирной связи пептидил-тРНК в каталитическом центре рибосомы, тем самым высвобождая образующийся полипептид из рибосомы [79]. Следует отметить, что фактор eRF1 способен с низкой эффективностью осуществлять терминацию трансляции и в отсутствие eRF3, как это было продемонстрировано *in vitro* [6, 71].

Доставку eRF1 к рибосоме осуществляет геликаза Dbp5/DDX19. Если ее функция нарушена, фактор eRF1 преждевременно взаимодействует с eRF3, что приводит к нарушению процесса терминации трансляции. Тогда близкородственные («near-cognate») тРНК проникают в А-сайт рибосомы и распознают стоп-кодон как значимый [13, 86, 156].

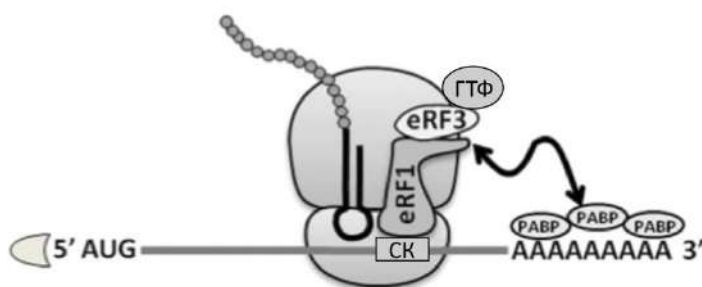


Рисунок 2. Схема терминации трансляции у эукариот. СК — стоп-кодон; PABP — поли-А связывающий белок; eRF1 и eRF3 — факторы терминации трансляции (модифицировано из [48]).

После терминации трансляции eRF1 остается связанным с рибосомой и высвобождается в процессе рециклинга, который осуществляет АТФаза Rli1 из семейства ABCЕ1 [111, 177, 197]. Для более ясного понимания процесса терминации трансляции у эукариот необходимо иметь представление об его основных участниках — eRF1 и eRF3, а также о факторах, влияющих на эффективность этого процесса.

1.2.1 Фактор терминации трансляции eRF1

Аминокислотная последовательность eRF1 высоко консервативна [78], хотя у некоторых организмов имеется несколько паралогов eRF1, которые могут отличаться по специфичности распознавания разных стоп-кодонов [8, 34, 116, 117, 139]. У дрожжей *S. cerevisiae* белок Sup45 кодируется жизненно важным геном *SUP45* [25]. Sup45 состоит из трех доменов: N, M и C (Рисунок 3), выполняющих различные функции, необходимые для процесса терминации трансляции. Данные рентреструктурного анализа факторов eRF1 человека и *Schizosaccharomyces pombe* показали, что по трехмерному строению eRF1

напоминает молекулу тРНК [35, 201]. Структурные данные подтвердили универсальность гипотезы молекулярной мимикрии, предложенной для прокариотических факторов терминации трансляции [100].

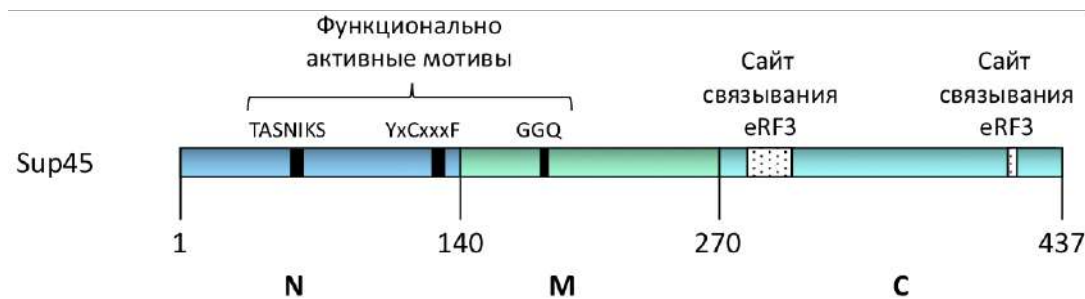


Рисунок 3. Схема белка Sup45. N, M, C — домены Sup45. Цифрами внизу показаны их границы в аминокислотной последовательности белка. Отмечены мотивы, необходимые для функционирования Sup45 в процессе терминации трансляции и сайты связывания eRF3.

Строение, сходное с тРНК, позволяет фактору eRF1 эффективно конкурировать за связывание с А-сайтом рибосомы и выполнять свои функции. За распознавание стоп-кодонов отвечают последовательности, располагающиеся в пределах N-домена: структурный мотив NIKS (Asn-Ile-Lys-Ser) и несколько других консервативных элементов, включая мотивы GTS (Gly-Thr-Ser) и YxCxxxF [35, 71, 77, 182, 183, 201]. С использованием криоэлектронной микроскопии и каталитически неактивного eRF1 было показано, что глутаминовая кислота в положении 55 и тирозин в положении 125 eRF1 способствуют распознаванию пуринов и пиримидинов во втором и третьем положениях кодона [26]. Таким образом, они играют решающую роль в декодировании стоп-кодонов фактором eRF1. Гидролиз пептидил-тРНК осуществляется за счет мотива GGQ (Gly-Gly-Gln) в центральном M-домене eRF1, который после декодирования стоп-кодона располагается в пептидил-трансферазном центре рибосомы [79, 192]. Как и тРНК [187], eRF1 работает в паре с ГТФазой, в данном случае белком eRF3 [79]. С-концевой участок eRF1, содержащий аминокислотную последовательность GFGGIG(G/A)XLRY, отвечает за связывание фактора eRF1 с eRF3 [69, 155].

1.2.2 Фактор терминации трансляции eRF3

Факторы eRF3 большинства эукариот, за исключением некоторых простейших, имеют трехдоменную структуру (см. обзор [98]). У дрожжей *S. cerevisiae* фактор eRF3 кодируется геном *SUP35* [203, 242], который является жизненно важным [115, 128, 237]. По своей пространственной организации и выполняемой функции в терминации трансляции белок Sup35 *S. cerevisiae* близок к эукариотическим и прокариотическим факторам элонгации eEF1A и EFTu, соответственно [124]. Необходимость присутствия фактора eRF3 в процессе терминации трансляции обуславливается его ГТФазной активностью, при помощи которой происходит стимуляция работы фактора eRF1. Кроме того показано, что eRF3 может быть задействован при диссоциации eRF1 от рибосомы после высвобождения синтезированного полипептида, что особенно критичным становится, когда концентрация eRF1 в клетке снижена [70].

ОРС гена *SUP35* состоит из 2055 пар нуклеотидов (п.о.) и кодирует белок Sup35 длиной 685 аминокислотных остатков (а.к.о.) Аминокислотная последовательность содержит три остатка метионина в положениях 1, 124 и 254 (ATG-кодоны), по которым ее условно можно разделить на три домена — N, M и C (Рисунок 4) [128]. При помощи гибридизации ДНК гена *SUP35* с тотальной РНК, выделенной из дрожжевых клеток, были выявлены два транскрипта: основной (2,3 тысяч пар нуклеотидов (т.п.н.)), соответствующий всему гену *SUP35*, и минорный транскрипт (1,4 т.п.н.), который соответствует 3'-концевому сайту гена, кодирующего C-домен белка Sup35 [206].

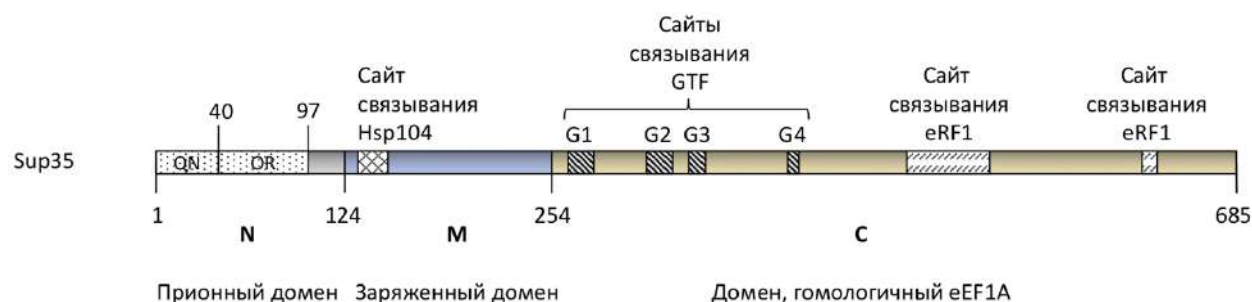


Рисунок 4. Схема белка Sup35. N, M, C — домены Sup35. Цифрами внизу показаны их границы в аминокислотной последовательности белка. Отмечены субдомены в N-доме: QN — участок богатый а.к.о. глутамина и аспарагина, OR — участок олигопептидных повторов.

Также отмечены сайты связывания шаперона Hsp104, участки, необходимые для связывания ГТФ и фактора eRF1.

Делеционный анализ показал, что именно С-домен нужен для поддержания жизнеспособности клеток *S. cerevisiae*. Кроме того, доказано, что он необходим и достаточен для эффективной терминации трансляции [213]. С-домен белка Sup35 содержит сайты связывания ГТФ [94, 127] и участки, вовлеченные во взаимодействие с фактором eRF1 [65, 101, 155, 174].

Показано, что N-домен дрожжевого Sup35 не является существенным для жизнедеятельности клетки [213]. Он отвечает за возможность прионизации Sup35 с образованием детерминанта [*PSI*⁺] [53, 173, 212]. Известно, что N-домен в составе участка NM Sup35 специфически взаимодействует с поли(А)-связывающим белком (Pab1/PABP) [42] и РНК-связывающим белком Pub1 (его человеческим гомологом Tia1), который участвует в формировании стрессовых гранул [222].

В N-домене можно условно выделить два субдомена: область, богатую Q и N, располагающуюся в пределах а.к.о. 1–40, и область олигопептидных повторов (а.к.о. 41–97) (OR), которая содержит пять полных PQGGYQ(Q)QYN повторов из девяти аминокислот и один неполный повтор, содержащий четыре аминокислоты PQGG [128]. N-домен факторов семейства eRF3 высоко вариабелен, его аминокислотная последовательность отличается даже у близких видов. У ряда близких к *S. cerevisiae* видов грибов N-конец белка eRF3 имеет сходную с белком сахаромицетов структуру: он обогащен остатками глутамина, аспарагина, тирозина и глицина, а также содержит OR различного состава. При этом Q/N-богатые участки и участки OR демонстрируют наименьшую степень вариабельности по сравнению с другими участками N-домена (см. обзор [243]). С помощью химерных конструкций, содержащих С-домен Sup35 *S. cerevisiae* и N-домен белков-ортологов, была показана прионизация Sup35 *Pichia methanolica*, *Candida albicans*, *Candida maltosa*, *Kluyveromyces lactis*, *Debaryomyces hansenii*, *Yarrowia lipolytica* и *Zygosaccharomyces rouxii* в клетках *S. cerevisiae* [92, 129, 161, 186].

Последовательность М-домена обогащена заряженными а.к.о. Он служит линкером между N и С-доменами белка Sup35 и имеет сайт связывания с шапероном Hsp104 (а.к.о. 129-148), что является необходимым для поддержания приона [*PSI*⁺] [92].

Кроме того, недавно были опубликованы данные, подтверждающие участие белка Sup35 в разделении фаз в клетке в ответ на стресс. Было показано, что кислые а.к.о. в М-домене важны для образования белком Sup35 временных конденсатов в ответ на голод и изменение pH, поскольку замена этих кислых а.к.о. на полярные снижает способность Sup35 реагировать на стресс. Предполагается, что М-домен служит в качестве сенсора, а N-домен, по-видимому, усиливает способность Sup35 входить в конденсаты [74]. Можно провести некоторую аналогию между белковыми конденсатами, содержащими неприонные агрегаты белка Sup35 и стресс гранулами, а также Р-тельцами, поскольку несмотря на различную организацию, они являются временными немембранными образованиями, которые возникают в клетке в ответ на стресс.

1.2.2.1 Белки, с которыми взаимодействует Sup35

Белок Sup35 взаимодействует не только с Sup45, но и со многими другими белками, участвующими в контроле эффективности терминации трансляции и в других различных клеточных метаболических процессах, таких как транспорт мРНК из ядра в цитоплазму (Dbp5/DDX19 и Gle1), рециклинг рибосом (Rli1/ABCE1) (см. выше), деградация мРНК (белки Upf) и инициация трансляции (Pab1/PABP) [42, 95].

Белки Upf1, Upf2 и Upf3 являются ключевыми факторами, контролирующими NMD [46, 137, 138]. NMD — процесс, в результате которого разрушается мРНК, содержащая преждевременные стоп-кодона. Такие кодоны могут появляться в результате нонсенс-мутаций, неточного или неэффективного сплайсинга пре-мРНК или неправильного редактирования РНК. Upf1 является главным эффектором NMD, а факторы Upf2 и Upf3 регулируют его функцию [33]. Они взаимодействуют между собой, а также с рибосомой, другими белками NMD

и факторами терминации трансляции. Upf1 связывается с eRF1 и eRF3 и вовлечен в процесс терминации трансляции и высвобождения рибосом на преждевременных стоп-кодонах [193]. Факторы eRF1 и eRF3, связываясь с Upf1, ингибируют его АТФазную активность [47]. Белки Upf2 и Upf3 взаимодействуют только с фактором eRF3 [229]. Они конкурируют с Upf1 за связывание с eRF3 [29]. Факторы NMD, как и eRF1 взаимодействуют с С-доменом eRF3. Upf1 связывается с его первой половиной (а.к.о. 254–465), в то время как Upf2 и Upf3 взаимодействуют со второй половиной eRF3 (а.к.о. 465–685) ([229], см. обзор [244]).

Белки PABP связываются с поли(А)-«хвостом» мРНК и являются одними из основных участников регуляции жизненного цикла мРНК. По локализации в клетке их разделяют на ядерные и цитоплазматические. У дрожжей есть только один ген, который кодирует цитоплазматический PABP (Pab1 у *S.cerevisiae*), в то время как в клетках млекопитающих их идентифицировано несколько [148]. Белок eRF3 дрожжей посредством доменов NM напрямую взаимодействуют с L- и С-доменами Pab1 [42, 181]. Предполагается, что ассоциация eRF3-PABP способствует эффективной терминации трансляции [42], связывает ее с различными путями распада мРНК [80] и защищает мРНК от NMD [110]. Показано, что связь между PABP и eRF3 поддерживает базальный уровень нонсенс-супрессии и негативно регулирует терминацию трансляции [181]. Сверхпродукция белка Pab1 повышает эффективность терминации трансляции у дрожжей [42], а делеция гена *PABPC1* в клетках человека приводит к прочтению преждевременных стоп-кодонов [102]. Отмечают, что Pab1 может влиять на взаимодействие eRF1 с eRF3, на ГТФазную активность eRF3, а также не исключается воздействие комплекса Pab1-eRF3 на пост-терминационные процессы, такие как рециклинг [12, 181].

На причастность факторов eRF1 и eRF3 к различным клеточным процессам помимо синтеза белка указывает наличие плейотропных эффектов мутаций в генах *SUP45* и *SUP35*, таких как чувствительность к пониженной и повышенной температуре, повышенному осмотическому давлению, полная или частичная

неспособность к дыханию (см. обзор [98]). Кроме того, такие мутанты характеризуются сверхчувствительностью к беномилу, агенту, который деполимеризует микротрубочки, что предполагает участие факторов трансляции в контроле клеточных процессов, опосредованных микротрубочками, например, сегрегации хромосом в процессе деления клетки [21, 214].

Одной из возможных функций белка Sup35 является его взаимодействие с актиновым аппаратом клетки. С-терминальный домен белка Sup35 имеет структурное сходство с фактором элонгации eEF1A [68, 124, 128, 160]. Поскольку eEF1A участвует в организации цитоскелета [68], то и белок Sup35 может быть вовлечен в этот процесс. Кроме того, при репрессии гена *SUP35* у клеток отмечается увеличенный размер и нарушение актинового цитоскелета [224]. Также есть свидетельства взаимодействия Sup35 с такими белками актинового цитоскелета, как Sla1 [10] и Mlc1 [223].

1.3 Эффективность терминации трансляции

Процесс терминации трансляции белка осуществляется не со 100%-ной точностью. Существуют естественные механизмы, которые могут влиять на его эффективность путем специфической регуляции. Один таких механизмов — это прочтение терминирующих кодонов как значащих или нонсенс-супрессия (Рисунок 5). В этом случае рибосома считывает стоп-кодон как значащий и продолжает синтез белка до следующего стоп-кодона в той же рамке считывания. При этом нонсенс-супрессия может быть не только ошибкой декодирования, но и средством продукции различных изоформ белка. Можно выделить три типа декодирования стоп-кодонов: незапрограммированное, запрограммированное и индуцированное (см. обзор [170]). Прочтение любого физиологического стоп-кодона или ПСК (преждевременный стоп-кодон) может происходить на базальном уровне в отсутствие каких-либо дополнительных эффекторов. Незапрограммированная нонсенс-супрессия возможна в случае, если мРНК с ПСК не устраняется NMD [133]. Этот тип прочтения является редким событием: чуть более 80% нонсенс-мутаций имеют уровень прочтения не более 0,1% [72, 73, 179].

Запрограммированное прочтение стоп-кодонов как значащих нацелено на определенные мРНК [62, 75, 146] и представляет собой механизм расширения протеома, позволяющий синтезировать определенные изоформы белка. Порядка 5% генов дрожжей подвергаются запрограммированной нонсенс-супрессии [120].

Индукцированное декодирование стоп-кодонов опосредуют специфические молекулы. Когда рибосома достигает стоп-кодона, присутствие таких молекул способствует рекрутированию близкородственной тРНК вместо факторов терминации трансляции. В ранних исследованиях было показано, что аминокликозиды, например, паромомицин облегчают этот тип процесса считывания у бактерий и дрожжей [199]. Такие молекулы потенциально могут быть использованы для лечения патологий, связанных с нонсенс-мутациями.

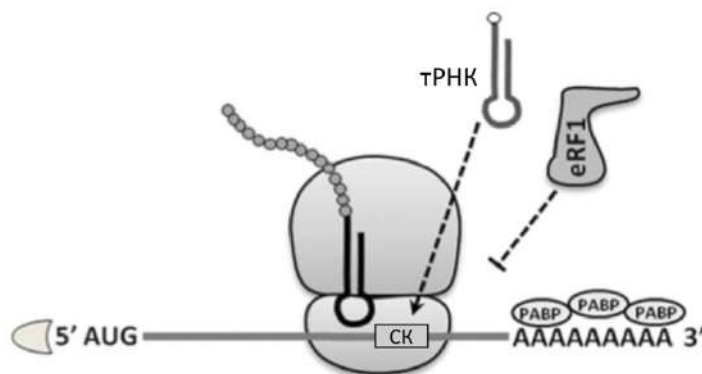


Рисунок 5. Принцип декодирования стоп-кодона (нонсенс-супрессии). «Прочтение» стоп-кодона происходит по принципу неоднозначного соответствия. Супрессорная тРНК, успешно конкурируя с фактором eRF1, взаимодействуют со стоп-кодом в нарушение канонических правил спаривания нуклеотидов. СК — стоп-кодон; PABP — поли-А связывающий белок; eRF1 и eRF3 — факторы терминации трансляции (модифицировано из [48]).

На эффективность считывания стоп-кодона как значащего во всех трех случаях могут влиять различные факторы, включая тип стоп-кодона и окружающей его нуклеотидной последовательности [15, 96].

Несмотря на то, что фактор eRF1 в отличие от прокариотических факторов RF1/RF2 распознает все три стоп-кодона, завершение синтеза белка на них происходит с разной эффективностью. Эксперименты на клетках млекопитающих показали, что кодон UGA имеет наибольший потенциал быть прочитанным супрессорной тРНК как значащий, супрессия же кодона UAG случается реже, а UAA является самым надежным стоп-кодом с точки зрения терминации

трансляции [15, 96, 145, 149]. Однако эти свойства могут быть изменены нуклеотидным контекстом стоп-кодона [19, 28, 153]. Наиболее сильное влияние оказывает нуклеотид, расположенный сразу за стоп-кодоном (+4, при условии, что первый нуклеотид стоп-кодона обозначен как +1) [153, 175, 200, 210]. Похоже, что пурин в этом положении, присутствующий примерно в 90 % наиболее высоко экспрессируемых генов человека, способствует более эффективной терминации трансляции [211], тогда как пиримидин способствует нонсенс-супрессии [27, 153, 210]. В связи с этим появилась теория, что сигналом к терминации является последовательность из четырех нуклеотидов [27, 211]. Криоэлектронная микроскопия рибосомного комплекса 80S с eRF1 показала, что в процессе терминации трансляции нуклеотиды +4 и +5 стыкуются с парами оснований рРНК G626 и C1698, соответственно, тем самым происходит стабилизация комплекса при распознавании стоп-кодона [26, 150, 195]. Показано также, что некоторые нуклеотиды ниже по течению от стоп-кодона могут способствовать нонсенс-супрессии. Например, позиции с +6 по +9 являются существенными для регуляции работы терминационного комплекса [45].

Нуклеотидный состав с 5'-стороны от стоп-кодона также имеет влияние на эффективность терминации трансляции, однако по сравнению с 3'-контекстом, оно представляется менее значимым [136]. Эксперименты на дрожжах показали, что присутствие аденина в позициях -1 и -2 относительно стоп-кодона, стимулирует нонсенс-супрессию UAG и также, вероятно, остальных стоп-кодонов. Это соответствует наблюдению, что аденины с 5'-стороны от стоп-кодона эволюционно консервативны в генах, регуляция которых осуществляется за счет нонсенс-супрессии [19, 215].

Белки, РНК, малые молекулы и окружение клетки также влияют на частоту декодирования стоп-кодонов (см. обзор [170]). Например, при нарушении функции белка Dbr5/DDX19 снижается эффективность терминации трансляции (см. выше) [13, 86, 156].

Нарушение функций факторов eRF1 и eRF3 может также проявляться в виде эффекта нонсенс-супрессии. Полная инактивация (дизрупция) генов *SUP45*

или *SUP35 S. cerevisiae* обладает летальным эффектом [25, 93, 115, 128, 237]. Тем не менее получен ряд мутаций в этих генах, и их изучение имеет долгую историю. Основу заложили исследования в нашей лаборатории, где впервые были получены рецессивные мутации *sup45* и *sup35*, названные изначально как s1 и s2 соответственно [2]. Изучение природы мутаций *sup45* и *sup35* показало, что значительная часть их — это миссенс-мутации, которые располагаются в функциональных доменах факторов eRF1 и eRF3 ([4, 23, 159], см. обзор [216]).

Раскрытие механизмов регуляции терминации трансляции напрямую связано с изучением супрессорных мутаций в генах *SUP45* или *SUP35*. Ниже подробнее будут рассмотрены эффекты, возникающие при частичной инактивации гена *SUP35* или прионизации белка Sup35.

1.3.1 Нонсенс- и миссенс-мутации в гене *SUP35*

Ранее считалось, что нонсенс-мутанты по генам *SUP45* и *SUP35* нежизнеспособны в отсутствие дополнительных нонсенс-супрессоров ([204], см. обзор [216]). Тем не менее в нашей лаборатории было сначала получено 5 нонсенс-мутаций в гене *SUP45* (*sup45-n*), и затем 11 нонсенс-мутаций в гене *SUP35* (*sup35-n*) (их отбор шел параллельно с миссенс-мутациями *sup45-m* и *sup35-m*), которые приводят к возникновению преждевременного стоп-кодона в рамке считывания кодирующей последовательности [30, 159] (Рисунок 6).

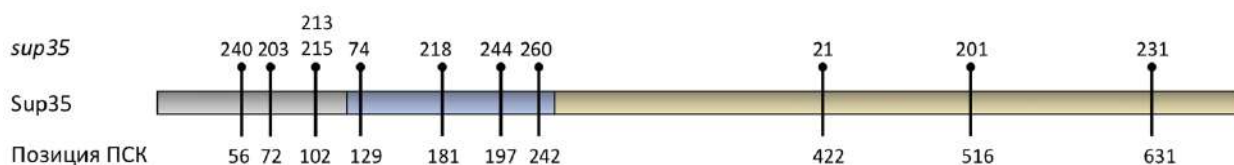


Рисунок 6. Нонсенс-мутации в гене *SUP35*, полученные в нашей лаборатории. На рисунке представлена схема белка Sup35. Цифрами сверху обозначены мутации *sup35*. ПСК соответствует длине укороченного белка Sup35-n, получающегося в результате терминации трансляции при соответствующей нонсенс-мутации (модифицировано из [30]).

Клетки с нонсенс-мутациями в генах *SUP45* и *SUP35* характеризуются присутствием укороченных белков (N-терминальных фрагментов) Sup45-n и Sup35-n соответственно. Жизнеспособность в отсутствие гена дикого типа они сохраняют за счет супрессии нонсенс-мутаций, в результате которой

синтезируются полноразмерный белок Sup45 или Sup35. Этот процесс подвергается саморегуляции, поскольку белки Sup45 и Sup35 – это факторы терминации трансляции. При этом клетки с мутациями *sup45-n* и *sup35-n* содержат сокращенное количество полноразмерного белка Sup45 и Sup35 соответственно по сравнению с диким типом, например, мутация *sup35-244* приводит к снижению содержания Sup35 до 0,5% [30]. Достоверно неизвестно минимальное количество eRF3 или eRF1, достаточного для поддержания жизнеспособности клеток. Было показано, что уменьшение содержания eRF3-С или eRF1 до 10 % снижало жизнеспособность клеток в 10 раз [224]. Таким образом, несмотря на то, что делеция генов *SUP45* и *SUP35* летальна для клетки, для поддержания жизнеспособности достаточно небольшого количества белков eRF1 и eRF3.

Большинство полученных нонсенс-мутаций находятся в «слабом» нуклеотидном контексте, то есть контексте, облегчающем прочтение стоп-кодона. Семь нонсенс-мутаций *sup35-n* локализуются в первой трети гена *SUP35*, кодирующей NM-домен eRF3 (а.к.о. 1–253). Такое неравномерное распределение нонсенс-мутаций можно объяснить повышенным содержанием кодонов, единичная замена в которых может приводить к возникновению стоп-кодона. Действительно, участок гена *SUP35*, кодирующий NM-домен, содержит 48 % таких кодонов по сравнению с 33 % в участке, кодирующем С-домен eRF3, и с 34 % во всем дрожжевом геноме. Также отсутствовали мутации *sup35-n*, приводящих к появлению стоп-кодона UGA, что можно объяснить пониженным содержанием «потенциальных» кодонов UGA (кодонов, одиночные мутации в которых могут приводить к появлению кодона UGA). Действительно, последовательность гена *SUP35* содержит 10 % таких кодонов по сравнению с 39 % и 51 % для потенциальных кодонов UAG и UAA, соответственно. Эти данные соответствуют количеству изолированных мутаций типа TAG (4 мутации) и TAA (5 мутаций) [1]. Следует отметить, что в скрининге ревертантов Ade⁺ [23] изолировано 12 мутаций *sup35-n*, из которых шесть представляли мутации TAG, остальные равномерно распределились между мутациями TAA и TGA. Отличия в

соотношения типов мутаций *sup35-n* можно объяснить различиями в способах отбора мутантов.

В нашей лаборатории было также охарактеризовано 7 миссенс-мутаций в гене *SUP35* (см. обзор [216]). Их отбор был произведен по одновременной реверсии мутаций *ade1-14* (TGA) и *his7-1* (TAA). Все миссенс-мутации, изолированные у различных штаммов, локализуются в С-домеене eRF3 (а.к.о. 254-685), что подтверждает многочисленные данные о роли этого домена в терминации трансляции. Супрессорный фенотип изолированных миссенс-мутаций не может быть объяснен уменьшенным количеством eRF3, поскольку оно не изменяется, или неспособностью мутантного eRF3 взаимодействовать с eRF1. Последнее было доказано с помощью ко-иммунопреципитации [30]. Возможно, что данные мутации влияют на взаимодействие eRF3 с другими белками или рибосомой.

Все полученные в нашей лаборатории миссенс-мутации приводят к заменам аминокислот, консервативных среди eRF3 *S. cerevisiae* и *S. pombe* (за исключением мутации *sup35-233*). Это позволило расположить соответствующие аминокислотные замены в третичной структуре С-концевого домена eRF3 *S. pombe* и уточнить его функциональное значение [124, 216].

Следует отметить, что около половины мутаций *sup35*, описанных в литературе, локализуются либо в участках *SUP35*, кодирующих ГТФазные домены eRF3, либо рядом с ними. Интересно, что фенотипическое проявление мутаций, расположенных в С-терминальном домене eRF3, может зависеть от присутствия N-терминального домена eRF3 [226]. Возможно, взаимодействие этого участка с мутантным С-терминальным доменом уменьшает ГТФ-азную активность eRF3, что приводит к увеличению эффективности супрессии [1].

Детальное изучение характера супрессии было проведено у двух мутантов по ГТФазному домену eRF3 дрожжей [183]. Исходно авторы получили шесть мутаций с помощью сайт-специфического мутагена. Только две из них, которые приводили к заменам H348Q и R419G в белке Sup35, были способны поддерживать жизнеспособность клеток дрожжей, хотя их присутствие вызывало

уменьшение скорости роста. Факторы eRF3-H348Q и eRF3-R419G имели сниженную эффективность гидролиза ГТФ, но приводили к значительному нарушению терминации трансляции только на стоп-кодоне UGA (уровень нонсенс-супрессии увеличивался в 3,7–16,8 раз в зависимости от нуклеотидного контекста). Для кодонов UAG или UAA это не было характерно, однако в случае тетрануклеотидов UAGC и UAAC уровень супрессии возрастал в 3,2–4,4 по сравнению с eRF3 дикого типа. Эти результаты показали, что ГТФазная активность eRF3 необходима для связи распознавания сигналов терминации трансляции eRF1 с эффективным высвобождением полипептидной цепи [183].

1.3.2 Прион [*PSI*⁺]

Значительные успехи в изучении трансляции у эукариот были достигнуты благодаря обнаружению наследственного детерминанта белковой природы [*PSI*⁺], представляющего собой прионизированный фактор eRF3 (см. обзор [234]). Явление прионизации порождает массу вопросов ввиду неоднозначной природы прионов. На сегодняшний день достоверно неизвестно, какую функцию они выполняют в жизнедеятельности у разных организмов. У человека и животных описан ряд прионных заболеваний, в первую очередь нейродегенеративных (см. обзор [41]). При этом у низших эукариот, дрожжей, прионы потенциально могут быть функциональными, например, защищать клетку от стрессовых условий окружающей среды (см. обзор [245]). Несмотря на все различия, прионы разных организмов объединяет их структурное сходство и способность распространяться за счет копирования белковой матрицы. Большой прогресс в понимании природы человеческих прионных и амилоидных заболеваний принесло изучение прионов дрожжей *S. cerevisiae*. У сахаромисетов найдено наибольшее количество таких белков — более 10. Изучение прионов важно не только с точки зрения поиска подходов для лечения прионных заболеваний, но и также для решения фундаментальной задачи — определения механизмов регуляции синтеза белка. Прион [*PSI*⁺] может выступать как регуляторный элемент, обеспечивающий неоднозначность терминации трансляции, которая

имеет адаптивное значение в процессе эволюции. Фенотипическое проявление приона [PSI^+] связано с его структурными особенностями, которые зависят от его варианта (штамма приона), а также от генотипического фона дрожжевой клетки и окружающей среды.

1.3.2.1 Возникновение приона [PSI^+]

Прион [PSI^+] наряду с фактором [$URE3$] является одним из самых известных и исследованных дрожжевых прионов. Первое упоминание о нем было еще в 1965 году в работе Брайана Кокса [43], а в 1994 году Рид Викнер предположил его прионную природу [232]. Агрегаты фактора [PSI^+] состоят из прионизированного белка Sup35, при этом N-терминальный домен является необходимым и достаточным для его поддержания. Делеция N-домена приводит к элиминации приона [212]. Критический для поддержания приона участок Sup35 включает первые 64 а.к.о. этого белка. В этот фрагмент попадает регион, богатый а.к.о. Q/N и два первых OR [143, 169]. Было показано, что участок Q/N (а.к.о. 1-40) отвечает главным образом за переход растворимой формы Sup35 в прионную [50], а область OR (а.к.о. 41–97) играет важную роль в стабильном поддержании приона [PSI^+] в клетке [169]. Делеция участка с 22 по 69 а.к.о. в Sup35 препятствует как индукции приона [PSI^+], так и его взаимодействию с шаперонами [20]. Делеция M-домена уменьшает стабильность приона [PSI^+] в ходе клеточных делений [144].

Основным фенотипическим проявлением фактора [PSI^+] является уменьшение точности трансляции (см. обзор [44]), аналогично тому, как проявляют себя мутации в гене $SUP35$ — структурном гене [PSI^+]. Спонтанный переход [psi^-] в [PSI^+] — редкое явление, которое происходит с частотой примерно $5,8 \times 10^{-7}$ [61]. Известно, что различные стрессовые условия окружающей среды увеличивают образование прионов в дрожжах. Спонтанное возникновение фактора [PSI^+] увеличивается в случае длительной инкубации клеток дрожжей при низкой температуре [39], тепловом стрессе [158], осмотическом или окислительном стрессе [60, 84] и при «стрессе» (нарушение

протеостаза) эндоплазматического ретикулаума [89, 166, 219]. Необходимым условием для появления приона $[PSI^+]$ в клетке является присутствие фактора $[PIN^+]$ (от $[PSI^+]$ inducibility) [54]. При этом $[PIN^+]$ не требуется для поддержания $[PSI^+]$ [56]. $[PIN^+]$ удовлетворяет всем критериям дрожжевых прионов и характеризуется переходом Rnq1 в агрегированное состояние [54]. Биологическая функция этого явления остается пока неизвестной. Существует две точки зрения на то, каким образом прион $[PIN^+]$ стимулирует возникновение приона $[PSI^+]$ *de novo* [56]. Согласно первой из них растворимая форма Rnq1 ингибирует образование фактора $[PSI^+]$ *de novo*. При переходе Rnq1 в нерастворимое состояние с возникновением фактора $[PIN^+]$ эффект ингибирования сглаживается. Вторая теория, наиболее признанная на сегодняшний день, гласит, что агрегаты Rnq1 служат матрицей для формирования прионной формы Sup35, чему есть экспериментальные подтверждения [53].

1.3.2.2 Структура агрегатов $[PSI^+]$

Дрожжевые клетки $[PSI^+]$ накапливают прионизованный Sup35 в виде высокомолекулярных агрегатов [173]. Амилоидные агрегаты Sup35 имеют фибриллярную морфологию, где каждая фибрилла состоит из нескольких протофибрилл, скрученных между собой [97]. Молекулы белка в протофибриллах расположены в стопки, которые образуют так называемую кросс- β -структуру, в которой β -цепи ориентированы перпендикулярно оси протофибриллы и расположены на определенном расстоянии друг от друга (Рисунок 7). Расстояние между β -цепями в β -листе составляет 4,7-4,8 Å; каждая протофибрилла состоит, по крайней мере, из двух β -листов, расположенных на расстоянии ~ 10 Å. Эти повторяющиеся элементы, расположенные на фиксированных расстояниях друг от друга (4,7-4,8 и 10 Å, соответственно), образуют регулярную структуру, которая обеспечивает характерную картину электронной или рентгеновской дифракции с двумя меридиональными и двумя экваториальными отражениями, которые соответствуют зазорам между β -цепями и β -листами ([85], см. обзор [216]).

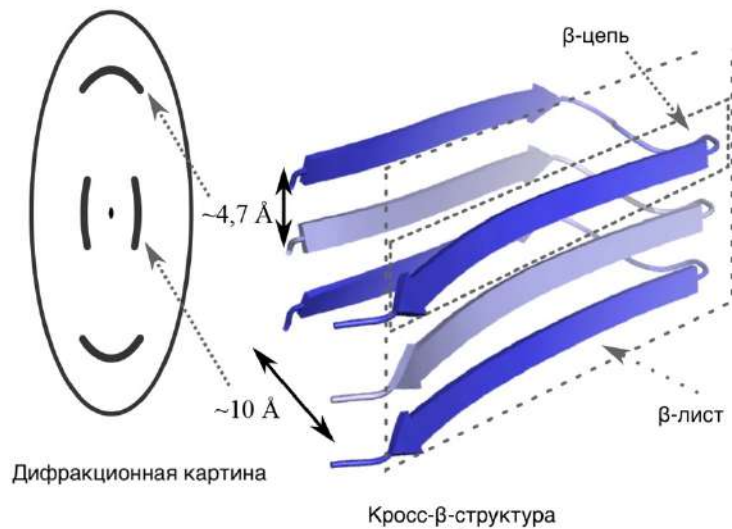


Рисунок 7. Структура протофибриллы. Показаны расстояния между β -цепями и β -листами в амилоидных агрегатах с кросс- β -структурой и соответствующей дифракционной картиной. Молекулы белка, чередующиеся в фибрилле, обозначены разными цветами (модифицировано из [151]).

Существует три фундаментальные модели, описывающие различные варианты кросс- β -структуры, где ориентация β -цепей в β -листах может быть параллельная в регистре («parallel-in-register»), параллельная вне регистра («parallel-out-of-register»), спиральная (β -соленоидная) и антипараллельная. Параллельный тип в регистре, вероятно, является наиболее частой схемой для амилоидов, в которой β -цепи соседних протомеров расположены параллельно, а соответствующие остатки от соседних протомеров находятся близко друг к другу (в регистре) (см. обзор [126]).

Для структурной характеристики прионных агрегатов [PSI^+] были предложены различные модели, одна из самых востребованных это — модель супер-складчатой β -структуры [107], в которой β -цепи ориентированы параллельно в регистре. В подтверждение этой модели накоплено достаточное количество данных (см. обзор [141]) (Рисунок 8). Эта модель подразумевает укладку N-доменов Sup35 в параллельную супер-складчатую структуру, в которой β -слои расположены перпендикулярно оси фибриллы. Эта структура стабилизирована водородными связями, действующими между полярными аминокислотными остатками отдельных мономеров параллельно оси фибриллы.

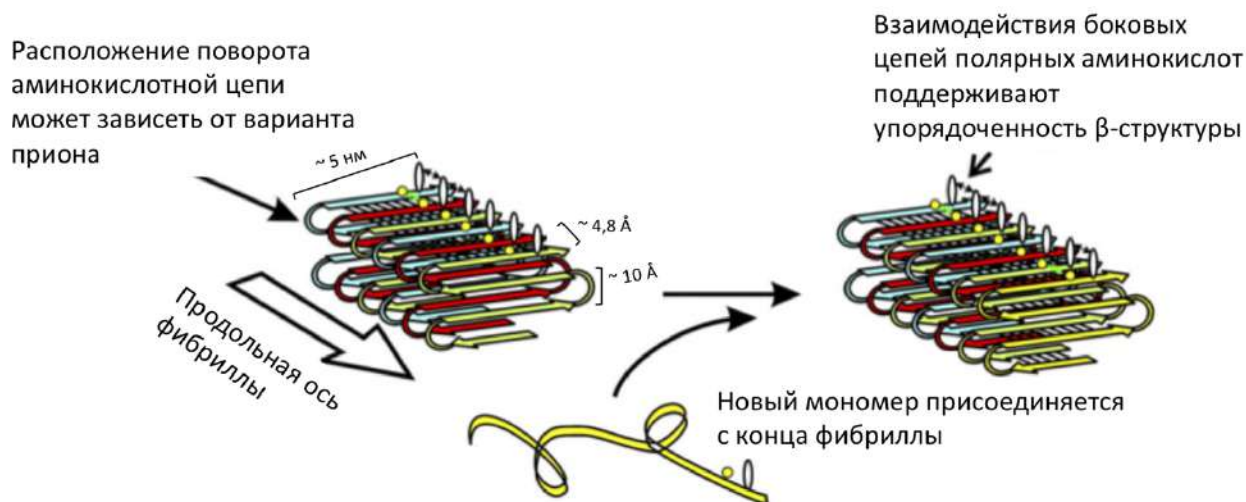


Рисунок 8. Модель параллельной супер-складчатой β -структуры фибрилл $[PSI^+]$. На рисунке показан момент присоединения мономера Sup35 к растущей фибрилле (модифицировано из [236]).

До сих пор не ясно, какие части N-домена Sup35 имеет решающее значение для образования фибрилл. В недавней работе были охарактеризованы области различных вариантов приона $[PSI^+]$, устойчивые к протеинкиназе А (ПКА), которые предположительно могли бы представлять собой амилоидное ядро [51]. При этом агрегаты Sup35 были получены из дрожжевых клеток, а не из бактериальных (что обычно применяется для получения рекомбинантного белка). При таком подходе можно гарантировать единообразие выделенных фибрилл Sup35 (см. обзор [126]). Обнаруженные устойчивые к ПКА участки располагались не случайным образом: во всех вариантах $[PSI^+]$ они были заключены внутри последовательностей а.к.о. 1–72, 73–124, 125–153 и 154–221, которые в этой работе были обозначены как амилоидные ядра 1, 2, 3 и 4 [51]. Любопытно, что граница между регионами 2 и 3 хорошо совпала с границей доменов N и M. Ядро 1 было крупнейшей из этих структур и лучше всего защищено от ПКА, а также оно в основном определяло нонсенс-супрессорный фенотип приона $[PSI^+]$ [51]. Авторы сделали заключение, что область 2–32 представляет собой ключевой элемент структуры всех изученных в работе вариантов $[PSI^+]$. При этом было отмечено, что область между полностью защищенным от ПКА ядром 1 и ядром 2, которое было охарактеризовано как «слабое», в основном образована OR (а.к.о. 41-97) [51]. Однако, данные, полученные в этой работе, оказались плохо

совместимы с моделью супер-складчатой β -структуры. Для получения точной модели структуры прионных агрегатов необходимы дальнейшие исследования.

1.3.2.3 Варианты приона

Как и у прионов млекопитающих, последовательность прионного белка дрожжей может быть основой для широкого спектра наследуемых, четко различимых так называемых «прионных вариантов» или «прионных штаммов» [23, 53, 189]. Сообщалось о штаммовых вариациях нескольких дрожжевых прионов, включая [*PIN*⁺], [*URE3*] и [*PSI*⁺] [57, 232].

Первым вариантом [*PSI*⁺], о котором стало известно, был фактор [*ETA*⁺], который рассматривался как «другие формы одного и того же элемента» до того, как была раскрыта природа [*PSI*⁺] [140, 241]. Позднее путем сверхпродукции белка Sup35 в дрожжах, были получены «сильные», «средние» и «слабые» варианты приона [*PSI*⁺], которые различались по степени выраженности нонсенс-супрессорного фенотипа, отражающего уровень дефицита функционального белка Sup35 [53, 221]. Также был выделен слабый «неопределённый» вариант [*PSI*⁺], который мог формировать как сильные, так и слабые варианты [196]. Этот вариант напоминал слабый вариант, описанный ранее [123], который мог спонтанно переходить в сильный. Во многих лабораториях аналогичным образом выделили варианты приона [*PSI*⁺]. В лаборатории Кинга были изолированы три стабильных варианта [*PSI*⁺], названные VH (сильный), VK и VL (слабые) [118]. VH и VK впоследствии удалось воспроизвести путем трансформации клеток дрожжей фибриллами Sup35(1–61)-GFP, полученными *in vitro* при температуре инкубации 4 °C и 22 °C, соответственно [119]. Подобный эксперимент был сделан в лаборатории Танаки [207], где в последствии было показано, что условия окружающей среды и мутации *sup35* влияют на укладку конформационных предшественников, которые в конечном итоге трансформировались в отдельные амилоидные «семена» [167, 168]. Показано, сильный штамм [*PSI*⁺] может находиться в клетке в виде «облака» вариантов, динамических структур, которые взаимно превращаются, вызывая таким образом колебания в составе облака. При

этом сила приона не меняется, что указывает на то, что диапазон колебаний ограничен, поэтому слабый вариант приона не может проявиться [11].

Варианты [PSI^+] могут значительно различаться по стабильности — частоте, с которой они теряются в ряду клеточных делений. Существует некоторая корреляция между силой варианта и его стабильностью — чем сильнее вариант приона, тем он стабильнее. Это объясняется наблюдаемыми более короткими размерами фибрилл сильного [PSI^+] и большей их длиной у слабого варианта. Считается, что при коротком размере доступно большее число концов филаментов, что способствует захвату большей доли мономеров Sup35 и, таким образом, проявлению сильного супрессорного фенотипа [88, 108, 208]. Считается, что такие различия между штаммами приона опосредованы вариативным дезагрегазным действием на них шаперона Hsp104 [208].

1.3.2.4 Факторы, влияющие на поддержание [PSI^+]

Белок Hsp104 является дезагрегазой, которая в паре с Hsp70 и Hsp40 воздействует на денатурированные белки [83]. Он относится к семейству AAA АТФаз (ATPases Associated with diverse cellular Activities, АТФазы связанные с различными клеточными активностями) и представляет собой гексамер. Считается, что Hsp104 расщепляет прионные агрегаты на олигомеры, обеспечивая таким образом их стабильное наследование при условии определенного уровня продукции шаперона и скорости роста полимеров [132, 173]. Этот процесс осуществляется путем протаскивания фибриллы через канал белка Hsp104, в процессе чего от центра фибриллы отщепляются мономеры, и она разделяется на две части [157, 163]. Было показано, что нормальный уровень шаперона Hsp104 изгоняет большинство вариантов [PSI^+]. В штаммах с мутацией $hsp104^{T160M}$ прион образуется в 10 раз чаще, чем при базальном спонтанном уровне (см. обзор [236]).

При ингибировании Hsp104 прионные филаменты продолжают расти, но не разделяются на части для формирования новых полимеров, что приводит к потере приона в ряду клеточных делений [164, 173]. Делеция гена *HSP104* приводит к таким же последствиям. Такой эффект частично компенсируется

сверхпродукцией шаперона Hsp70-Ssa, который восстанавливает фрагментацию и распространение приона, когда работает вместе с Hsp104 [113]. При сверхпродукции Hsp104, расщепление идет с более высокой эффективностью и образуется большое количество олигомеров, что нарушает наследование приона $[PSI^+]$ [37].

Гидрохлорид гуанидина (ГГХ) является универсальным антиприонным агентом, который в миллимолярных концентрациях вызывает элиминацию всех известных дрожжевых прионов (см. обзор [141]). ГГХ излечивает прион $[PSI^+]$ только в делящихся клетках путем блокирования размножения приона [64]. При этом было подтверждено, что ГГХ не останавливает полимеризацию Sup35 в $[PSI^+]$ штамме и не разрушает агрегаты [163]. Эти данные согласуются с тем, что ГГХ специфически подавляет активность Hsp104 [103].

Подсемейство шаперонов Hsp70, Ssb, представлено двумя не жизненно важными, сходными по строению белками Ssb1 и Ssb2. Ssb1 ассоциирован с транслирующими рибосомами через гетеродимерный связанный с рибосомами комплекс («heterodimeric ribosome-associated complex» — RAC), который состоит из белков Zuo1 (гомолог Hsp40) и Ssz1 (гомолог Hsp70). Ssb1 обеспечивает сворачивание образующейся полипептидной цепи. В отличие от белков другого подсемейства Hsp70, Ssa, сверхпродукция Ssb стимулирует элиминацию приона $[PSI^+]$ в условиях избытка Hsp104 и препятствует формированию некоторых вариантов фактора $[PSI^+]$. Недостаток белка Ssb стимулирует формирование приона $[PSI^+]$ *de novo* и противостоит излечиванию $[PSI^+]$ в условиях избытка Hsp104. *In vitro*, белок Ssb препятствует формированию амилоида NM-участком белка Sup35. Такой эффект дополнительно усиливается в присутствии белков Zuo1/Ssz1 [113].

Механизм антиприонного эффекта при сверхпродукции Hsp104 на сегодняшний день еще спорный, поэтому активно изучается. С одной точки зрения, Hsp104 имеет специфический сайт связывания в М-домене Sup35 [92] и поэтому избыток Hsp104 блокирует доступ шаперонов Hsp70 к филаментам, тем самым предотвращает их расщепление [238]. Другие исследования показывают,

при сверхпродукции Hsp104 происходит ассиметричная сегрегация прионных «семян» (англ. prion seeds) (или пропагонов) в клетке, что приводит к частой потере приона [164]. Также есть предположение, что при сверхпродукции Hsp104 начинает удалять мономеры с концов фибрилл в процессе, который был назван триммингом (англ. «trimming») (в отличие от стандартного расщепления фибрилл посередине) [171, 240].

1.3.2.5 Мутации в гене *SUP35*, влияющие на поддержание [*PSI*⁺]

N-домен белка Sup35 необходим и достаточен для поддержания приона [*PSI*⁺] [131, 212]. Для того, чтобы определить функциональные участки, необходимые для поддержания приона [*PSI*⁺], был проведен ряд исследований с применением делеционного и мутационного анализа участка гена *SUP35*, соответствующего N-домену белка Sup35.

В гене *SUP35* идентифицирован ряд мутаций, названных *PNM* (от «[*PSI*⁺] no more»), влияющих на поддержание фактора [*PSI*⁺]. Одной из первых картированных мутаций стала *PNM2-1* (G58D) [59]. Детальное изучение элиминации фактора [*PSI*⁺], вызванной *PNM2-1*, показало отсутствие у мутантов дефектов в агрегации или индукции приона [*PSI*⁺] [169]. Более ранние работы указывали на то, что Sup35 у мутантов *PNM2-1* способен формировать [*PSI*⁺] *in vivo* [55, 118, 122]. Действительно, у штаммов дрожжей [*psi*⁻] [*PIN*⁺] сверхпродукция белка Sup35-GFP с заменой G58D в присутствии копии гена *SUP35* дикого типа приводила к появлению флуоресцирующих фокусов. При этом наблюдалось сниженная эффективность передачи приона [*PSI*⁺] в дочерние клетки [169]. Причиной элиминации фактора [*PSI*⁺] в случае *PNM2-1*, помимо нарушения его наследования, потенциально является усиление фрагментации прионных агрегатов Sup35 шаперонами, ведущее к их ресолюбилизации [58, 176, 225].

На данный момент описано множество мутаций в гене *SUP35*, которые приводят к изменению или элиминации приона [*PSI*⁺]. При этом они могут иметь специфические проявления у разных штаммов приона [*PSI*⁺] [55, 118, 142].

Большинство таких мутаций обнаружены в участке гена *SUP35*, которые кодируют заряженные а.к.о. Q или N в рамках N-домена [50]. В недавней работе были обнаружены нонсенс-мутации в участке гена *SUP35*, кодирующего N-домен, которые могут увеличивать частоту возникновения [*PSI*⁺] *de novo* на четыре порядка, приближая ее к частоте появления [*PSI*⁺] в случае сверхпродукции белка Sup35 или Sup35NM [52]. Нельзя исключать, что мутации *sup35*, приводящие к заменам в функциональном участке белка Sup35 также могут влиять на стабильность приона [*PSI*⁺]. Так, было показано, что замены T314A или T314D в C-домене Sup35 приводят к потере приона [104].

Ранее в нашей лаборатории были получены двойные мутации *sup35KK*, локализующиеся в участке гена *SUP35*, который кодирует N-домен белка Sup35 [18]. Изучение этих мутаций должно было помочь с поиском участков N-домена Sup35, критически важных для формирования фибрилл и поддержания фенотипа [*PSI*⁺]. Мутантные белки содержали аминокислотные замены в одном из OR Sup35. Согласно модели, сконструированные мутации должны изменять стабильность приона [*PSI*⁺] только в том случае, если они попадают в область, которая формирует супер-складчатую β -структуру. Замены *sup35-M1* (Y46K/Q47K) и *sup35-M2* (Q61K/Q62K) приводили к потере приона, тогда как *sup35-M3* (Q70K/Q71K), *sup35-M4* (Q80K/Q81K) и *sup35-M5* (Q89K/Q90K) были способны сохранять прион [*PSI*⁺]. Эти результаты позволили заключить, что часть N-домена, которая является наиболее критической для образования параллельной супер-складчатой β -структуры, находится в пределах 63–69 а.к.о. [18]. Позже в нашей лаборатории была получена и добавлена в исследование еще одна мутация, названная *sup35-M0* (Q33K/A34K) [49]. Она располагается в дополнительном OR, который был обнаружен с помощью программы T-REKS [18]. В присутствии новой мутации прион [*PSI*⁺] мог формироваться с очень низкой эффективностью и был способен поддерживать только слабые варианты. В системе *in vivo* белок Sup35-M0 мог коагрегировать с белком Sup35 дикого типа [49]. Предположительно, исследуемые в нашей лаборатории мутации *sup35KK* влияют на свойства фактора [*PSI*⁺], изменяя структуру прионных агрегатов.

С помощью электронной микроскопии было показано, что амилоидные фибриллы, образованные белком Sup35NM с заменами *sup35KK*, и Sup35NM дикого типа имеют существенные различия в общей морфологии. При этом *sup35-M5* оказывал наименьшее влияние на размер и кластеризацию амилоидных фибрилл Sup35NM. Исследование вторичной структуры при помощи метода спектроскопии кругового дихроизма показало, что фибриллы, образованные из Sup35NM дикого типа, а также из Sup35-M4 и Sup35-M5, имеют существенное содержание упорядоченной β -структуры. Наблюдаемые вариации в содержании β -складчатой структуры позволили предположить различия в длине аминокислотной последовательности, образующий остов амилоидных фибрилл [205].

1.3.2.6 Жизнеспособность клеток *S. cerevisiae* в присутствии [*PSI*⁺]

На вопрос, положительно или отрицательно прион [*PSI*⁺] влияет на клетки *S. cerevisiae*, однозначно ответить на сегодняшний день нельзя. Исследования, проведенные разными группами, показали, что прионы редко встречаются у дрожжей в природных популяциях. Природных штаммов [*PSI*⁺] пока не выявлено, но были обнаружены два «диких» штамма [*PIN*⁺] [38, 180]. При этом было показано, что в кладе *Saccharomycetes* эволюционно наблюдается увеличение количества Q/N-богатых белков по сравнению не только со всеми остальными кладами среди царства грибов [7], а также среди всего живого мира [188].

Ранние работы утверждали, что фактор [*PSI*⁺] не влияет на скорость роста штаммов дрожжей (см. обзор [44]). Исследования, проведенные на семи штаммах дрожжей с использованием 150 различных условий культивирования, показали, что в 50 % случаев [*PSI*⁺] действительно не влияет на рост, в то время как в остальных наблюдалось, как ингибирование, так и стимулирование роста в присутствии [*PSI*⁺] [218]. В некоторых случаях фактор [*PSI*⁺] приводил к изменению морфологии колоний [218] и чувствительности клеток к паромоцину при 20 °C [42].

В другом сообщении некоторые стрессовые условия немного увеличивали частоту появления $[PSI^+]$ у штамма с измененным прионным доменом Sup35 [219], но две другие группы не смогли воспроизвести эти результаты [109, 231]. Более того, $[PSI^+]$ снижал жизнеспособность клеток в большинстве стрессовых состояний [219], что указывает на то, что индукция $[PSI^+]$ не была адаптивным ответом.

Прионы возникают в клетке спонтанно, при этом $[PSI^+]$ часто смертелен или токсичен для клеток. Представление о том, что дрожжи становятся $[PSI^+]$ под стрессовой нагрузкой пока несостоятельно — требуется показать, что какой-либо вариант $[PSI^+]$ воспроизводимо повышает выживаемость клеток дрожжей (см. обзор [233]). Тем не менее, есть свидетельства, что неприонная агрегация белка Sup35 — образование временных белковых капель — выполняет адаптивную роль и повышает шансы дрожжей выжить в трудных для них условиях. За эту функцию белка Sup35 отвечают N- и M-домены, образующие своего рода двухкомпонентную функциональную единицу, в которой M-домен, богатый заряженными а.к.о., выполняет роль стресс-сенсора. Было показано, что NM-домен обратимо и в прямой зависимости от уровня pH образует белковые капли *in vitro*. Несмотря на то, что аминокислотная последовательность M-домена может значительно различаться среди разных представителей дрожжей, дивергировавших более 400 млн лет назад, распределение зарядов является консервативным — это относится к возможности Sup35 образовывать конденсированную фракцию путем pH-зависимого разделения фаз, но не прион. В этом контексте прионизация Sup35 у дрожжей — явление спорадически протекаемого заболевания [74].

1.4 Заключение

В настоящей работе мы исследуем мутантные аллели *sup35*, которые напрямую или опосредованно влияют на свойства приона $[PSI^+]$. За долгую историю изучения мутаций в генах *SUP35* и *SUP45* на кафедре генетики и биотехнологии СПбГУ накопилось значительное количество сведений об их

фенотипическом проявлении. Однако до сих пор остаются неизученными все возможные механизмы, за счет которых эти мутации проявляются в клетке. В настоящей работе исследуется уникальная система, при которой в клетке находится одновременно два сильных супрессора, наличие которых вызывают изменения в белке Sup35 – это нонсенс-мутации в гене *SUP35* и прион [*PSI*⁺]. При этом мы сталкиваемся с проблемой, когда нужно различать наблюдаемые фенотипические эффекты мутации или приона, а кроме того эффекты, которые наблюдаются в совокупности. Любопытным является то, что в этом случае клетка способна поддерживать жизнеспособность, однако для этого она использует различные механизмы, попытку разобраться в которых мы предприняли в данном исследовании.

В настоящее время пока еще невозможно однозначно ответить на вопрос, являются ли прионы у дрожжей функциональными, либо это случайно возникающая конформационная ошибка. При этом их открытие, изучение, а также поиск новых прионов у дрожжей помогает исследованию прионных и амилоидных заболеваний человека. Активное накопление новых данных о свойствах прионов поможет рано или поздно ответить на этот вопрос.

Таким образом **целью** настоящей работы стало изучить влияние нонсенс-мутаций *sup35* на жизнеспособность клеток *S. cerevisiae* с сильным вариантом приона [*PSI*⁺].

Для достижения поставленной цели требовалось решить следующие **задачи**:

1. Проверить жизнеспособность гаплоидных и диплоидных штаммов дрожжей, содержащих сильный вариант приона [*PSI*⁺] в сочетании с нонсенс-мутациями *sup35*;
2. Оценить влияние мутаций нонсенс-мутаций *sup35* на свойства приона [*PSI*⁺].

Глава 2. Материалы и методы

2.1 Штаммы

В работе использовали изогенные штаммы *S. cerevisiae* (см. Таблица 1) и их производные, содержащие нонсенс-мутантные аллели *sup35-21*, *sup35-74*, *sup35-218*, *sup35-240* (см. описание мутаций в Таблица 3).

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

| Штамм | Генотип | Источник |
|------------|---|--|
| 7A-D832 | <i>MATα ade1-14 his7-1 leu2-3,112 lys2-739 trp1-289 ura3-52 SUP35::TRP1 [pYCM-U2] [psi⁻] [PIN⁺]</i> | Предоставлены А.С. Борхсениусом |
| 10-7A-D832 | <i>MATα ade1-14 his7-1 leu2-3,112 lys2-739 trp1-289 ura3-52 SUP35::TRP1 [pYCM-U2] [PSI⁺]^S [PIN⁺]</i> | |
| a8-7A-D832 | <i>MATα ade1-14 his7-1 leu2-3,112 lys2-739 trp1-289 ura3-52 SUP35::TRP1 [pRSU2] [psi⁻] [PIN⁺]</i> | |
| OT56 | <i>MATα ade1-14 trp1-289 his3-200 leu2-3,112 ura3-52 [PSI⁺]^S [PIN⁺]</i> | [54, 165] |
| OT55 | <i>MATα ade1-14 trp1-289 his3-200 leu2-3,112 ura3-52 [PSI⁺]^W [pin⁻]</i> | |
| 1-OT56 | <i>MATα ade1-14 trp1-289 his3-200 leu2-3,112 ura3-52 [psi⁻] [PIN⁺]</i> | [152] |
| D1691 | <i>MATα/α ade1-14/ade1-14 his7-1/his7-1 leu2-3,112/leu2-3,112 lys2-739/lys2-739 trp1-289/trp1-289 ura3-52/ura3-52 SUP35::TRP1/SUP35::TRP1 [pRSU1] [pRSU2] [psi⁻] [PIN⁺]</i> | Данная работа, получены скрещиванием штаммов a8-7A-D832 и 7A-D832 |
| D1692 | <i>MATα/α ade1-14/ade1-14 his7-1/his7-1 leu2-3,112/leu2-3,112 lys2-739/lys2-739 trp1-289/trp1-289 ura3-52/ura3-52 SUP35::TRP1/SUP35::TRP1 [pRSU1] [pRSU2] [PSI⁺]^S [PIN⁺]</i> | Данная работа, получены скрещиванием штаммов a8-7A-D832 и 10-7A-D832 |

В таблице использованы стандартные обозначения мутаций, ассоциированных с ауксотрофностью по определенным аминокислотам и азотистым основаниям. Аллели *ade1-14* и *lys2-739* содержат преждевременный стоп-кодон UGA и приводят к ауксотрофности по аденину и лизину соответственно; нонсенс-мутация *his7-1* (UAA) приводит к ауксотрофности по гистидину; нонсенс-мутация *trp1-289* (UAG) приводит к ауксотрофности по триптофану. Миссенс-мутации *ura3-52*, и *leu2-2,112* приводят к ауксотрофности по урацилу и лейцину соответственно. Исходно штаммы 7A-D832 и 10-7A-D832 содержали плазмиду pYCM-U2-SUP35, а штамм a8-7A-D832 — pASB2-SUP35, которые компенсировали эффект дизрупции

гена *SUP35* (*sup35::TRP1*). В ходе работы данные плазмиды были заменены на плазмиды серии pRSU2 и pRSU1 соответственно. [*PSI⁺*]^S – сильный (S – strong) вариант приона [*PSI⁺*]. [*PSI⁺*]^W – слабый (W – weak) вариант приона [*PSI⁺*].

Для наработки плазмид использовали бактериальный штамм *E. coli* DH5 α (*supE44 ΔlacU169 (φ80 lacZΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1*) [90].

2.2 Плазмиды

Плазмиды, использованные в работе, указаны в Таблица 2. Плазмиды pRSU1 и pRSU2, содержащие аллель дикого типа *SUP35* под собственным промотором [227], получены на основе центромерных векторов pRS315 и pRS316 [198], несущих дрожжевые селективные маркеры *LEU2* и *URA3* соответственно.

Таблица 2 — Плазмиды, использованные в работе

| Плаزمида | Краткая характеристика* | Источник |
|---------------------------|--|--|
| pRSU1 (pRS315-SUP35) | <i>CEN, amp^R, LEU2, SUP35</i> | [227] |
| pRSU2 (pRS316-SUP35) | <i>CEN, amp^R, URA3, SUP35</i> | |
| pRSU3 (pRS415-SUP35) | <i>2μ, amp^R, LEU2, SUP35</i> | |
| pRSU1-21 | <i>CEN, amp^R, LEU2, sup35-n</i> | [30] |
| pRSU1-74 | | |
| pRSU1-218 | | |
| pRSU1-240 | | |
| pRSU1-Q56Y | <i>CEN, amp^R, LEU2, sup35</i> | Данная работа |
| pRSU1-Q56K | | |
| pRS315 | <i>CEN, amp^R, LEU2</i> | [198] |
| pRS316 | <i>CEN, amp^R, URA3</i> | |
| pRS316-pCUP-GFP | <i>CEN, amp^R, URA3, GFP</i> | [82] Оригинальное название плазмиды – pRS316CG |
| pRS316-pCUP-SUP35NM-GFP | <i>CEN, amp^R, URA3, SUP35-GFP</i> | [194] Оригинальное название плазмиды – pmCUP-NMGFP |
| pRS316-pCUP-sup35-240-GFP | <i>CEN, amp^R, URA3, sup35-240-GFP</i> | Данная работа |

* Для каждой конструкции указаны следующие характеристики: копияность в дрожжевых клетках (*CEN* – центромерная, *2μ* – мульткопийная), бактериальный селективный маркер, дрожжевой селективный маркер, вносимый ген. Далее в работе мы будем для краткости обозначать присутствие плазмиды (например, pRSU1) в следующем виде: [*SUP35 LEU2*].

Серия плазмид pRSU1 с аллелями *sup35-n* сконструирована в работе С.В. Шабельской [30] путем замещения фрагмента *SUP35* плазмиды pRSU1 на аналогичные фрагменты, содержащие мутации *sup35-n*.

Плазмиду pRS316-pCUP-*sup35-240-GFP* получили на основе pRS316-pCUP-*SUP35NM-GFP*: добавили сайт рестрикции SacII после 166-го нуклеотидного остатка в последовательности *SUP35NM* путем сайт-направленного мутагенеза с праймерами 240_SacII-F и 240_SacII-R (Таблица 4). Полученную конструкцию рестрицировали SacII по двум сайтам (новый — внутри последовательности *SUP35NM* и исходный — между *SUP35NM* и GFP). Длинный фрагмент лигировали сам на себя.

Плазмиды pRSU1-Q56Y и pRSU1-Q56K с мутациями в гене *SUP35*, которые приводят к заменам Q56K и Q56Y в белке Sup35, были сконструированы с помощью сайт-направленного мутагенеза с комплементарными праймерами Q56K-f и Q56K-r или Q56Y-f и Q56Y-r соответственно (Таблица 4).

Таблица 3 — Характеристика нонсенс-мутантных аллелей *SUP35*, изученных в работе

| Название аллеля | Нуклеотидная позиция | Замена | Аминокислотная позиция | Замена |
|------------------|----------------------|------------------|------------------------|-------------|
| <i>sup35-21</i> | 1264 | CAA → <u>TAA</u> | 422 | Gln → (TAA) |
| <i>sup35-74</i> | 388 | CAA → <u>TAA</u> | 129 | Gln → (TAA) |
| <i>sup35-218</i> | 541 | GAA → <u>TAA</u> | 181 | Glu → (TAA) |
| <i>sup35-240</i> | 166 | CAA → <u>TAA</u> | 56 | Gln → (TAA) |

*Приведены триплеты, в состав которых входят нуклеотидные замены; подчеркнуты мутантные нуклеотиды.

2.3 Среды и методы культивирования

Для культивирования бактерий использовали полную среду LB, и селективную среду LBa, содержащую антибиотик ампициллин в концентрации 100 мкг/мл [185]. Трансформацию бактерий проводили с использованием компетентных клеток [99]. Для работы с культурами дрожжей использовали полную среду YPD, синтетическую среду SC, селективные среды, не содержащие отдельных компонентов среды SC, и минимальные питательные среды [106].

Среду 1/4 YPD применяли для визуализации супрессорного фенотипа [64]. Для изгнания из клеток дрожжей плазмид с селективным маркером *URA3* использовали среду с 5-фтороротовой кислотой (5-FOA, Sigma) в концентрации 1 г/л [106]. Для индукции промотора *CUP1* в питательную среду добавляли CuSO_4 до конечной концентрации 50 μM [194]. Для оценки стабильности белка Sup35 в среду добавляли 100 $\mu\text{г/мл}$ циклогексимида, который ингибирует трансляцию. Жизнеспособность некоторых мутантов по гену *SUP35* оценивали на среде с добавлением паромомина (от 0,25 до 1 мг/мл), который также воздействует на точность трансляции [98].

Культуры бактерий выращивали при температуре 37 °C, дрожжей — при 26 °C (в случае термочувствительных штаммов с мутациями *sup35-n*) и 30 °C. При культивировании клеток в жидкой среде количество оборотов на термостатируемой качалке для бактерий составляло 300 об./мин, для дрожжей — 200 об./мин.

2.4 Методы генетики дрожжей

В работе применяли стандартные методы работы с культурами дрожжевых клеток [106]. Трансформацию дрожжевых клеток проводили с использованием ацетата лития и балластной ДНК [81].

Жизнеспособность клеток дрожжей визуализировали методом посевов с десятикратными разведениями. Для этого клетки собирали с твердой среды и ресуспендировали в стерильной дистиллированной воде. Измеряли оптическую плотность полученных суспензий при длине волны проходящего света 600 нм (OD_{600}). Суспензии клеток выравнивали по плотности, добавляя необходимое количество воды. Полученные пробы разводили в 10 раз, повторяя разведения последовательно 4 раза и высевали на твердую среду каплями по 7,5 $\mu\text{л}$.

Прямое замещение плазмид (шаффлинг) [17] проводили следующим образом: дрожжевой штамм, несущий плазмиду pRSU2, трансформировали плазмидами серии pRSU1. Далее у штаммов [*URA3*] [*LEU2*] проводили потерю плазмиды pRSU2 селективно или неселективно. В первом случае штаммы [*LEU2*]

отбирали после роста трансформантов на среде 5-FOA. Неселективную потерю плазмид осуществляли в полной среде YEPD. Выросшие колонии печатали на среды без урацила (SC-U) и лейцина (SC-L) и далее отбирали клетки Ura-Leu⁺. Для обратного замещения плазмид (решафлинга) [17] полученный в ходе шаффлинга штамм [*LEU2*] трансформировали плазмидой pRSU2. Далее проводили неселективную потерю плазмид и отбирали клетки Ura⁺Leu⁻.

Индукцию приона [*PSI*⁺] у дрожжей осуществляли при сверхпродукции белка Sup35 за счет использования плазмиды, несущей ген *SUP35* под контролем промотора *CUP1*. Дрожжевую колонию, несущую такую плазмиду, засеивали в чашки Петри в жидкую селективную среду и растили ночь. На следующий день измеряли оптическую плотность культуры и разбавляли свежей средой до OD₆₀₀ = 0,1. Клетки растили в течение 2–4 ч и после этого производили индукцию. Для элиминации приона [*PSI*⁺] исходные штаммы дрожжей растили на среде YPD, содержащей ГГХ в концентрации 4 мМ. После этого клонировали на среде YPD и анализировали фенотип полученных клонов.

2.4.1 Белковая трансформация дрожжей

Белковую трансформацию проводили согласно ранее опубликованным протоколам [207, 209, 235] с изменениями. Для приготовления сферопластов дрожжевые клетки растили в жидкой среде YPD до достижения оптической плотности культуры OD₆₀₀ = 0,3, затем осаждали их и последовательно промывали стерильной водой, буфером (1 М сорбитол, 25 М EDTA, 50 мМ дитиотреитол), 1 М сорбитолом и буфером SCE (1 М сорбитол, 1 мМ EDTA, 10 мМ цитрат натрия, pH 5,8). Затем клетки сферопластировали в SCE буфере с 50 мкл зимолиазы (120 ед./мл) 30 мин при 30 °С. Сферопласты последовательно промывали раствором 1 М сорбитола и буфером STC (1 М сорбитол, 10 мМ CaCl₂, 10 мМ Трис, pH 7,5). Затем клетки ресуспендировали в 1 мл буфера STC. Порцию 100 мкл суспензии сферопластов смешивали с 2 мкл балластной ДНК (5 мг/мл), 500 нг плазмиды pRS316 и 5 мкл раствора клеточных экстрактов с прионными частицами или фибрилл Sup35^{NM}, полученных в условиях *in vitro*. Смесь

инкубировали в течение 30 мин при 25 °С. Далее добавляли 900 μ л буфера PEG (20 % (w/v) PEG 8000, 10 мМ CaCl₂, 10 мМ Трис, рН 7,5) и инкубировали еще 30 мин. Клетки осаждали, ресуспендировали в 150 μ л буфера SOS (1 М сорбитол, 7 мМ CaCl₂, 0,25 % дрожжевой экстракт) и инкубировали 30 мин при 30 °С. Трансформантов высевали на селективную среду (SC-Ura, 1 М сорбитол, 2 % агар) и покрывали верхним слоем агара (SC-Ura, 1 М сорбитол, 3 % агар).

2.5 Методы работы с ДНК

Выделение плазмидной ДНК из клеток бактерий, выделение ДНК из агарозного геля, очистку ПЦР-продуктов, а также рестрикцию и лигирование проводили с использованием соответствующих коммерческих наборов и ферментов согласно протоколам производителя (Thermo Fisher Scientific).

2.5.1 Электрофорез ДНК в агарозном геле

Фрагменты ДНК разделяли методом гель электрофореза в 1,0 % (w/v) агарозном геле на основе 0,5x трис-боратного буфера (ТВЕ) согласно стандартной методике [185]. После электрофореза гель инкубировали в растворе бромистого этидия и помещали на рабочую поверхность трансиллюминатора. Флюоресценцию бромистого этидия, связанного с ДНК, фиксировали с помощью цифровой видеокамеры.

2.5.2 ПЦР

Аmplификацию последовательности гена *SUP35* проводили с помощью ПЦР по стандартному протоколу на приборе T100 (BioRad). В качестве матрицы использовали 50 нг плазмидной ДНК на 10 μ л готовой смеси. Конечные концентрации компонентов в реакции были следующие: праймеры (Evrogen) — по 0,25 μ М каждого, Таq-полимераза (SibEnzyme) — 0,05 е.а./ μ л, дезоксирибунуклеотиды (Fermentas) 0,2 мМ. Реакцию проводили в буфере для Таq-полимеразы (SibEnzyme).

Таблица 4 — Последовательности праймеров, использованных в ходе конструирования плазмид

| Название праймера | Конструирование плазмиды | Последовательность (5' → 3') |
|-------------------|---------------------------|--|
| 240_SacII-F* | pRS316-pCUP-sup35-240-GFP | CCAAGGTTATTCTGGGTACCCGCGGG GTTATCAACAGTAC |
| 240_SacII-R* | | GTA <u>CT</u> GTTGATAGCCACCCGCGGGT ACCCAGAATAACCTTGG |
| Q56Y-f** | pRSU1-Q56Y | CCAAAATTACCAAGGTTATTCTGGGT ACTACCAAGGTGGCTATCAACAGTAC AATCCCG |
| Q56Y-r** | | CGGGATTGTA <u>CT</u> GTTGATAGCCACCT TGGTAGTACCCAGAATAACCTTGGTA ATTTTGG |
| Q56K-f** | pRSU1-Q56K | CCAAAATTACCAAGGTTATTCTGGGT ACAAGCAAGGTGGCTATCAACAGTAC AATCCCG |
| Q56K-r** | | CGGGATTGTA <u>CT</u> GTTGATAGCCACCT TGCTTGTACCCAGAATAACCTTGGTA ATTTTGG |

* Подчеркнут сайт рестрикции SacII

** Подчеркнуты нуклеотидные замены

Аmplификацию длинного фрагмента pRS316-pCUP-SUP35NM-GFP при конструировании pRS316-pCUP-sup35-240-GFP (Таблица 4) проводили с использованием высокоточной высокопроцессивной полимеразы AccuPrime™ Pfx (Invitrogen). Сайт-направленный мутагенез при получении плазмид pRSU1-Q56Y и pRSU1-Q56K проводили также с использованием Pfx на матрице pRSU1. После ПЦР продукт рестрицировали DpnI для того, чтобы избавиться от исходной матрицы, и трансформировали им *E. coli* DH5α.

Проверку полученных плазмид проводили методом ПЦР с бактериальных колоний. Одну колонию ресуспендировали в 10 μл воды, инкубировали при 100 °C 2 мин и центрифугировали 5 мин при 14 000 об./мин. Для ПЦР брали 2–5 μл полученной смеси.

2.5.3 Секвенирование

Секвенирование фрагментов плазмидной ДНК, содержащих кодирующую последовательность гена *SUP35* с изучаемыми мутациями, было проведено в

ресурсном центре «Развитие молекулярных и клеточных технологий СПбГУ» с использованием праймеров, указанных в Таблица 5.

Таблица 5 — Последовательности праймеров, использованных для секвенирования гена *SUP35*

| Название | Последовательность (5' → 3') |
|-------------|-------------------------------|
| CFPstart-r | GTGCCCATTAACATCACCATC |
| Sup35 BamHI | AAGGATCCATGTTCGGATTCAAACCAAGG |
| 116 | CATTGGCATTGTTGGTATTATGTGTTG |
| sup3 | GAGCATTGATGTGACGGT |
| 112 | CTTGCTCACACACATAGCCATATCAAC |
| 113 | GGAGGAGAAACCAGTCCAGACTGAAG |

2.6 Методы работы с белками

2.6.1 Выделение и разделение белков в денатурирующих условиях

Выделение белков из дрожжей и бактерий в денатурирующих условиях осуществляли по опубликованным протоколам [129, 239]. Электрофорез денатурированных белков в 15 % (v/v) полиакриламидном геле в присутствии SDS (SDS-PAGE) проводили в соответствии со стандартной методикой [134]. После проведения электрофореза белки переносили на мембрану PVDF Hybond-P (Amersham) с использованием прибора Trans-Blot Turbo (Bio-Rad).

2.6.2 Выделение и разделение белков в полуденатурирующих условиях

Для выделения белков из дрожжей в полуденатурирующих условиях (SDD-AGE) применяли модифицированную методику на основе ранее опубликованных работ [87, 125]. Культуру клеток объемом 10-50 мл выращивали до достижения оптической плотности $OD_{600} = 0,6-0,8$. Все последующие манипуляции с образцами осуществляли при 4 °C или во льду. Клетки осаждали в течение 5 мин при 5 000 об./мин в пробирке объемом до 50 мл. Супернатант удаляли, клетки промывали в 1 мл воды и осаждали при тех же условиях. Осадок ресуспендировали в 500 μ л воды, переносили в эппендорф и центрифугировали 1 мин при скорости 14 000 об./мин. Супернатант удаляли, осадок клеток

ресуспендировали в равном объеме буфера для лизиса (100 мМ Трис-НСl, рН = 7,5, 50 мМ NaCl, 10 мМ β-меркаптоэтанол, 2 мМ PMSF, 20 μл коктейля ингибиторов протеаз (Sigma) на 1 мл буфера). В чистые эппендорфы насыпали стеклянные шарики (Sigma), объем которых был примерно равен объему клеточной суспензии. К шарикам переносили клетки и проводили лизис на гомогенизаторе FastPrep24 (M.P. Biomedicals) в течение 20 с при скорости «6.0» с последующей инкубацией клеток при 4 °С 2 мин. Цикл повторяли три раза до полного разрушения клеток. Лизаты отбирали и переносили в новые эппендорфы. Шарики промывали один раз буфером для лизиса, объем которого был равен или вдвое меньше объема лизата, и переносили в пробирку в лизатом. Образцы осаждали 10 мин при скорости 2 000 об./мин и переносили верхнюю фракцию в новые эппендорфы.

Общее количество белка в пробах измеряли с использованием методики М. Бредфорда [22], добавляя необходимое количество лизирующего буфера. Образцы для электрофореза содержали 30-50 μг тотального белка, к ним добавляли 4х буфер для нанесения (2х ТАЕ, 20 % (v/v) глицерин, 8 % SDS (w/v), бромфеноловый синий). Перед нанесением на гель пробы инкубировали в течение 5 мин при 25 °С.

Для электрофореза использовали 1,5 % (w/v) агарозный гель на основе буфера ТАЕ (0,04 М трис-ацетат, 0,002 ЭДТА) с 0,1 % (w/v) SDS. При подготовке геля SDS добавляли после полного растворения агарозы. В случае если агароза выпадала в осадок, раствор подогревался до ее растворения, при этом избегали вскипания раствора. Электрофорез проводили в буфере ТАЕ с 0,1 % (w/v) SDS, который предварительно охлаждался вместе с камерой для электрофореза и гелем во льду. Напряжение, подаваемое на камеру в ходе электрофореза, рассчитывали из соотношения 3 В на 1 см геля.

Перенос белков из агарозного геля на мембрану PVDF Hybond-P (Amersham) осуществляли с помощью капиллярного переноса в буфере TBS (100 мМ NaCl, 25 мМ Трис-НСl, рН = 7,6) [87].

2.6.3 Электрофорез белков в полиакриламидном геле с докипячиванием

Для проверки наличия агрегатов белка Sup35 у дрожжей использовали методику SDS-PAGE с докипячиванием [130]. Белок выделяли по протоколу SDD-AGE. Пробу перед нанесением на гель делили на 2 части, одну из которых инкубировали при 100 °С, другую — при 25 °С, и наносили на 10 % полиакриламидный гель. После того, как уровень краски достигал середины геля, электрофорез останавливали, гели доставали, запаивали лунки и кипятили гели 10 мин в емкости с водой. После этого собирали обратно установку и доводили электрофорез до конца.

2.6.4 Детекция белков с помощью гибридизации с антителами

Детекцию белков на мембране PVDF с помощью антител (вестерн-блоттинг) проводили следующим образом. Активированную мембрану инкубировали в течение 1 ч в буфере TTBS (0,8 % (w/v) NaCl, 0,02 М Трис-HCl, 0,1 % (v/v) Tween-20 (pH 7,6)) с добавлением 5 % (w/v) сухого обезжиренного молока. Эта и последующая процедуры осуществлялись в условиях постоянного перемешивания раствора. Затем мембрану помещали на 1 ч в раствор с первичными антителами. На следующем этапе мембрану отмывали от излишка антител буфером TTBS 2 раза по 10 мин. После этого инкубировали мембрану с вторичными антителами AntiRabbit из набора ECL Plus Western Blotting Reagent Pack (Amersham) (разведение в 5 % (w/v) молоке 1:25000). Затем снова смывали излишки антител, как было описано выше. Детекцию комплексов белков с антителами проводили с использованием набора ECL Plus Western Blotting Detection System (Amersham) и прибора GeneGnom 5 (Syngene Bio Imagine). Затем при необходимости мембрану окрашивали в растворе Кумасси (0,1 % Coomassie R 250, 50 % метиловый спирт, 50 % вода). Для детекции белка Sup35 использовали поликлональные антитела SE42901 [30] (разведение в 5 % (w/v) молоке 1:1000). Для детекции белка GFP использовали антитела Anti-Tag(CGY)FP (Evrogen, #AB121).

2.7 Методы микроскопии

Для приготовления временных препаратов дрожжевые культуры выращивали в жидкой селективной среде до логарифмической стадии роста ($OD_{600} = 0,2-0,4$). Далее индуцировали экспрессию репортерной конструкции в течение 2 ч после добавления $50 \mu\text{M}$ CuSO_4 в культуру (1 мл культуры до индукции отбирали в качестве контроля). После этого клетки осаждали, сливали супернатант, оставляя 5-10 $\mu\text{л}$, ресуспендировали клетки в остатке среды и наносили суспензию на предметное стекло. Использовали флуоресцентный микроскоп Zeiss Axio Scope.A1 с фотонасадкой Zeiss AxioCam ERc s5 и набор фильтров 38 (Filter set 38) (максимум возбуждения: 470 нм; максимум испускания: 525 нм) для визуализации Sup35-GFP.

2.8 Анализ данных

Количественную оценку вестерн-блоттинга проводили с помощью программного обеспечения ImageJ [190]. Для оценки различий использовали критерий суммы рангов Уилкоксона и U-критерий Манна-Уитни. Для статистической обработки результатов белковой трансформации использовали точный тест Фишера [63]. Различия считались статистически значимыми при уровне $p < 0,05$. Все расчеты проводили с использованием языка программирования R [178]

Для выравнивания последовательностей использовали программу UGENE (<https://ugene.net/>). Подбор праймеров и конструирование плазмид *in silico* осуществляли с использованием программ SnapGene Viewer (<https://www.snapgene.com/>) и UGENE.

Глава 3. Результаты

3.1 Эффекты нонсенс-мутаций в гене *SUP35* на жизнеспособность клеток дрожжей

Для изучения влияния нонсенс-мутаций в гене *SUP35* и приона [*PSI*⁺] на жизнеспособность *S. cerevisiae* мы выбрали четыре мутации *sup35-n* [217], которые были получены в работе С.В. Шабельской [30] (Рисунок 9). Эти мутации расположены в разных участках *SUP35* и приводят к синтезу N-терминальных фрагментов Sup35 (Sup35-n) разного размера (Рисунок 9, Таблица 3).



Рисунок 9. Расположение нонсенс-мутаций в гене *SUP35*. На схеме изображены ген *SUP35* и белок Sup35, у которого помечены домены N, M и C. Сверху цифрами обозначены нонсенс-мутации *sup35-n*, ниже — позиции мутаций в гене *SUP35* (указана нуклеотидная замена) и позиции возникающих в результате мутаций преждевременных стоп-кодонов (ПСК). Стрелками показаны относительные размеры укороченных белков Sup35-n, соответствующие мутантным аллелям; слева даны их примерные молекулярные массы.

3.1.1 Характеристика нонсенс-мутаций *sup35-n*

На первом этапе работы мы охарактеризовали фенотипическое проявление исследуемых аллелей *sup35-n* на новом генотипическом фоне по сравнению со штаммами, применявшимися ранее [30]. Мы получили штамм а8-7А-D832 [*LEU2*] с мутациями *sup35-n* путем плазмидного шаффлинга у исходного штамма а8-7А-D832 [*SUP35 URA3*] на среде 5-FOA. Клетки, несущие только мутантные аллели *sup35-n*, могли супрессировать все маркерные нонсенс-мутации — *ade1-14*, *his7-1* и *lys2-739* (Рисунок 10А).

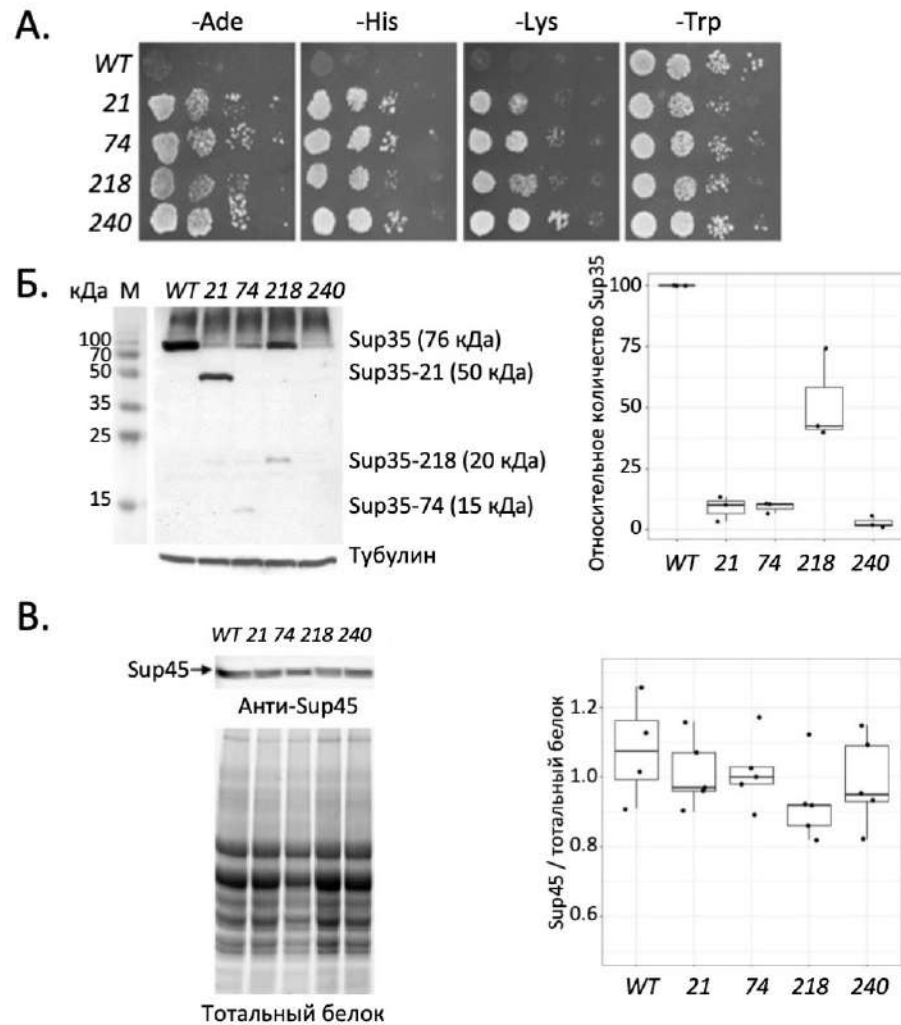


Рисунок 10. Характеристика nonsense-мутаций *sup35-n*. **А.** Мутации *sup35-n* приводят к omnipotentной nonsense-супрессии. Представлены серии десятикратных разведений клеток [*psi*⁺] [*sup35-n*] средах для детекции nonsense-супрессии после пяти дней инкубации. Рост на среде без триптофана (-Trp) был использован как контроль. Цифры слева от рисунка обозначают мутации *sup35-n*. **Б.** Мутации *sup35-n* приводят к снижению количества полноразмерного белка Sup35. Лизаты клеток штаммов, показанных на панели А, были проанализированы методом вестерн-блоттинга с антителами к белку Sup35 и тубулину в качестве контроля нанесения. Цифры сверху левой панели обозначают мутацию *sup35-n*. М — белковый маркер молекулярного веса в кДа. Слева от панели даны подписи для белковых полос Sup35 и Sup35-*n*. На графике показано относительное количество Sup35 у мутантов по сравнению с диким типом. Количество Sup35 в диком типе (WT) принято за 100%. **В.** Уровень белка Sup45 у мутантов [*sup35-n*] не отличается от дикого типа. Количество белка Sup45 нормализовали на тотальный белок, значения для которого получали путем обработки гелей после проведения электрофореза в системе гель-документации (ChemiDoc XRS+ System, Bio-Rad). В качестве статистического критерия применяли U-критерий Манна-Уитни, который показал статистически достоверное отсутствие разницы ($p < 0,05$) по количеству белка Sup45 у дикого типа и мутантов [*sup35-n*]. Каждая точка на графиках панелей Б и В соответствует одному образцу (независимому выделению) белка; линия отмечает медианный уровень

Используя метод SDS-PAGE, мы оценили количество полноразмерного белка Sup35 и его фрагментов Sup35-*n* у клеток штамма a8-7A-D832

[*sup35-n LEU2*]. Все мутанты характеризовались снижением уровня белка Sup35 (Рисунок 10Б). При этом его наименьшее количество детектировали у штамма в присутствии аллеля *sup35-240*, что соответствует данным, полученным ранее [30]. В случае клеток, несущих мутации *sup35-21*, *sup35-74* или *sup35-218*, белки Sup35-n были детектированы и их размер соответствовал предполагаемому — 50, 15 и 20 кДа соответственно. Белок Sup35-240 не удалось детектировать. Мы предполагаем, что используемые в работе антитела к белку Sup35 не узнают эпитоп, который локализован в пределах N-конца. Еще одной причиной могла бы стать повышенная деградация белка Sup35-240, поскольку известно что NM-домен белка Sup35 является субстратом для протеасомной деградации [105]. Тем не менее мы предполагаем, что белок Sup35-240 присутствует в соответствующих клетках, поскольку как наличие мутации *sup35-240*, так и сверхпродукция белка Sup35-240, слитого с GFP, приводит к элиминации приона [*PSI*⁺] (см. далее).

Белки Sup45 и Sup35 образуют комплекс в процессе терминации трансляции. Для того, чтобы проверить, изменяется ли уровень белка Sup45 в присутствии мутаций *sup35-n*, мы провели SDS-PAGE с лизатами мутантов [*sup35-n*] и вестерн-блотинг с соответствующими антителами. Количество белка Sup45 у клеток с мутациями *sup35* не отличалось от дикого типа (Рисунок 10В).

3.1.2 Мутации *sup35-n* могут приводить к появлению более стабильного и функционально активного белка Sup35 в клетках дрожжей

У клеток [*sup35-240*] по сравнению с остальными мутантами [*sup35-n*] наблюдалось наименьшее количество полноразмерного Sup35, при этом они не отличались от других мутантов и дикого типа по жизнеспособности (Рисунок 10А). Мы предположили, что аминокислотный остаток, который включается в последовательность белка при нонсенс-супрессии мутации *sup35-240*, улучшает функциональные свойства Sup35. С целью проверки этой гипотезы мы проанализировали эффекты замен глутамина (Q) на лизин (K) или тирозин (Y) в 56-м положении а.к. последовательности Sup35. Ранее было показано, что именно

а.к.о. Q, K, Y использует дрожжевая клетка в случае нонсенс-супрессии кодона UAA [16]. Эксперимент, который позволил оценить стабильность и функциональность белка Sup35 с заменами Q56K и Q56Y, был проведен совместно с С.А. Бондаревым.

По литературным данным Sup35 — стабильный белок, однако его точный период полураспада мы не обнаружили. Есть данные, что он длится 2 часа [105] или даже около 33 часов [40]. В связи с этим мы проводили длительную (до 20 часов) инкубацию с циклогексимином. Скорость деградации белка Sup35-Q56Y была такая же, как у Sup35 дикого типа, в то время как белок Sup35-Q56K был стабильнее (Рисунок 11А).

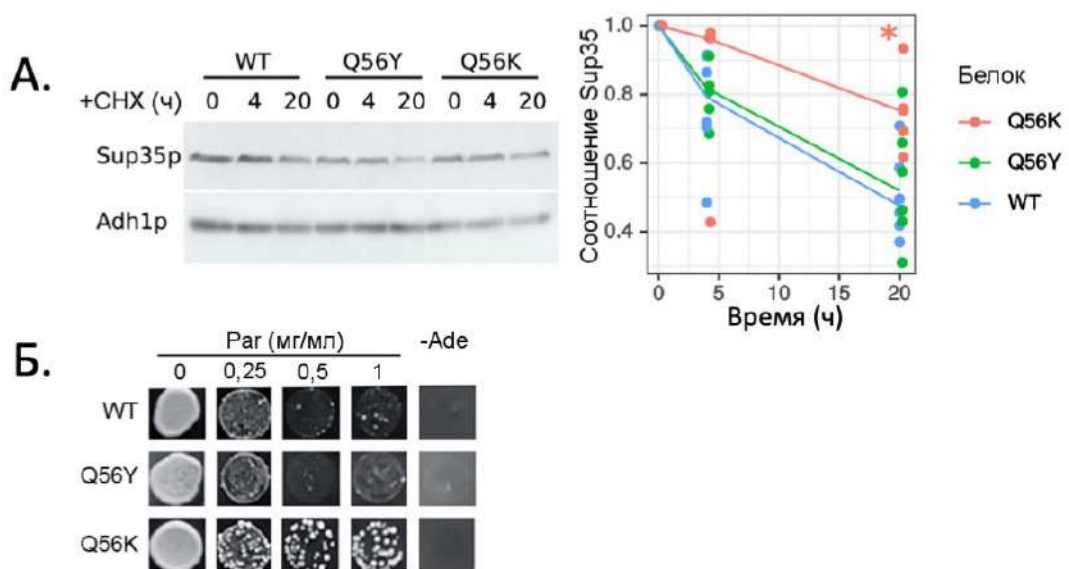


Рисунок 11. В результате нонсенс-супрессии мутаций *sup35-n* может возникать более стабильный и функциональный полноразмерный белок Sup35. А. Повышение стабильности Sup35 в случае мутации *sup35-240*. В штаммах 7A-D832, несущих плазмиду pRSU1 либо с геном *SUP35* дикого типа (WT), либо с одной из мутантных аллелей: *sup35-Q56Y* (Q56Y) или *sup35-Q56K* (Q56K), измеряли количество белка Sup35 после инкубации в жидкой среде YPD, содержащей циклогексимином (CHX) в концентрации 100 $\mu\text{г/мл}$ в течение 0, 4 или 20 часов. Количество белка Sup35 в каждом образце в нулевой точке было принято за 1.0, после чего было рассчитано относительное количество Sup35. Б. В присутствии белка Sup35-Q56K у клеток дрожжей снижается чувствительность к паромомицину. Рост трансформантов (см. панель А) оценивали на среде YPD, содержащей различные концентрации паромомицина (Par), после 5 дней инкубации при температуре 30 °С. Высевы каплями проводили, используя суспензии дрожжевых клеток одинаковой плотности. Проверено по три независимых трансформанта для каждого варианта белка Sup35, приведены репрезентативные результаты.

Одним из плейотропных эффектов мутаций *sup35* является снижение скорости роста клеток *S. cerevisiae* на среде с паромомицином [98],

аминогликозидным антибиотиком, который связывается с рРНК и воздействует на точность трансляции, а также фенотипически супрессирует нонсенс-мутации в дрожжах. Клетки, содержащие белки Sup35-Q56Y и Sup35-Q56K, были проверены на чувствительность к паромомицину. Этот эксперимент был проведен совместно с О.М. Землянко. В присутствии белков Sup35 и Sup35-Q56Y дрожжи были способны расти на среде с паромомицином в концентрации до 0,25 мг/мл. В случае белка Sup35-Q56K клетки выживали при более высоких концентрациях антибиотика — до 1 мг/мл (Рисунок 11Б).

Таким образом, полноразмерный белок Sup35, который синтезируется в случае «прочитывания» преждевременного стоп-кодона, как значащего, может функционировать лучше, чем белок дикого типа. Такой эффект может иметь место в случае остальных мутантов с *sup35-n*. Также важно отметить, что сами мутации *sup35-Q56Y* и *sup35-Q56K* не обладают супрессорным фенотипом (Рисунок 11Б).

3.1.3 Короткие белки Sup35-n стабильны и сохраняются длительное время после блокирования общего синтеза белка в клетке

Мы оценили стабильность белков Sup35-n в штаммах 7A-D832 [*SUP35 LEU2*] и [*sup35-n LEU2*] после обработки клеток циклогексимидом. Белки Sup35-21 и Sup35-218 стабильны, и могут быть детектированы спустя 4 часа после блокирования синтеза общего белка в клетке (Sup35-21) и даже спустя 20 часов (Sup35-218) (Рисунок 12А).

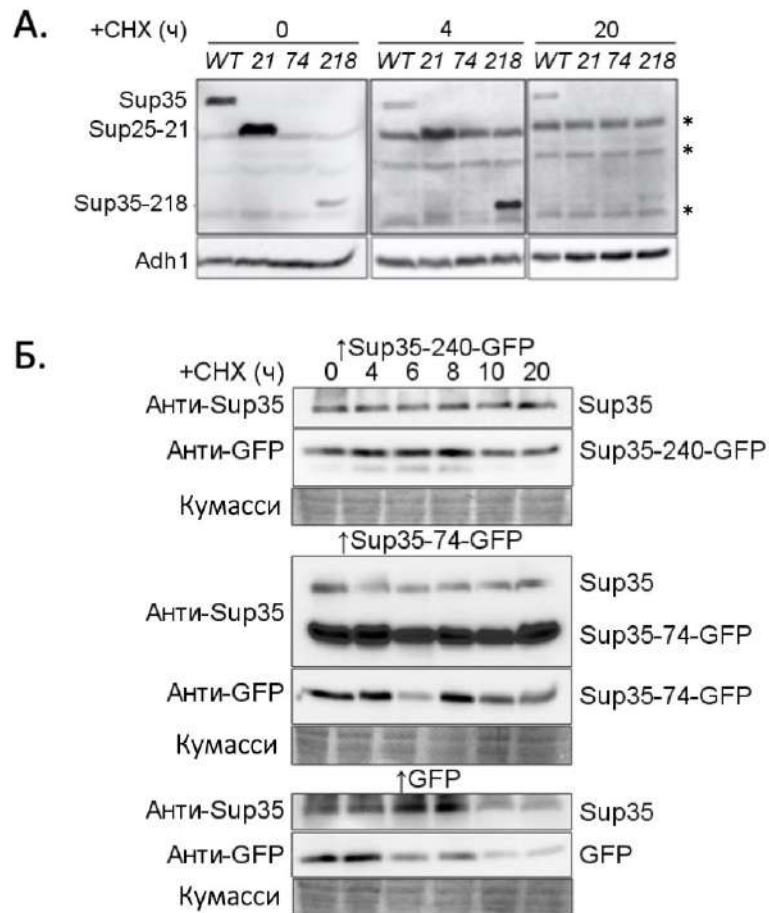


Рисунок 12. Стабильность белков Sup35-n после блокирования общего синтеза белка в клетке. **А.** Белки Sup35-21 и Sup35-218 стабильны и сохраняются длительное время после обработки циклогексимидом. Представлены результаты вестерн-блоттинга с антителами к белку Sup35 из лизатов штаммов 7A-D832, несущих плазмиду pRSU1 либо с геном *SUP35* дикого типа, либо с одной из мутантных аллелей *sup35*, после инкубации в среде YPD, содержащей 100 мкг/мл циклогексимида (CHX), в течение 0, 4 и 20 ч. Были использованы штаммы, показанные на Рисунок 10А. В случае мутации *sup35-74* короткий белок детектировать не удалось. В качестве контроля нанесения использовали белок Adh1. Символом (*) справа от рисунка помечены дополнительные белковые полосы (помимо Sup35), которые возникают из-за неспецифического взаимодействия используемых антител с другими белками. Чтобы улучшить видимость полос белка Sup35, мы увеличили контрастность изображений на 4 и 20 ч, ввиду чего неспецифические полосы также стали значительно ярче. **Б.** Химерные белки Sup35-240-GFP и Sup35-74-GFP сохраняются длительное время после блокирования синтеза общего белка в клетке, и их стабильность не зависит от присутствия метки GFP. Для индукции промотора *CUP1*, который регулирует синтез исследуемых конструкций с GFP, клетки инкубировали в селективной среде, содержащей 50 мкМ CuSO₄ в течение 2 ч. Количество белка Sup35 или его N-терминальных фрагментов, слитых с GFP, определяли у штамма 7A-D832, несущего плазмиду pRSU1 с геном *SUP35* и одну из плазмид с репортерными конструкциями: RS316-pCUP-SUP35-240-GFP (Sup35-240-GFP) или pRS316-pCUP-SUP35-74-GFP (Sup35-74-GFP), после инкубации в среде SC-Leu-Ura с циклогексимидом в концентрации 100 мкг/мл в течение 0–20 ч. Конструкция, экспрессирующаяся с плазмиды pRS316-pCUP-GFP (GFP), была использована в качестве контроля, а окраска мембраны кумасси после вестерн-блоттинга — как контроль нанесения.

Белок Sup35-74 детектировать в этом эксперименте не удалось. По этой причине, а также чтобы проверить стабильность белка Sup35-240, мы повторили эксперимент с циклогексимином для химерных конструкций, в которых указанные фрагменты Sup35 были слиты с репортерным белком GFP. Белок Sup35-240-GFP, который детектировали только с помощью антител анти-GFP демонстрирует стабильность, сходную с белком Sup35 дикого типа (Рисунок 12Б, верхняя панель). Белок Sup35-74-GFP узнается как анти-GFP, так и анти-Sup35 антителами, и стабилен после инкубации в присутствии циклогексимида в течение 20 часов (Рисунок 12Б, средняя панель). Стабильность химерных белков не может быть объяснена присутствием метки GFP, поскольку сам белок GFP менее стабилен, чем обе конструкции (Рисунок 12Б, нижняя панель). Полученные результаты согласуются с опубликованными данными, где длительность полужизни белка GFP оценивалась приблизительно в 7 часов [162].

3.1.4 Доминантное проявление мутаций *sup35-n*

Для того, чтобы описать проявление мутаций *sup35-n* в диплоидных клетках, мы скрестили штаммы a8-7A-D832 [*psi*⁻] [*sup35-n*], с изогенным штаммом 7A-D832 [*psi*⁻] [*SUP35*]. Полученные диплоидные клетки обладали нонсенс-супрессорным фенотипом, что подтверждает присутствие в них мутантных аллелей *sup35-n* (Рисунок 13А). Штаммы не имели значительных отличий по уровню белка Sup35 (Рисунок 13Б) и Sup45 (Рисунок 13В). Примечательно, что в присутствии двух аллелей гена *SUP35* белки Sup35-n мы не обнаружили, в то время как после потери плазмиды pRSU2 [*URA3*] с геном *SUP35* дикого типа их детектировали у штаммов с мутациями *sup35-21*, *sup35-218* и *sup35-74* (Рисунок 13Б).

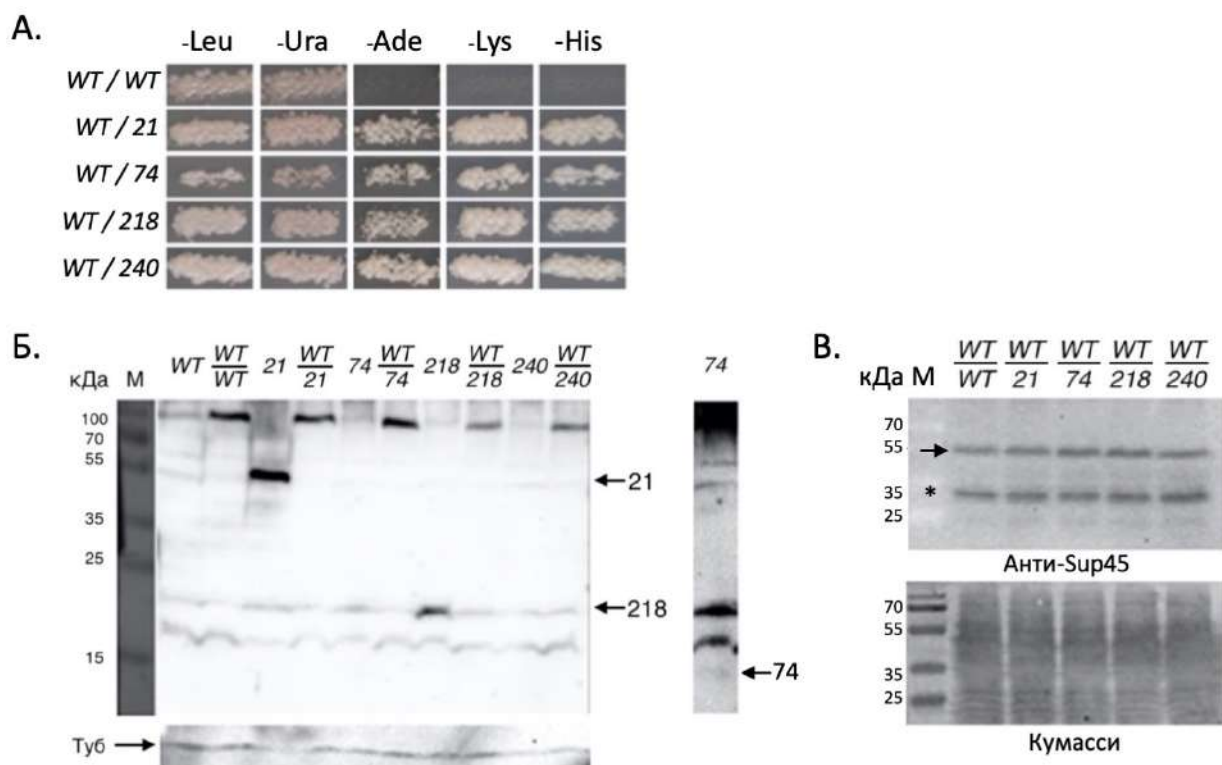


Рисунок 13. Доминантное проявление мутаций *sup35-n*. **А.** Диплоидные штаммы [*psi*⁻] [*SUP35/sup35-n*] обладают нонсенс-супрессорным фенотипом. Было протестировано по четыре независимых диплоидных штамма, представлены репрезентативные результаты после 4 дней инкубации при 26 °С. Подписи слева обозначают комбинацию аллеля *SUP35* дикого типа (*WT*) с мутациями *sup35-n*. **Б.** Наличие белков Sup35-n, которые синтезируются в присутствии мутаций *sup35-n* в клетке, зависит от присутствия дополнительной плазмиды [*URA3*] с геном *SUP35* дикого типа. Лизаты диплоидных штаммов [*psi*⁻], содержащих одну плазмиду [*sup35-n*] или [*SUP35*] или плазмиды [*SUP35/sup35-n*], анализировали при помощи вестерн-блоттинга с антителами анти-Sup35. М — маркер молекулярной массы белка. Фрагменты, соответствующие короткому белку Sup35, отмечены стрелками. Тубулин (Туб) использовали в качестве контроля нанесения. Показана отдельная полоса для короткого белка Sup35-74 после усиления контраста (взята из геля, показанного слева). **В.** Диплоидные штаммы, представленные на панели А, не отличаются по количеству белка Sup45. Лизаты из диплоидных штаммов [*psi*⁻] использовали для вестерн-блоттинга с антителами анти-Sup45. Стрелкой показаны полосы белка Sup45. Символом (*) помечены дополнительные белковые полосы (помимо Sup45), которые возникают из-за неспецифического взаимодействия используемых антител с другими белками. Окраску мембраны кумасси использовали как контроль нанесения.

3.2 Влияние нонсенс-мутаций в гене *SUP35* на поддержание приона [*PSI*⁺]

3.2.1 Общая схема эксперимента

Ранее было показано, что нонсенс-мутации в гене *SUP45* приводят к синтетической летальности в сочетании с сильным вариантом приона [*PSI*⁺] даже в присутствии аллеля *SUP45* дикого типа у дрожжей *S.cerevisiae* [114]. Нашей задачей стало выявить эффекты мутаций в гене *SUP35* на жизнеспособность

клеток [PSI^+]. Мы использовали два экспериментальных подхода для сочетания мутаций $sup35-n$ и приона у дрожжей: (1) плазмидный шаффлинг у гаплоидных и диплоидных штаммов (Рисунок 14А) и (2) скрещивание гаплоидных штаммов (Рисунок 14Б).

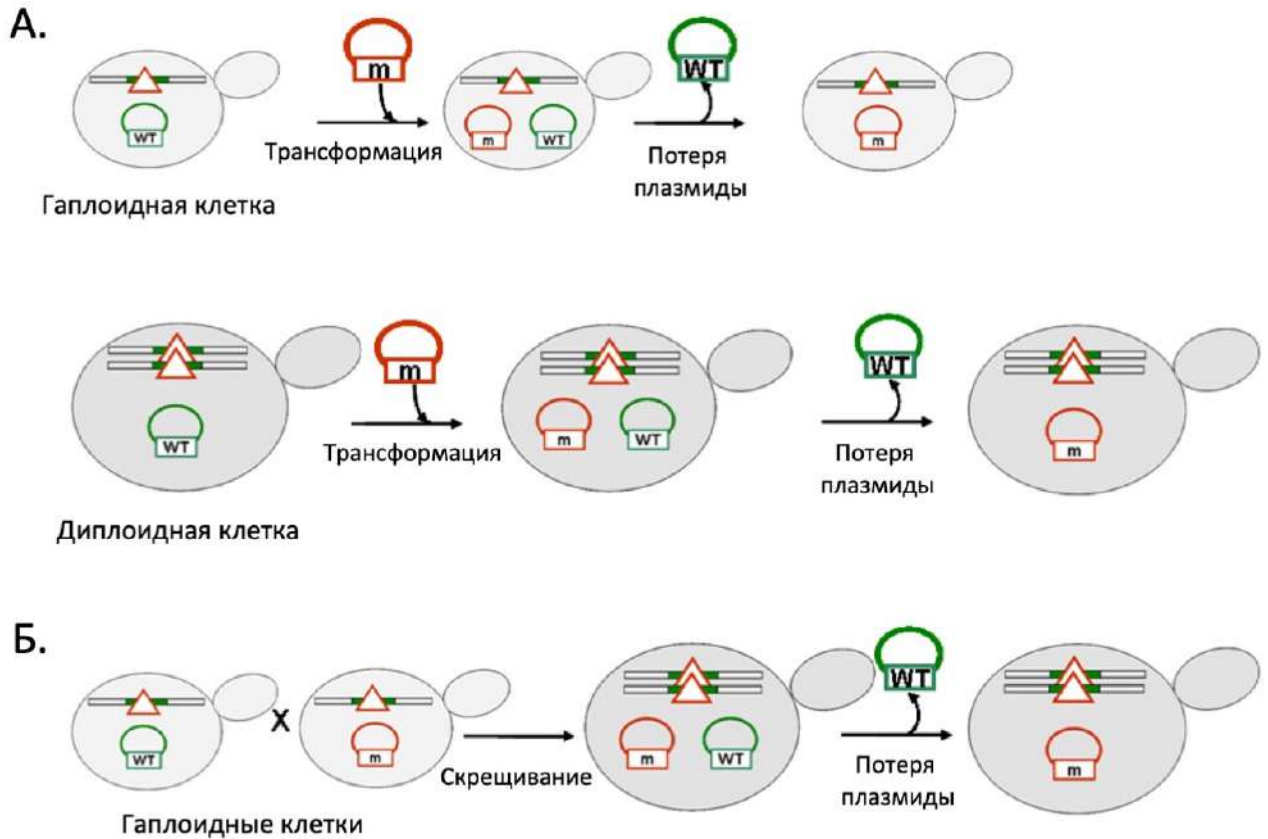


Рисунок 14. Экспериментальные подходы, примененные в работе для комбинирования мутаций $sup35-n$ и приона [PSI^+]. А. Гаплоидные штаммы [PSI^+], содержащие ген $SUP35$ дикого типа на плазмиде $pRSU2$ [$URA3$], трансформировали плазмидами $pRSU1$ [$LEU2$], несущими аллели $sup35-n$. Полученных трансформантов печатали на среду 5-FOA для отбора клонов, которые потеряли плазмиду [$SUP35 URA3$] (верхняя панель). Ту же процедуру проводили для диплоидных штаммов [PSI^+] (нижняя панель). Б. Гаплоидный штамм [PSI^+], несущий ген $SUP35$ дикого типа на плазмиде $pRSU2$ [$URA3$], скрещивали с производными штамма [psi^-], несущими аллели $sup35-n$ на плазмиде $pRSU1$ [$LEU2$]. Полученные диплоидные клетки печатали на среду 5-FOA для отбора клонов, которые потеряли плазмиду [$SUP35 URA3$]. В качестве контроля во всех случаях использовали штамм [psi^-]. Аллель $SUP35$ (WT) помечена зеленым цветом, мутантные аллели $sup35-n$ (m) — красным. Красный треугольник обозначает делецию гена $SUP35$ на хромосоме.

В первом случае гаплоидные или диплоидные клетки [PSI^+], которые содержат «сильный» вариант приона (Рисунок 15), приобретали мутации $sup35-n$ вместо гена $SUP35$ дикого типа за счет трансформации с последующей потерей исходной плазмиды на среде 5-FOA (Рисунок 14А). Во втором случае гаплоидный штамм [PSI^+] [$SUP35$], скрещивали с изогенными гаплоидными штаммами [psi^-]

[*sup35-n*]. После этого также производили потерю плазмиды с геном *SUP35* дикого типа на среде 5-FOA (Рисунок 14Б). В качестве контроля для всех случаев использовали изогенный штамм [*psi*⁻] (Рисунок 15).

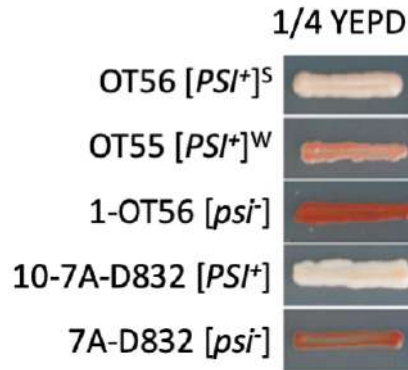


Рисунок 15. Штамм 10-7A-D832 содержит «сильный» вариант приона [*PSI*⁺]. Для сравнения представлен рост изогенных штаммов OT56 или OT55, несущих «сильный» ([*PSI*⁺]^S) и «слабый» ([*PSI*⁺]^W) варианты приона, соответственно [165], и рост штаммов, использованных в настоящей работе, на среде 1/4 YPD после 4 дней инкубации при 30 °С.

3.2.2 Прион [*PSI*⁺] совместим с мутациями *sup35-n* в присутствии аллеля *SUP35* дикого типа у гаплоидных и диплоидных штаммов

Для того, чтобы проверить, могут ли изучаемые мутации *sup35-n* поддерживать жизнеспособность гаплоидных клеток [*PSI*⁺], мы проводили трансформацию изогенных штаммов 7A-D832 [*psi*⁻] и 10-7A-D832 [*PSI*⁺] плазмидами pRSU1 [*sup35-n*]. Важно отметить, что трансформация штамма [*PSI*⁺] проходила с меньшей эффективностью, кроме того, трансформанты обладали сниженной скоростью роста по сравнению с штаммом [*psi*⁻] (Рисунок 16А). Ингибирование роста штамма, который содержит две аллели гена *SUP35* дикого типа (*WT/WT* на Рисунок 16А) может объясняться прионной токсичностью, вызванной повышенным содержанием белка Sup35 в клетке и захватом его в агрегаты [*PSI*⁺] (см. обзор [141]). В случае же мутаций *sup35-n* в клетках не происходит значительного увеличения общего количества белка Sup35. Примечательно, что трансформанты с *sup35-240*, характеризовались повышенной скоростью роста по сравнению с диким типом или другими мутантами.

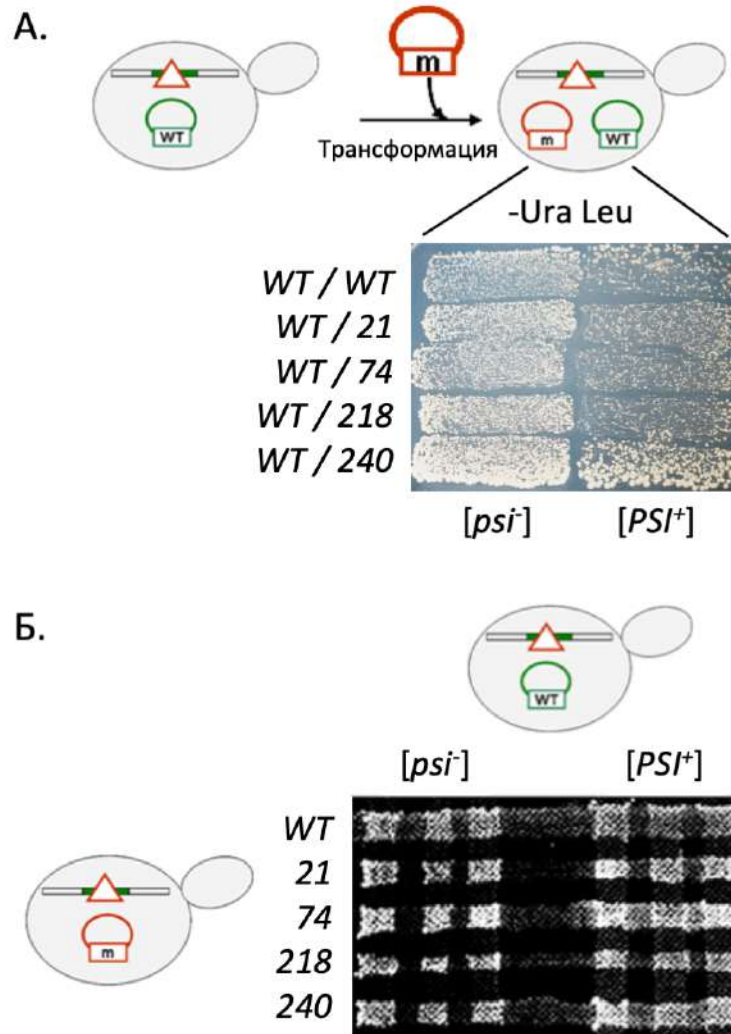


Рисунок 16. Прион $[PSI^+]$ совместим с мутациями $sup35-n$ в присутствии аллеля $SUP35$ дикого типа. **А.** Гаплоидные клетки $[PSI^+]$ $[SUP35]$ жизнеспособны в присутствии мутаций $sup35-n$. Штаммы 7A-D832 $[psi^-]$ и 10-7A-D832 $[PSI^+]$, несущие плазмиду pRSU2 $[URA3]$ с геном $SUP35$ дикого типа, трансформировали плазмидами pRSU1 $[LEU2]$ с мутантными аллелями $sup35-n$. В каждом случае для трансформации брали одинаковое количество клеток и ДНК. В конце процедуры высевали одинаковое количество суспензии клеток на чашки с селективной средой. Рост трансформантов оценивали на 7 день инкубации при 26 °C. **Б.** Диплоидные клетки $[PSI^+]$ $[SUP35]$ жизнеспособны в присутствии мутаций $sup35-n$. Показан результат скрещивания гаплоидных штаммов 7A-D832 $[psi^-]$ $[SUP35]$ и 10-7A-D832 $[PSI^+]$ $[SUP35]$ (вертикальные линии) со штаммами а8-7A-D832 $[psi^-]$ $[sup35-n]$ (горизонтальные линии). Фотографии чашек сделаны после пяти дней инкубации при температуре 26 °C.

Для того, чтобы проверить, поддерживают ли мутации $sup35-n$ жизнеспособность диплоидных клеток $[PSI^+]$ мы проводили скрещивания штаммов 10-7A-D832 $[PSI^+]$ и 7A-D832 $[psi^-]$, содержащих ген $SUP35$, со штаммами а8-7A-D832 $[psi^-]$ $[sup35-n]$. Именно такой метод анализа несовместимости был использован ранее при обнаружении синтетической

летальности мутаций *sup45* и приона [*PSI*⁺] [114]. Во всех случаях были получены жизнеспособные диплоидные штаммы [*PSI*⁺] [*SUP35*] [*sup35-n*] (Рисунок 16Б). Таким образом в используемой системе наши результаты показали отсутствие синтетической летальности мутаций *sup35-n* и приона [*PSI*⁺] в присутствии аллеля *SUP35* дикого типа.

3.2.3 Гаплоидные и диплоидные штаммы сохраняют агрегаты приона [*PSI*⁺] в присутствии мутаций *sup35-n* и гена *SUP35* дикого типа

Анализ супрессорного фенотипа у штаммов дрожжей, содержащих в своем геноме нонсенс-мутацию *adel-14* часто используется для проверки присутствия приона [*PSI*⁺] (см. обзор [141]). Поскольку мутанты *sup35-n* обладают таким же супрессорным фенотипом, как и прион [*PSI*⁺], наличие агрегатов Sup35 мы оценивали с помощью SDD-AGE.

В мутантных клетках *sup35-n* наряду с полноразмерным белком Sup35 присутствует его укороченный вариант Sup35-n. Мы предположили, что в случае сохранения приона у мутантов агрегаты [*PSI*⁺] могут отличаться от агрегатов Sup35 дикого типа за счет встраивания Sup35-n как в гаплоидных, так и диплоидных штаммах [*PSI*⁺].

В результате анализа агрегаты Sup35 были детектированы во всех гаплоидных клетках [*PSI*⁺] [*SUP35/sup35-n*], при этом в контрольном штамме [*psi*⁻] они отсутствовали (Рисунок 17А). Кроме того, размер агрегатов Sup35 у мутантных клеток не отличался от дикого типа. Таким образом, в присутствии гена *SUP35* дикого типа, мутации *sup35-n* не влияют на свойства приона [*PSI*⁺] в гаплоидных клетках.

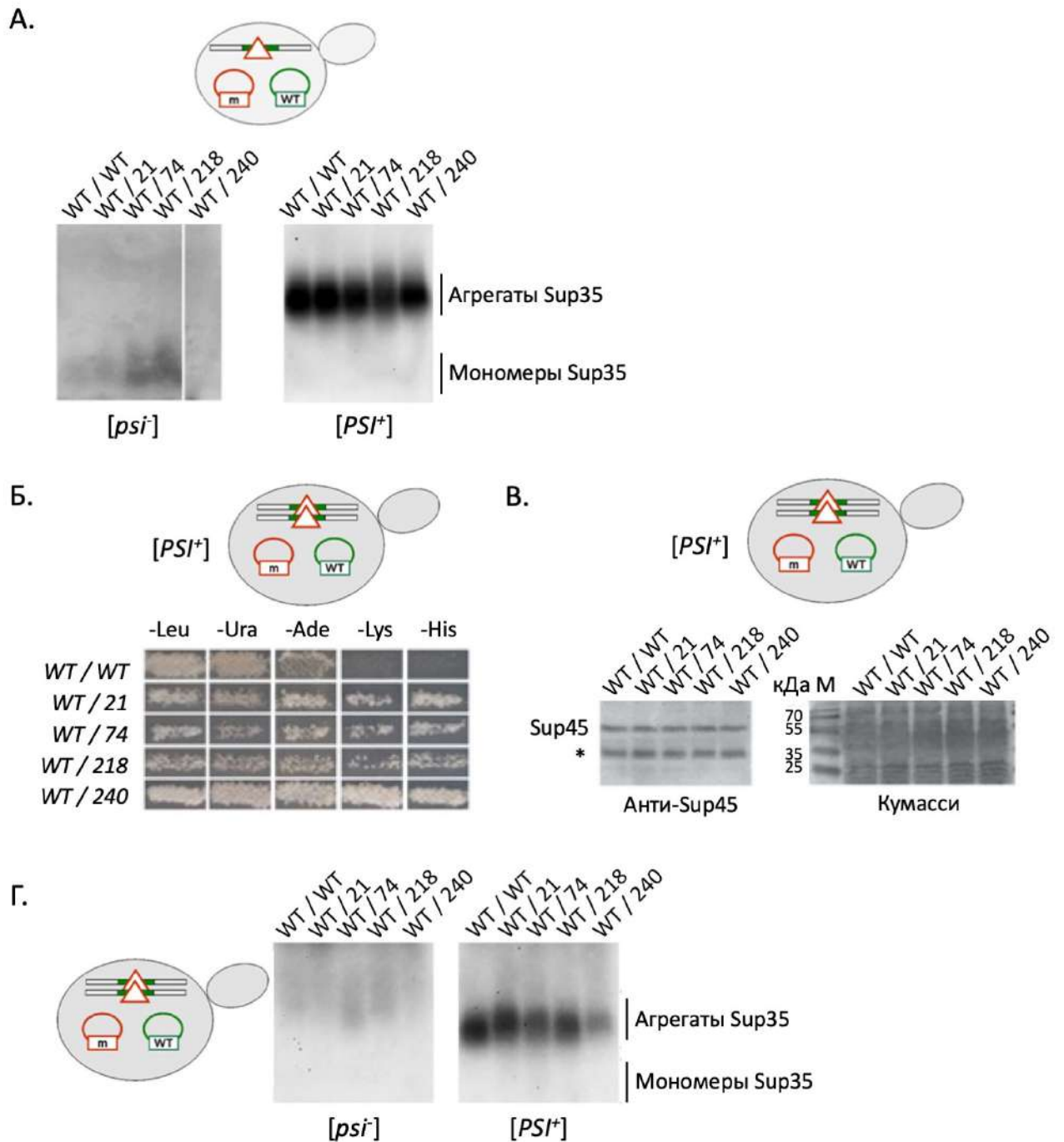


Рисунок 17. Гаплоидные и диплоидные штаммы $[PSI^+]$ сохраняют агрегаты белка Sup35 в присутствии мутаций $sup35-n$ и гена $SUP35$ дикого типа. А. Нонсенс-мутации $sup35-n$ не влияют на размер агрегатов $[PSI^+]$ в присутствии аллеля $SUP35$ дикого типа у гаплоидных штаммов. Приведены результаты SDD-AGE с последующим вестен-блоттингом с антителами анти-Sup35 для лизатов из трансформантов дрожжей, несущих две плазмиды — с геном $SUP35$ дикого типа и мутацией $sup35-n$, соответственно. **Б.** Диплоидные штаммы $[PSI^+]$ в присутствии одновременно мутаций $sup35-n$ и гена $SUP35$ проявляют нонсенс-супрессорный фенотип. Показан рост штаммов в течение 5 дней (26 °C) на селективных средах без лейцина (– Leu) и урацила (– Ura), который служит контролем присутствия двух плазмид с аллелями гена $SUP35$. Рост на средах без аденина (– Ade), гистидина (– His) и лейцина (– Lys) свидетельствует о наличии сильных супрессоров в штаммах. В каждом случае было протестировано по 10 трансформантов, показаны репрезентативные результаты. **В.** Диплоидные штаммы $[PSI^+]$ в присутствии мутаций $sup35-n$ и гена $SUP35$ одновременно не различаются по количеству белка Sup45. Лизаты из трансформантов, представленных на панели В, были проверены вестерн-

блоттингом с антителами анти-Sup45p. Символом (*) помечены дополнительные дополнительные белковые полосы (помимо Sup45), которые возникают из-за неспецифического взаимодействия используемых антител с другими белками. Окраска геля с кумасси была использована как контроль нанесения. Г. Диплоидные штаммы [*PSI*⁺] в присутствии мутаций *sup35-n* и аллеля гена *SUP35* дикого типа характеризуются наличием агрегатов белка Sup35. Лизаты из диплоидных клеток, показанных на панели Б были проверены методом SDD-AGE с последующим вестерн-блоттингом с антителами к белку Sup35.

У диплоидных штаммов [*PSI*⁺] [*sup35-n*] перед проверкой агрегатов Sup35 мы проконтролировали нонсенс-супрессорный фенотип (Рисунок 17Б) и уровень белка Sup45, который, как и в предыдущих подобных экспериментах, у мутантов не отличался от дикого типа (Рисунок 17В). По результатам SDD-AGE у всех мутантов [*PSI*⁺] [*sup35-n*] прион сохранялся (Рисунок 17Г). Можно отметить некоторую гетерогенность по размеру агрегатов Sup35, а также по количеству включенного в них белка. Кроме того, у клеток [*PSI*⁺] [*sup35-240*] агрегатов было меньше, чем у остальных мутантов. Мы повторяли SDD-AGE с лизатами заново полученных диплоидных штаммов [*PSI*⁺] [*sup35-n*] несколько раз, но не обнаружили достоверной разницы по содержанию агрегатированного Sup35 между ними.

3.2.4 Нонсенс-мутации *sup35-21*, *-74* и *-218* приводят к летальности у гаплоидных штаммов [*PSI*⁺]

Как показано выше, мы провели проверку фенотипа и наличия агрегатов Sup35 у гаплоидных и диплоидных штаммов [*PSI*⁺] [*sup35/SUP35*] и не обнаружили у них отличий от штаммов дикого типа [*PSI*⁺] [*SUP35/SUP35*]. Мы предположили, что эффекты мутаций могут маскироваться в присутствии аллеля *SUP35*, поэтому следующей задачей стало получение мутантов [*PSI*⁺], несущих только аллели *sup35-n*.

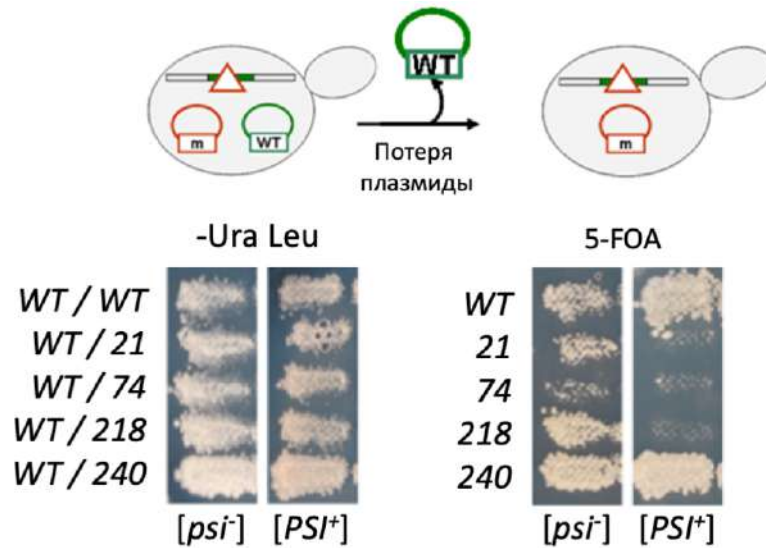


Рисунок 18. Комбинация приона $[PSI^+]$ с мутациями $sup35-21$, $sup35-74$ или $sup35-218$ приводит к летальности гаплоидных клеток. Штаммы $[psi^-]$ 7A-D832 и $[PSI^+]$ 10-7A-D832 [$SUP35/sup35-n$], были отпечатаны на среду 5-FOA для отбора клеток, сохранивших только плазмиду [$LEU2 sup35-n$]. Только в случае мутации $sup35-240$ после пяти дней инкубации при 26 °C были отобраны жизнеспособные клетки $[PSI^+]$.

У гаплоидных штаммов [$SUP35/sup35-n$] была произведена потеря плазмиды [$SUP35 URA3$] на среде 5-FOA. Мы наблюдали несовместимость мутаций $sup35-21$, $sup35-74$ и $sup35-218$ и приона $[PSI^+]$ — такие клетки оказались нежизнеспособными (Рисунок 18). Контрольные трансформанты $[psi^-]$ [$sup35-n$] были способны расти на среде 5-FOA, но с разной эффективностью. Хуже всего рост на среде с 5-FOA был у штаммов с мутациями $sup35-21$ и $sup35-74$.

3.2.5 Мутация $sup35-240$ приводит к изгнанию приона $[PSI^+]$ в гаплоидных штаммах в отсутствие гена $SUP35$ дикого типа

У жизнеспособных клеток $[PSI^+]$, отобранных у гаплоидного штамма $sup35-240$ (Рисунок 18) мы проверили нонсенс-супрессорный фенотип и наличие агрегатов Sup35. Отобранные клетки были способны супрессировать нонсенс-мутации $ade1-14$, $his7-1$ и $lys2-739$ (Рисунок 19А), что говорит о сохранении аллеля $sup35-240$ после потери плазмиды с геном $SUP35$. Наличие мутации также подтвердили, проведя SDS-PAGE с лизатами гаплоидных клеток $[PSI^+]$ [$sup35-240$] (Рисунок 19Б). Мутантный штамм содержал сниженное количество полноразмерного белка Sup35 по сравнению с клетками дикого типа. По результатам SDD-AGE у гаплоидных штаммов $[PSI^+]$ $sup35-240$ отсутствуют

агрегаты Sup35 (Рисунок 19В). Таким образом, эти штаммы, сохранив мутацию, потеряли прион.

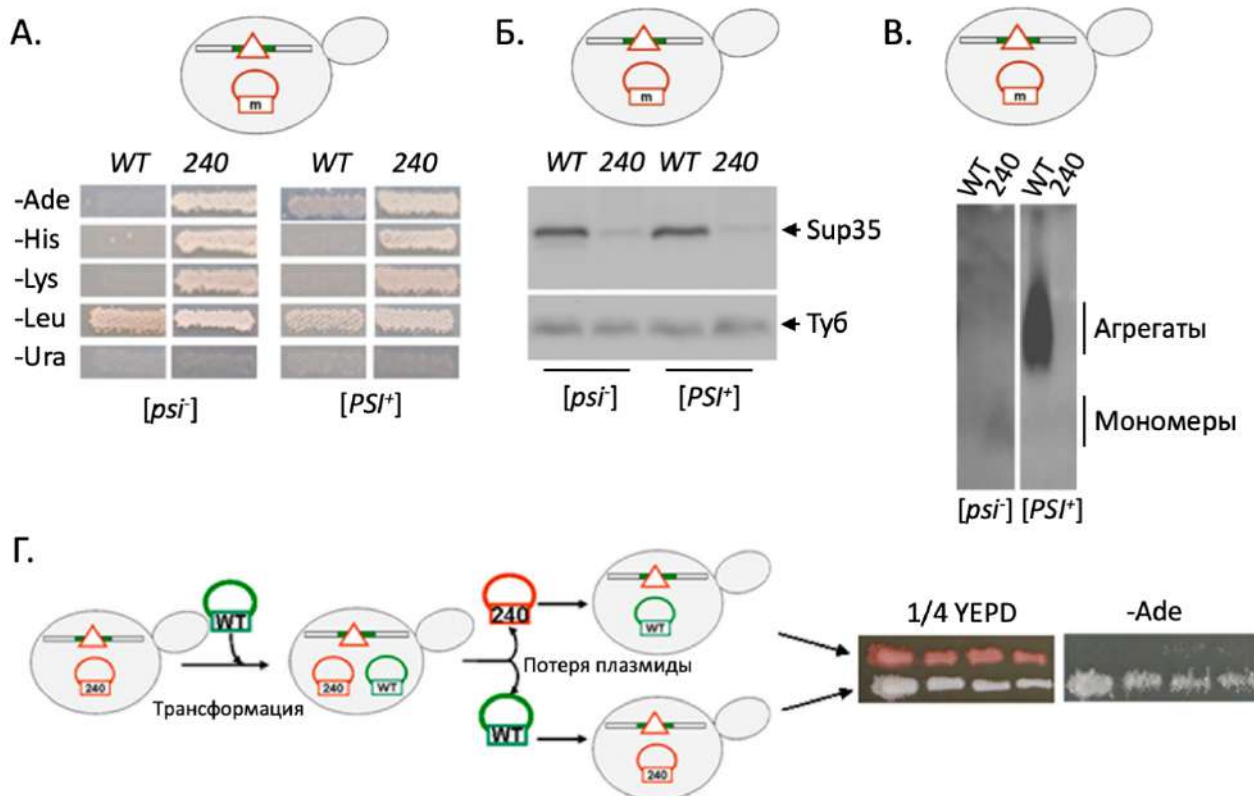


Рисунок 19. Мутация *sup35-240* приводит к изгнанию приона *[PSI⁺]*. А. Мутация *sup35-240* сохраняется в гаплоидных штаммах *[PSI⁺]* и *[psi⁻]* после потери плазмиды с геном *SUP35* дикого типа. Клетки, отобранные со среды 5-FOA (Рисунок 18) были отпечатаны на среды без аденина (-Ade), гистидина (-His) и лизина (-Lys) для проверки нонсенс-супрессорного фенотипа, а также на среды без лейцина (-Leu) и урацила (-Ura) для контроля присутствия плазмиды *[LEU2]* и отсутствия плазмиды *[URA3]*, соответственно. Представлен рост штаммов в течение пяти дней при температуре 26 °С. Б, В. Наличие мутации *sup35-240* в гаплоидных штаммах *[PSI⁺]* и *[psi⁻]* подтверждается снижением количеством белка Sup35 в клетках (Б) и приводит к потере агрегатов Sup35 (В). Лизаты из клеток, отобранных со среды 5-FOA (Рисунок 18), использовали для вестерн-блоттинга с антителами к белку Sup35. Для контроля нанесения использовали гибридизацию с антителами к тубулину (Туб). Оба белка указаны стрелками. Г. Мутация *sup35-240* приводит к потере приона у гаплоидных штаммов *[PSI⁺]*. Гаплоидные штаммы *[PSI⁺]*, отобранные со среды 5-FOA (Рисунок 18) ретрансформировали плазмидой, несущей ген *SUP35* дикого типа. После этого у полученных трансформантов была произведена неселективная потеря плазмид: *[sup35-n LEU2]* или *[SUP35 URA3]*. Представлен рост клеток, несущих только одну плазмиду, на среде 1/4 YPD и минимальной среде без аденина (-Ade) после пяти дней инкубации при 26 °С.

Для проверки предположения о том, что мутация *sup35-240* приводит к изгнанию приона *[PSI⁺]* мы провели эксперимент, в котором клетки *[sup35-240 LEU2]* заново трансформировали плазмидой *[SUP35 URA3]* (Рисунок 19Г). После этого была произведена случайная потеря плазмид на полной среде YPD. Клетки, сохранившие плазмиду *[sup35-240 LEU2]* имели нонсенс-супрессорный фенотип,

в то время как клетки с плазмидой [*SUP35 URA3*] характеризовались его отсутствием (Рисунок 19Г).

Таким образом, в гаплоидных штаммах [*PSI*⁺] плазмиды, несущие мутантные аллели *sup35-21*, *sup35-74* и *sup35-218*, неспособны заместить плазмиду с геном *SUP35* дикого типа, что приводит к летальности соответствующих клеток на среде 5-FOA. В клетках [*PSI*⁺] замещение на плазмиду с мутацией *sup35-240* приводит к потере приона.

3.2.6 Несовместимость мутаций *sup35-n* и приона [*PSI*⁺] в диплоидных клетках зависит от метода получения таких клеток

Мы предположили, что гаплоидные и диплоидные штаммы дрожжей могут отличаться по своей совместимости с прионом [*PSI*⁺]. Для проверки этого предположения использовали диплоидные штаммы, отличающиеся способом их получения: трансформацией диплоидных штаммов, либо скрещиваниями соответствующих гаплоидных штаммов (см. Рисунок 14).

В первом случае диплоидные штаммы [*PSI*⁺] и [*psi*⁻], содержащие плазмиду [*SUP35 URA3*], трансформировали плазмидами [*sup35-n LEU2*]. Были получены жизнеспособные клетки [*PSI*⁺] [*SUP35/sup35-n*]. Мы подтвердили у трансформантов нонсенс-супрессорный фенотип и присутствие фактора [*PSI*⁺] с помощью SDD-AGE с последующим вестерн-блоттингом с антителами анти-Sup35 (данные не представлены). Диплоидные трансформанты [*SUP35/sup35-n*], печатали на среду 5-FOA. Только в случае мутации *sup35-240* был получен штамм [*PSI*⁺] [*sup35-n*]. Остальные мутации при потере плазмиды [*SUP35 URA3*] не могли поддерживать жизнеспособность диплоидных трансформантов [*PSI*⁺] (Рисунок 20А). Следует отметить, что эффективность потери плазмиды с геном *SUP35* дикого типа была снижена и в клетках [*psi*⁻] с мутациями *sup35-21* и *sup35-74* (Рисунок 20А), что соответствует результатам, полученным на гаплоидных штаммах (см. Рисунок 18).

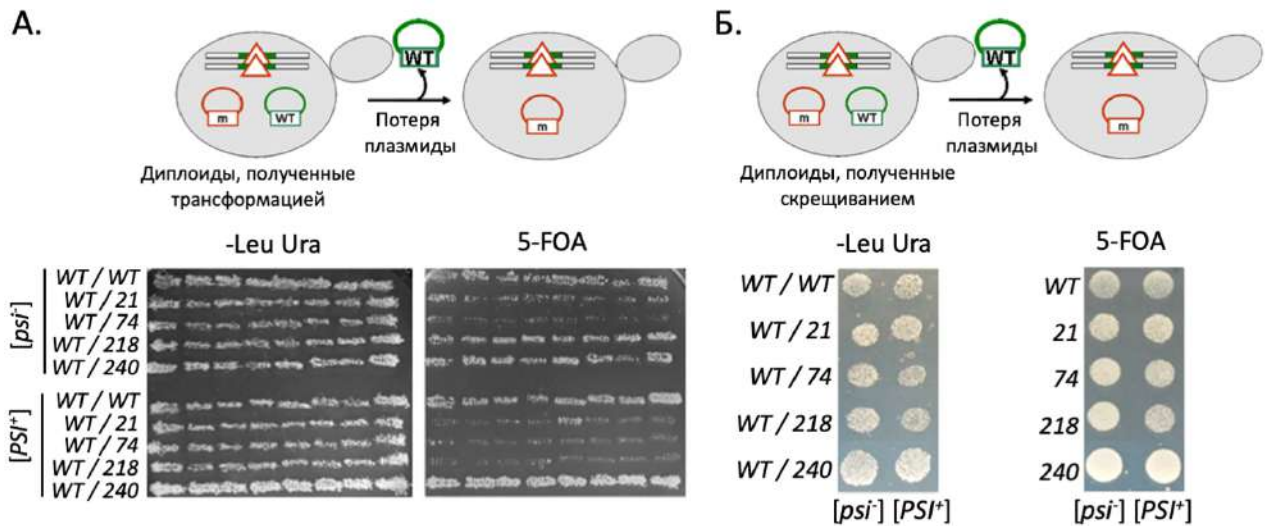


Рисунок 20. Летальность диплоидных штаммов $[PSI^+]$ $[SUP35/sup35-n]$ зависит от метода их получения. **А.** Мутации *sup35-n* летальны в сочетании с прионом $[PSI^+]$ у диплоидных клеток, полученных трансформацией. Диплоидные клетки $[PSI^+]$ и $[psi^-]$, содержащие плазмиду с геном *SUP35* дикого типа, трансформировали плазмидами с мутациями *sup35-n*. После роста полученных трансформантов на среде, селективной для обеих плазмид (левая панель), клетки печатали на среду 5-FOA для последующего отбора клонов, которые потеряли плазмиду с геном *SUP35* (правая панель). Приведен рост восьми независимых трансформантов после семи дней инкубации при 30 °С. **Б.** Диплоидные клетки с мутациями *sup35-n* жизнеспособны в присутствии фактора $[PSI^+]$, если получены путем скрещивания штамма $[PSI^+]$ $[SUP35]$ со штаммами $[psi^-]$ $[sup35-n]$. На левой панели представлен рост диплоидных клеток на селективной среде для двух плазмид, справа — рост на среде 5-FOA. Инкубацию производили в течение семи дней при 26 °С. В каждом случае проверяли по восемь независимых диплоидных штаммов, представлены репрезентативные результаты.

Во втором случае диплоидные штаммы были получены путем скрещивания гаплоидных мутантов $[psi^-]$ $[sup35-n]$ со штаммом $[PSI^+]$ $[SUP35]$. Все мутантные диплоидные штаммы $[PSI^+]$ $[SUP35/sup35-n]$, полученные скрещиванием, способны терять плазмиду с геном *SUP35* дикого типа (Рисунок 20Б). Полученные данные свидетельствуют о том, что проявление несовместимости мутаций *sup35-n* и приона $[PSI^+]$ зависит скорее не от пloidности используемых штаммов, как это могло показаться изначально, а от метода получения клеток $[PSI^+]$ $[SUP35/sup35-n]$. Штаммы $[psi^-]$ $[sup35-n]$ имели возможность адаптироваться к мутациям в отсутствие приона и тем самым повысить жизнеспособность диплоидных клеток $[PSI^+]$ $[sup35-n]$.

3.2.7 Мутации *sup35-n* изменяют свойства приона [*PSI*⁺] в диплоидных штаммах

Диплоидные штаммы [*PSI*⁺] [*sup35-n*], полученные скрещиванием оказались жизнеспособными. Мы проверили, действительно ли в таких клетках сохраняется мутация и прион. У диплоидных штаммов [*PSI*⁺] [*sup35-n*] сохраняется нонсенс-супрессорный фенотип (Рисунок 21А), что подтверждает присутствие мутаций *sup35-n* после потери плазмиды с геном *SUP35* дикого типа.

В результате SDD-AGE мы обнаружили либо отсутствие, либо сокращение количества агрегатов Sup35 у диплоидных штаммов [*PSI*⁺] [*sup35-n*] (Рисунок 21Б, левая панель). При повторе этого эксперимента с заново полученными диплоидными мутантами [*sup35-21*], [*sup35-74*] и [*sup35-218*] мы наблюдали у них гетерогенность по размеру и количеству агрегатов Sup35 (Рисунок 21В). При этом у мутанта [*sup35-240*] агрегаты Sup35 во всех экспериментах отсутствовали. Мы предполагаем, что белки Sup35-n, встраиваясь в агрегаты Sup35 изменяют свойства фактора [*PSI*⁺]. Также сниженное количество полноразмерного белка Sup35, вероятно, оказывает дополнительное ограничение на поддержание агрегатов в клетке. Кроме того, мы не исключаем факта присутствия возможных дополнительных наследуемых модификаторов (см. ниже), влияющих на генетический фон клеток и таким образом на фенотип. Согласно этому мы можем наблюдать представленную вариативность.

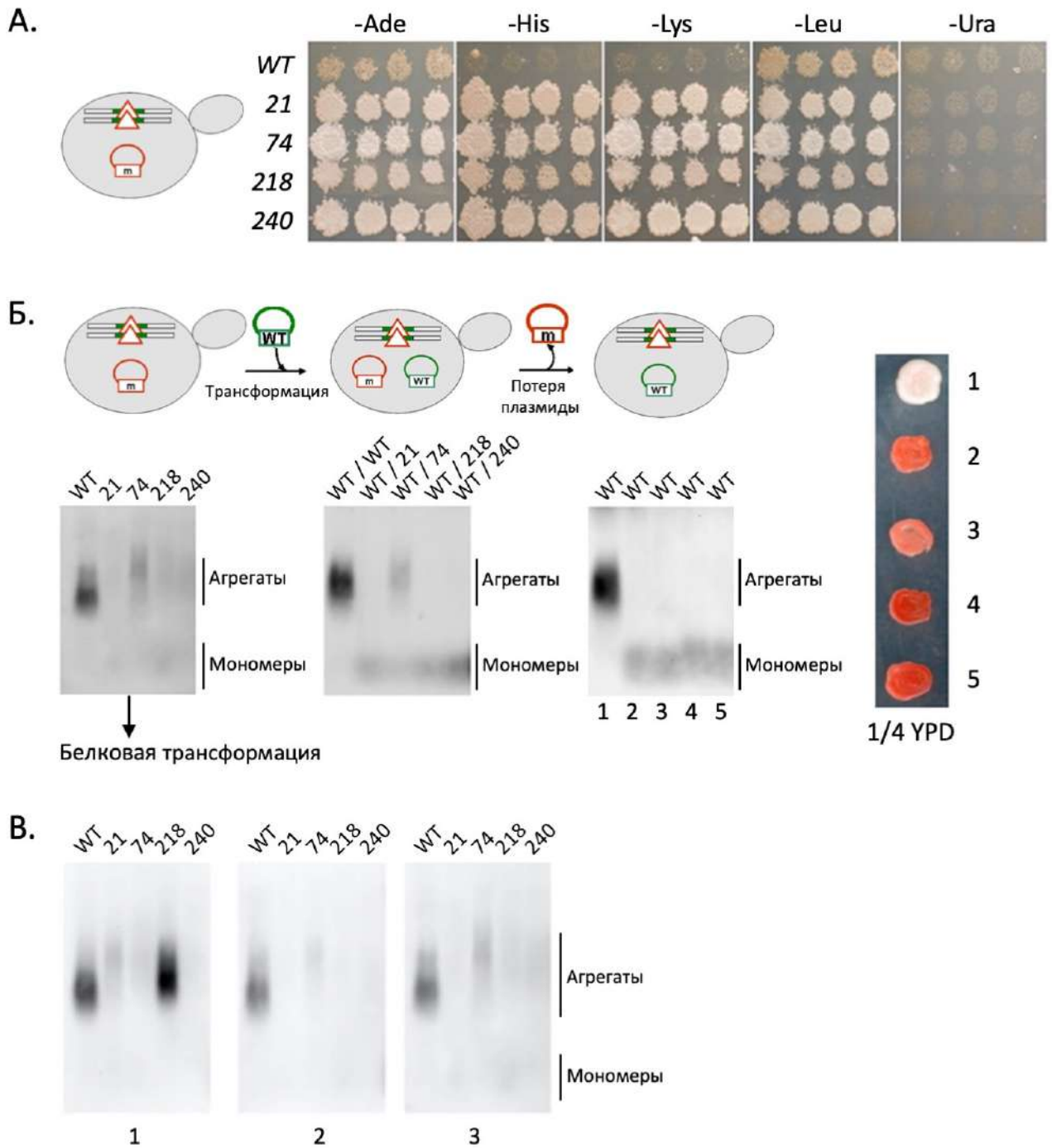


Рисунок 21. Мутации *sup35-n* изменяют свойства приона $[PSI^+]$ в диплоидных штаммах. **A.** Нонсенс-супрессорный фенотип диплоидных штаммов $[PSI^+]$ $[sup35-n]$. Отобранные диплоидные клетки $[PSI^+]$ (см. Рисунок 20Б) были отпечатаны на селективные среды для проверки супрессорного фенотипа. Рост на средах без лейцина (– Leu) или урацила (–Ura) приведен в качестве контроля наличия плазмиды $[sup35-n LEU2]$ и отсутствия плазмиды $[SUP35 URA3]$, соответственно. Представлено по четыре клон в каждом случае после инкубации в течение пяти дней при 26 °С. **Б.** Присутствие мутаций *sup35-n* приводит к изменению свойств агрегатов $[PSI^+]$ в диплоидных штаммах. Представлены результаты SDD-AGE с последующим иммуноблоттингом с антителами анти-Sup35 для лизатов из диплоидных штаммов, несущих разные плазмиды. Слева — для клеток, несущих только одну плазмиду с мутацией *sup35-n* (см. Рисунок 20Б). Посередине — те же клетки, которые были заново трансформированы плазмидой с геном *SUP35* дикого типа. Справа — клетки, у которых произведена потеря плазмиды $[sup35-n LEU2]$. Крайняя правая панель представляет рост трансформантов, несущих только плазмиду с геном *SUP35* дикого типа после потери плазмиды

с мутацией *sup35-n* на среде 1/4 YPD при условиях инкубации в течение пяти дней при 26 °С. Номера дорожек последнего геля соответствуют номерам клонов на 1/4 YPD. **В.** Агрегаты [*PSI*⁺] изменяют свои свойства в диплоидных штаммах в присутствии мутаций *sup35-n*. Из клеток, отобранных, как показано на Рисунок 20Б, получали лизаты для SDD-AGE. Было проверено по три независимых набора (1–3) клонов.

Для подтверждения потери приона [*PSI*⁺] или его поддержания в диплоидных клетках, мы провели эксперимент, в котором заменили плазмиды с мутациями *sup35-n* на плазмиду с геном *SUP35* дикого типа. Диплоидные клетки [*sup35-n*] трансформировали плазмидами [*SUP35 URA3*]. Лизаты полученных диплоидных трансформантов [*SUP35/sup35-n*] использовали для SDD-AGE. Мы предположили, что с возвратом копии гена *SUP35* дикого типа и, соответственно, появлением в клетке достаточного количества полноразмерного белка Sup35, агрегаты могут приобрести прежние характеристики (см. Рисунок 17Г). Тем не менее мы снова детектировали либо отсутствие, либо изменение свойств агрегатов [*PSI*⁺], как это было показано для диплоидных штаммов [*sup35-n*] (Рисунок 21Б, средняя панель). Далее мы провели спонтанную потерю плазмид [*sup35-n LEU2*] у полученных трансформантов и получили диплоидные штаммы [*SUP35*]. Все они, за исключением одного, характеризовались отсутствием агрегатов Sup35 и нонсенс-супрессорного фенотипа (Рисунок 21Б, правая панель). Клетки, происходящие от исходного диплоидного штамма [*sup35-74 LEU2*], имели розовый цвет колоний на среде 1/4 YPD, что соответствовало детектированным в результате SDD-AGE следовым количествам агрегатов белка Sup35 (Рисунок 21Б).

Исходя из полученных результатов, мы предположили, что в присутствии мутаций *sup35-n* происходит дестабилизация фактора [*PSI*⁺] с последующей потерей агрегатов Sup35. Мы также не исключаем вероятность того, что мутации *sup35-n* могут изменять вариант приона [*PSI*⁺].

3.2.8 Агрегаты белка Sup35 у мутантов [*sup35-n*] имеют сниженную инфекционность по сравнению с диким типом

Изменение размеров агрегатов Sup35 (Рисунок 21Б, левая панель) и отсутствие прионного фенотипа после потери плазмид [*sup35-n URA3*] (Рисунок 21Б, правая панель), позволили нам предположить, что мутации *sup35-n* могут приводить к изменению варианта приона [*PSI⁺*]. Для проверки этой гипотезы мы выделили агрегаты Sup35 из диплоидных штаммов [*PSI⁺*] [*sup35-n*] и использовали их для белковой трансформации клеток [*psi⁻*]. В качестве реципиентов использовали штаммы 1-OT56 и 2-OT56, вместо 7A-D832, который обладал низкой эффективностью трансформации. Для положительного контроля проводили трансформацию фибриллами Sup35NM, которые были получены *in vitro* Максютенко Е.М. Отрицательным контролем была трансформация вектором pRS316 или лизатами диплоидного штамма [*psi⁻*] D1691. У полученных трансформантов проверяли фенотип на среде 1/4 YPD (Рисунок 22А). Несмотря на то, что трансформация лизатами проходила с низкой эффективностью, нам удалось отобрать супрессирующие клоны. Нонсенс-супрессорный фенотип всех белых и розовых колоний был излечим на среде с добавлением ГГХ (Рисунок 22Б), что доказывало присутствие в таких клетках приона [*PSI⁺*].

Мы обнаружили, что агрегаты белка Sup35 диплоидных штаммов [*PSI⁺*] [*sup35-n*] имеют сниженную инфекционность по сравнению с диким типом [*PSI⁺*] [*SUP35*] (Рисунок 22А). Это наблюдение согласуется с нашим первоначальным предположением, что исследованные мутации изменяют варианты приона. Высокая гетерогенность фенотипов контрольных трансформантов может свидетельствовать о том, что диплоидный штамм D1692 [*PSI⁺*] содержит «облако прионных вариантов» [11]. С этой точки зрения, мы можем предположить, что присутствие мутаций *sup35-n* напрямую не изменяет вариант фактора [*PSI⁺*], но приводит к выбору конкретных вариантов из существующего облака. Тем не менее, этот механизм также можно рассматривать как изменение прионного варианта.

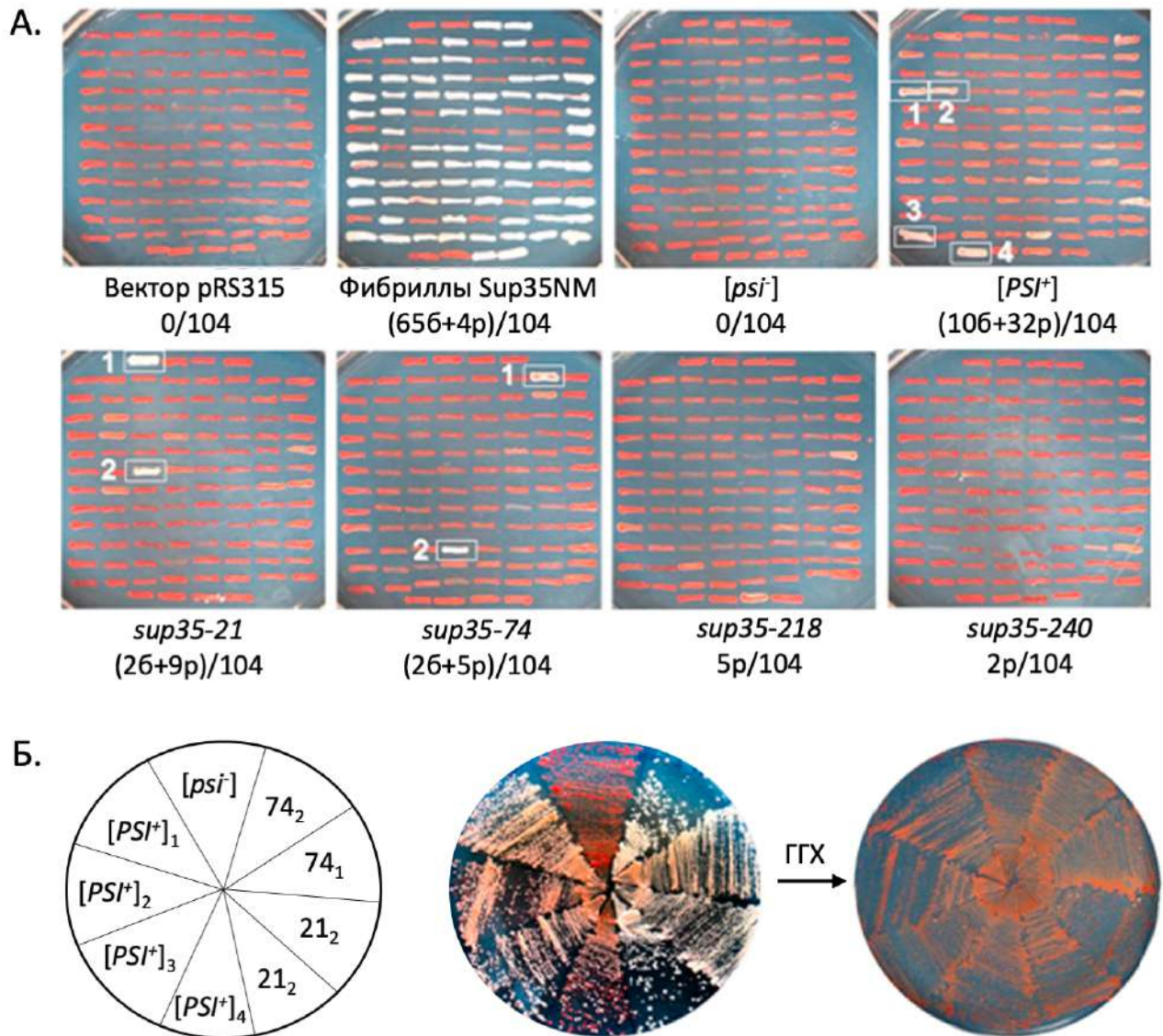


Рисунок 22. Агрегаты белка Sup35 диплоидных штаммов [*PSI*⁺] [*sup35-n*] имеют сниженную инфекционность по сравнению с диким типом [*PSI*⁺] [*SUP35*]. **А.** Инфекционность клеточных лизатов из диплоидных штаммов D1692 [*PSI*⁺] и D1691 [*psi*⁻], несущих на плазмиде аллель *SUP35* или *sup35-n* (см. Рисунок 20Б) была определена с помощью белковой трансформации штамма 1-OT56 [*psi*⁻] [*PIN*⁺]. Контрольную трансформацию проводили с вектором pRS316 или фибриллами Sup35NM. После отбора на селективной среде SC-Ura трансформанты были отпечатаны на среду 1/4 YPD для проверки нонсенс-супрессорного фенотипа. В каждом случае показано по 104 независимых трансформанта после пяти дней роста при 30 °С. Цифрами отмечены штрихи с супрессорным фенотипом, которые отбирали для детального анализа. Внизу фотографий чашек указано число белых (б) и розовых (р) колоний. **Б.** Штаммы, проявляющие нонсенс-супрессорный фенотип после белковой трансформации, приобрели прион [*PSI*⁺]. Белые колонии дрожжей, представленные на рисунке А, субклонировали на среде 1/4 YPD и далее печатали на полную среду с добавлением ГГХ. После трёх дней роста колоний при 30 °С, повторяли печать еще раз на свежую среду ГГХ (второй пассаж). После третьего пассажа на среде GuHCl колонии субклонировали на среде 1/4 YPD для проверки супрессорного фенотипа. Слева на рисунке представлена схема расположения штаммов на чашках.

Таким образом, диплоидные клетки [*PSI*⁺], полученные скрещиванием, и несущие мутантную аллель *sup35-21*, *sup35-74* или *sup35-218*, способны

поддерживать прион. При этом он изменяет свои свойства, что проявляется в увеличении размера агрегатов белка Sup35 и их потере после замены плазмиды с мутацией *sup35-n* на плазмиду с геном *SUP35* дикого типа. Диплоидные клетки, содержащие мутацию *sup35-240*, теряют прион [*PSI*⁺].

3.3 Мутация *sup35-240* предотвращает поддержание приона [*PSI*⁺] в клетке

3.3.1 Короткий белок Sup35-240 включается в агрегаты приона [*PSI*⁺]

Для того, чтобы установить причину потери приона [*PSI*⁺] в присутствии мутации *sup35-240*, мы провели серию экспериментов, где использовали химерную белковую конструкцию Sup35-240-GFP. Первой задачей стало определение того, может ли белок Sup35-240-GFP включаться в агрегаты Sup35 у гаплоидных штаммов [*PSI*⁺]. В качестве контроля использовали конструкцию Sup35NM-GFP и белок GFP. Мы обнаружили, что при сверхпродукции белок Sup35-240-GFP декорирует предсуществующие агрегаты [*PSI*⁺] (Рисунок 23А). При этом флуоресцентные фокусы в случае конструкций Sup35NM-GFP и Sup35-240-GFP имели различную морфологию. Клетки, сверхпродуцирующие Sup35-NM-GFP, характеризовались присутствием крупных флуоресцентных фокусов, в то время как в клетках с Sup35-240-GFP наблюдалось множество мелких фокусов.

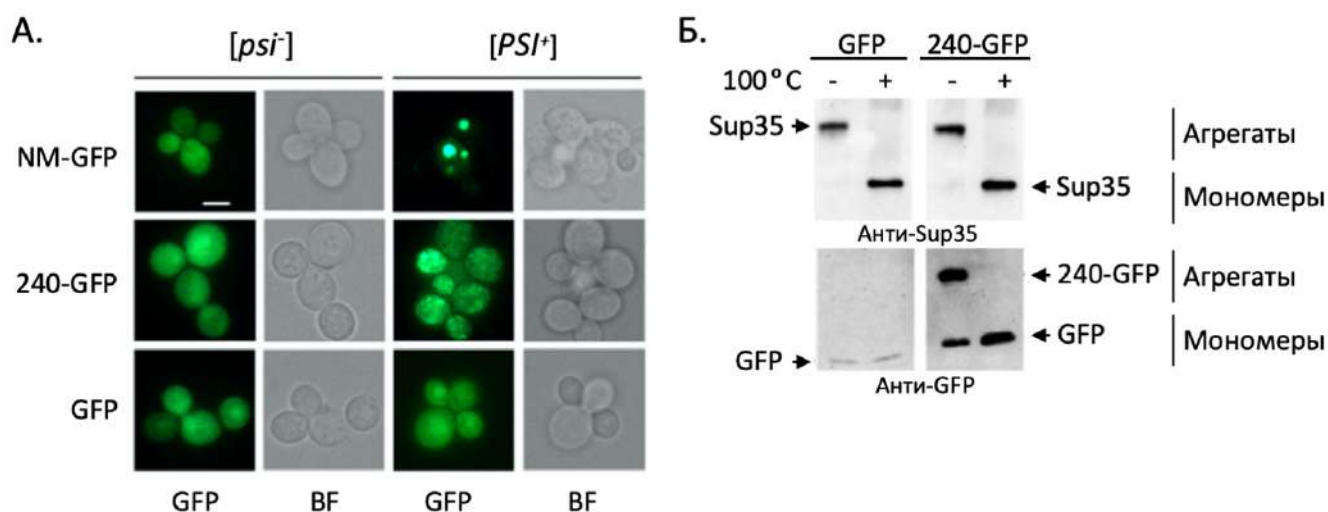


Рисунок 23. Белок Sup35-240 включается в агрегаты приона [*PSI*⁺] и приводит к его дестабилизации. А. Штаммы 7A-D832 [*psi*⁻] или 10-7A-D832 [*PSI*⁺] трансформировали плазмидами pRS316-pCUP-GFP, pRS316-pCUP-SUP35NM-GFP и pRS316-pCUP-sup35-240-GFP.

Логарифмические культуры полученных трансформантов инкубировали с 50 μM CuSO_4 в течение двух часов. Клетки визуализировали, используя флуоресцентную микроскопию. Приведены репрезентативные группы клеток. Размерная шкала соответствует 5 μm . BF — фотография, сделанная при проходящем свете. Б. Клетки [PSI^+] в присутствии вектора с конструкцией *sup35-240-GFP* содержат преимущественно агрегированный белок Sup35. Лизаты дрожжевых клеток [PSI^+] и [psi^-], представленных на панели А, использовали для проведения SDS-PAGE с докипячиванием. Иммуноблоттинг осуществляли с антителами анти-Sup35 (верхняя панель) и анти-GFP (нижняя панель). М — белковый маркер молекулярного веса (кДа), нанесенный в начале электрофореза (М) и после кипячения геля (М*).

Далее мы проверили, возможна ли не только колокализация белка Sup35-240-GFP, но и его коагрегация с полноразмерным белком Sup35 в штамме [PSI^+]. Для этой задачи использовали метод SDS-PAGE с докипячиванием [130]. Как в присутствии контрольного вектора с GFP, так и плазмиды с конструкцией Sup35-240-GFP, клетки [PSI^+] содержали преимущественно агрегированную форму белка Sup35 (Рисунок 23Б, верхняя панель). Антитела анти-Sup35 не распознают белок Sup35-240, но с помощью антител анти-GFP мы показали, что в клетках [PSI^+] белок Sup35-240-GFP в основном присутствует в агрегированной форме (Рисунок 23Б, нижняя панель). Таким образом белок Sup35-240-GFP, вероятно, включается в прионные агрегаты [PSI^+], образованные полноразмерным белком Sup35, приводя к прекращению роста фибрилл (подробнее см. в Глава 4. Обсуждение, 4.4). В этом случае он может работать как анти-прионный агент, вызывая потерю агрегатов [PSI^+].

3.3.2 Увеличение содержания белка Sup35-240 в клетках приводит к дестабилизации приона [PSI^+]

Поскольку белок Sup35-240-GFP включается в агрегаты Sup35, мы проверили, изменяются ли свойства приона [PSI^+] при сверхпродукции этого белка в клетках. Мы сравнили фенотипические характеристики клеток, длительно сверхпродуцирующих белки Sup35-240-GFP или GFP. Клетки [PSI^+] [*sup35-240-GFP*] характеризовались снижением нонсенс-супрессии — имели розовый цвет колоний на среде 1/4 YPD по сравнению с контрольными клетками [PSI^+] (Рисунок 24). Таким образом, присутствие короткого белка Sup35-240 приводит к дестабилизации приона [PSI^+].

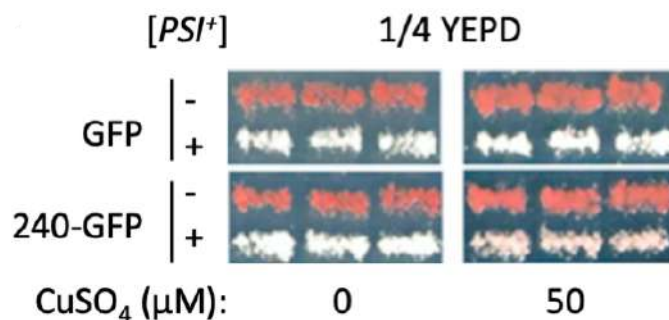


Рисунок 24. Увеличение содержания белка Sup35-240 дестабилизирует прион [PSI⁺]. Белок Sup35-240 дестабилизирует фактор [PSI⁺], включаясь в агрегаты белка Sup35. Трансформанты, представленные на Рисунок 23А, выращивали на чашках в присутствии 50 μM CuSO₄ в течение трех дней и затем печатали на среду 1/4 YPD для проверки эффективности нонсенс-супрессии. В каждом случае проверяли по шесть независимых трансформантов. Показаны репрезентативные результаты после пяти дней инкубации при 30 °C.

3.3.3 Дополнительная копия гена SUP35 снижает дестабилизирующее воздействие мутации sup35-240 на прион [PSI⁺]

Ранее мы не наблюдали каких-либо изменений в проявлении [PSI⁺] в диплоидных клетках, несущих одновременно плазмиды с аллелями SUP35 и sup35-240. Для того, чтобы проанализировать это несоответствие, мы провели эксперимент, в котором трансформировали штамм [PSI⁺] (OT56) плазмидой с конструкцией sup35-240-GFP в сочетании с вектором pRS315 или центромерной плазмидой pRSU1 [SUP35]. В качестве отрицательного контроля использовали комбинацию векторов pRS316-pCUP1-GFP и pRS315, а в качестве положительного контроля — плазмиду pRSU1 в сочетании с вектором pRS316-pCUP1-GFP (Рисунок 25А). Следует отметить, что изученные эффекты были практически идентичны (возможно, из-за присутствия в среде следов меди). Дополнительная копия гена SUP35 защищает прион [PSI⁺] от дестабилизации, вызванной временной продукцией белка Sup35-240-GFP. Таким образом, эффект мутации sup35-240 зависит от соотношения полноразмерного и укороченного белка Sup35, что объясняет сохранение стабильности приона [PSI⁺] у диплоидных штаммов.

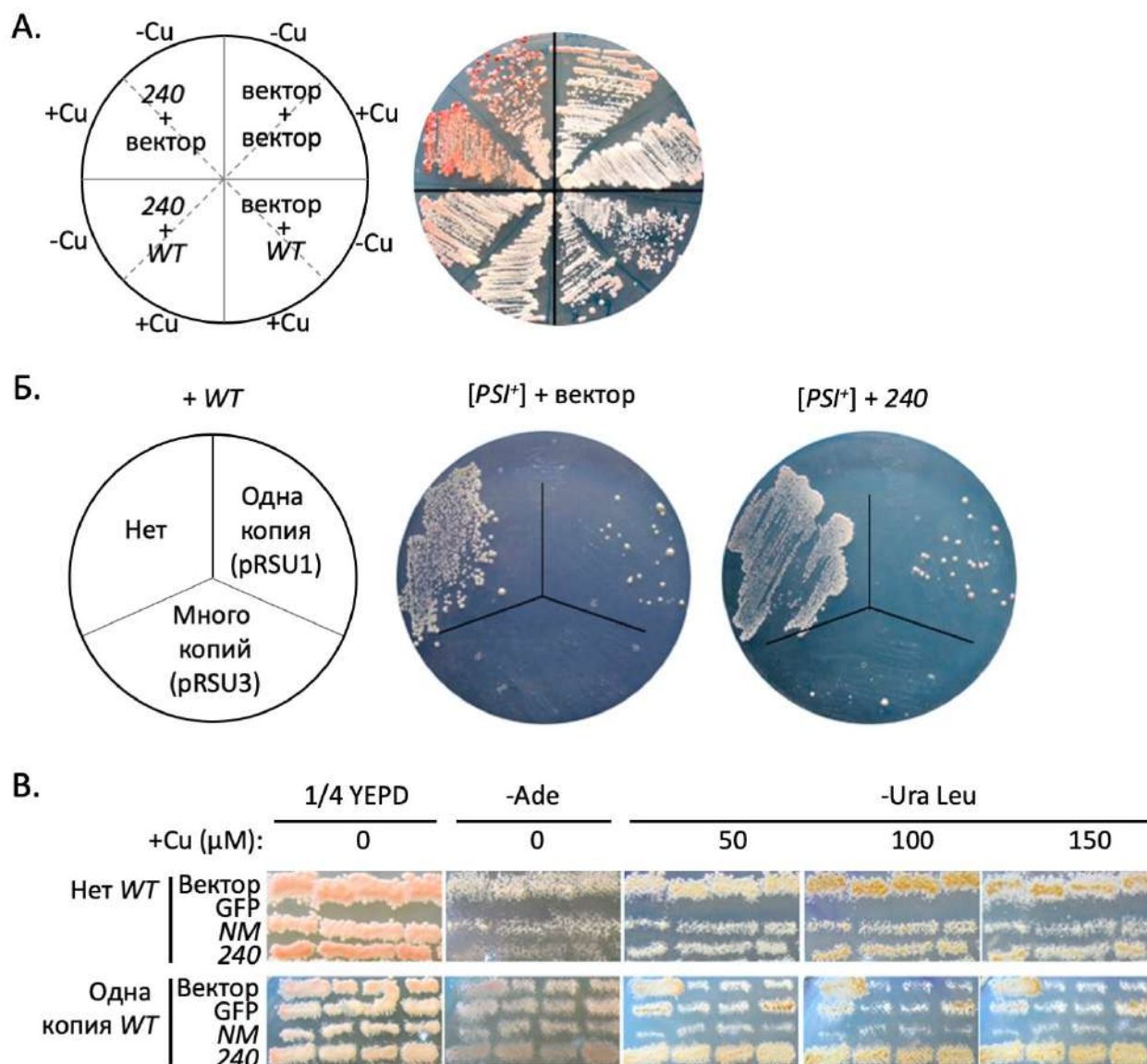


Рисунок 25. Дополнительная копия гена *SUP35* защищает прион $[PSI^+]$ от дестабилизации, вызванной временной продукцией белка Sup35-240-GFP. **А.** Штамм $[PSI^+]$ OT56 трансформировали комбинацией следующих плазмид: pRS316-pCUP-GFP и pRS315 (вектор + вектор); pRS316-pCUP-GFP и pRSU1 (вектор + *WT*); pRS316-pCUP-sup35-240-GFP и pRS315 (*240* + вектор); pRS316-pCUP-sup35-240-GFP и pRSU1 (*240* + *WT*). Трансформанты выращивали в течение 6 дней на селективных средах в неиндуцированных (– Cu) или индуцированных (+ Cu) условиях (использовали 50 μM CuSO₄), затем переносили на среду 1/4 YPD и инкубировали в течение 5 дней при 30 °С. **Б.** Белок Sup35-240 устраняет токсичность, связанную с прионом $[PSI^+]$. Штамм $[PSI^+]$ OT56, трансформированный вектором pRS316 или pRS316-pCUP-sup35-240-GFP, повторно трансформировали pRS315 (контроль), pRSU1 (одна копия гена *SUP35*) или pRSU3 (мультикопийная плазмида, содержащая ген *SUP35*). Трансформантов отбирали на селективной среде SC–Leu Ura. Справа на схеме указано расположение штаммов на чашках. **В.** В штаммах $[PSI^+]$ при наличии дополнительной копии гена *SUP35* эффект прионной токсичности можно наблюдать во всех случаях, кроме того, где присутствует плазмида pCUP-sup35-240-GFP. Штамм OT56 ($[PSI^+]$) трансформировали следующими плазмидами: pRS315 (Нет *WT*); pRSU1 (Одна копия *WT*). Эти плазмиды сочетали либо с вектором pRS316 (вектор), либо с pRS316-pCUP-GFP (*GFP*), либо с pRS316-pCUP-NM-GFP (*NM*), либо с pRS316-pCUP-sup35-240-GFP (*240*). Трансформанты выращивали в течение 6 дней при 30 °С.

Ранее было показано, что сверхэкспрессия гена *SUP35* в клетках [*PSI*⁺] приводит к токсичности [36]. Примечательно, что этот эффект очевиден даже при наличии дополнительной копии гена *SUP35* на центромерной плазмиде. В присутствии белка Sup35-240 токсический фенотип полностью исчезал (Рисунок 25Б). В случае, когда штамм [*PSI*⁺], несущий вектор pRS316, трансформировали мультикопийной плазмидой с геном *SUP35*, трансформанты не были отобраны, возможно, ввиду эффекта прионной токсичности. Тем не менее в присутствии вектора pRS316-pCUP1-Sup35-240-GFP было отобрано 10 трансформантов (Рисунок 25В). Таким образом, белок Sup35-240 дестабилизирует прион [*PSI*⁺] даже в присутствии полноразмерного белка Sup35 дикого типа в разных штаммах дрожжей, но проявление эффекта зависит от количества белка Sup35.

Глава 4. Обсуждение

Нарушение работы факторов eRF1 и eRF3 у дрожжей может проявляться в виде супрессии, поэтому изучение супрессорных мутаций в генах *SUP45* и *SUP35* позволяет получать дополнительную информацию о процессах, происходящих при терминации трансляции. В нашей лаборатории были охарактеризованы миссенс- и нонсенс-мутации *sup45-n* и *sup35-n*. Исследованные мутации *sup45-n* и *sup35-n* находятся в слабом нуклеотидном контексте, который облегчает прочтение стоп-кодона и не приводит к летальности в отсутствие супрессорных tPHK ([30, 159], см. обзор [216]). Предметом исследования данной работы стали нонсенс-мутации *sup35-n*, которые мы проверили на совместимость с фактором [*PSI*⁺] [217].

4.1 Последствия возникновения нонсенс-мутаций в жизненно-важном гене *SUP35*

В первую очередь мы охарактеризовали проявление мутаций на используемом генотипическом фоне. В результате нонсенс-супрессии мутанты [*sup35-n*] синтезируют полноразмерный белок Sup35, обеспечивающий им жизнеспособность в отсутствие гена *SUP35* дикого типа. Однако некоторые из изученных мутантов содержат очень низкое количество полноразмерного белка Sup35 по сравнению с диким типом: 1 % для *sup35-240*, 3 % для *sup35-21* и 10 % для *sup35-74* (Рисунок 10Б). Мутация *sup35-244* в другой работе приводила к наибольшему снижению содержания Sup35, которое составляло всего 0,5% [30]. По данной характеристике мутанты [*sup35-n*] напоминают штаммы [*PSI*⁺], у которых содержание растворимого полноразмерного белка Sup35 снижено за счет включения его в агрегаты приона [*PSI*⁺] [172, 173]. По оценке разных авторов, клетки [*PSI*⁺] содержат 0,5–2 % растворимого белка Sup35 по сравнению с клетками [*psi*⁻] [164, 241], что сравнимо с тем, что наблюдается в случае мутантов [*sup35-n*]. При этом клетки с *sup35-n*, отличаются от клеток [*PSI*⁺], поскольку наряду с полноразмерным Sup35 они синтезируют короткие белки Sup35-n. Возможно, что сохранение жизнеспособности у мутантов, содержащих очень

низкие количества Sup45 или Sup35, связано с тем, что белки с аминокислотными заменами, возникающие в результате нонсенс-супрессии ПСК, способны более эффективно обеспечивать терминацию трансляции, чем белок дикого типа. Это предположение было подтверждено в нашей работе для мутации *sup35-240*. Мы проанализировали эффекты замен Q на K или Y в 56-м положении а.к. последовательности Sup35. Ранее было показано, что именно а.к.о. Q, K или Y использует дрожжевая клетка в случае нонсенс-супрессии стоп-кодона UAA [16]. Скорость деградации белка Sup35-Q56Y была такая же, как у Sup35 дикого типа, в то время как белок Sup35-Q56K был стабильнее (Рисунок 11А). Кроме того, в присутствии белка Sup35-Q56K клетки выживали при более высоких концентрациях паромомина — до 1 мг/мл (Рисунок 11Б). Примечательно, что подобные замены не приводили к стабилизации белка Sup45 у мутантов [*sup45-n*]. Напротив, в случае мутаций *sup45-102* и *sup45-105* белки Sup45-Y102Q и Sup45-E105Y соответственно были менее стабильные, чем Sup45, а стабильность белка Sup45-E105Q не отличалась от белка дикого типа. Эти результаты позволили объяснить причину, по которой в присутствии мутации *sup45-102* клетки характеризовались самым низким уровнем полноразмерного белка Sup45 при наиболее эффективной среди всех мутантов [*sup45-n*] нонсенс-супрессией (20–30 %). У мутанта [*sup45-105*] наблюдалась самая низкая эффективность нонсенс-супрессии (5–8 %), но количество Sup45 было на среднем уровне [112].

У мутантов [*sup35-n*] наряду с полноразмерным белком Sup35 образуются короткие белки Sup35-n. Возникает вопрос об их потенциальной роли в клетке. В присутствии мутации *sup35-240*, *-74* и *-218* белки Sup35-n состоят из 56, 129 и 181 а.к.о соответственно и не включают С-домен. Белок Sup35-21 (422 а.к.о.) включает только часть С-домена (отсутствует часть ГТФазных сайтов и нет сайта связывания eRF1) (Рисунок 6). Известно, что даже небольшие делеции С-домена белков Sup45 и Sup35 приводят к нарушению их функций и жизнеспособности клеток [65, 69, 213]. Таким образом белки Sup35-n не могут проявлять ГТФазную активность и участвовать в терминации трансляции. При этом Sup35-n (возможно, кроме Sup35-240) должны сохранять способность связываться с рибосомой, как

это было показано для различных фрагментов Sup35, включающих как минимум целый N- или C-домен [213].

N-домен Sup35 (Sup35N) отвечает за возможность прионизации Sup35 с образованием детерминанта [*PSI*⁺] [53, 173, 212], поэтому белки Sup35-n могут участвовать в его поддержании или потенциально даже способствовать *de novo* возникновению приона. [*PSI*⁺] имеет очень низкую скорость спонтанного образования (оценивается как 6×10^{-7}) в клетках с эндогенным уровнем продукции Sup35 [135]. Однако частота появления [*PSI*⁺] может увеличиваться при различных стрессах и в старых клетках [202, 219, 228]. Также временная сверхпродукция только прионного домена (или его части) способствует более эффективному образованию агрегатов Sup35, чем сверхпродукция полноразмерного белка [24, 53, 169, 174], поэтому потенциально присутствие коротких белков Sup35-n может увеличить скорость спонтанного образования [*PSI*⁺]. Действительно, по литературным данным продукция коротких белков Sup35 в присутствии белка дикого типа (оба белка нарабатывались без сверхпродукции, т.е. под собственным промотором) в некоторых случаях приводит к увеличению частоты формирования [*PSI*⁺] *de novo* на несколько порядков. Максимальная частота спонтанного образования [*PSI*⁺] наблюдалась у клеток с фрагментом 1-112 белка Sup35 – 8×10^{-2} [52], что было сопоставимо с частотой возникновения [*PSI*⁺] *de novo* при сверхэкспрессии гена *SUP35* с мультикопийной плазмиды – 10^{-2} [184] и превышало это значение для дополнительной копии гена *SUP35* примерно в 6000 раз. Фрагмент 1-49 в данной работе не приводил к индукции [*PSI*⁺], фрагменты 1-64, 1-123 и 1-252 были примерно в 15, 241 и 4 раза более эффективны, чем присутствие дополнительной копии гена *SUP35* [52].

Ранее в Sup35N были локализованы два субдомена: Q/N-богатая область (а.к.о. 1–40) и область OR (а.к.о. 41–97) [128] и была показана критическая роль участка Q/N и первых двух OR (а.к.о. 1–64) в распространении приона [50, 118, 169]. Белок Sup35, содержащий только этот участок, агрегирует и индуцирует [*PSI*⁺] на уровне, сравнимом с Sup35N [118, 169]. Sup35 с частичной делецией

второго OR (а.к.о. 1–57) все еще может агрегировать и индуцировать [*PSI*⁺], но с пониженной эффективностью, а белок, полностью лишенный второго OR (а.к.о. 1–49), не индуцирует [*PSI*⁺] *de novo*, но может декорировать предсуществующие агрегаты Sup35p [169], что совпадает с результатами работы, описанной выше [52].

Исходя из перечисленных предпосылок, в клетках в присутствии гена *SUP35* дикого типа белок Sup35-240 (56 а.к.о.) потенциально агрегирует и индуцирует [*PSI*⁺], но с пониженной эффективностью по сравнению с Sup35N (123 а.к.о.). Белок Sup35-74 формирует агрегаты Sup35 и будет наиболее эффективно стимулировать спонтанное возникновение [*PSI*⁺], но, возможно, клетки не смогут стабильно его поддерживать при делениях, поскольку в Sup35-74 (как и у Sup35-240) отсутствует часть М-домена с сайтом связывания шаперона Hsp104 (а.к.о. 129-148) [92]. Белок Sup35-218 (181 а.к.о), как и Sup35-21 (422 а.к.о) включает сайт для Hsp104, и потенциально агрегаты [*PSI*⁺] стабильно наследуются, но учитывая результаты упомянутой выше работы, частота образования приона будет примерно соответствовать той, что наблюдается в присутствии дополнительной копии гена *SUP35* дикого типа в клетке [52].

4.2 Совместимость мутаций *sup35-n* и приона [*PSI*⁺]

В настоящей работе мы проанализировали эффекты комбинации мутаций *sup35-n* с прионом [*PSI*⁺] в гаплоидных и диплоидных штаммах *S. cerevisiae*. Мы показали, что такие эффекты зависят от присутствия копии гена *SUP35* дикого типа, способа отборов дрожжевых клонов и позиции нонсенс-мутации.

Мутации *sup35-n* в отличие от *sup45-n*, не приводят к синтетической летальности клеток с сильным вариантом приона [*PSI*⁺] в присутствии гена *SUP35* дикого типа. В наших экспериментах как диплоидные, так и гаплоидные штаммы [*PSI*⁺] [*SUP35/sup35-n*] были жизнеспособны. Причиной летальности мутантов [*PSI*⁺] [*SUP45/sup45-n*] стало одновременное снижение активности белков Sup45 (в связи с мутацией) и Sup35 (в связи с прионизацией). Было показано, что летальность зависит от дозы как гена *SUP45*, так и гена *SUP35* [114]. Гаплоидные

и диплоидные мутанты [*SUP35/sup35-n*], несмотря на пониженное содержание Sup35, имеют не отличное от дикого типа количество Sup45 ([30] и Рисунок 10В), что, возможно, способствует поддержанию жизнеспособности. Однако, потеря плазмиды с геном *SUP35* дикого типа у таких штаммов приводит к значительному снижению уровня белка Sup35 и, как следствие, к различным результатам.

Жизнеспособность штаммов [*PSI⁺*] [*sup35-n*] в наших экспериментах зависела от генетического метода, использованного их для создания. Трансформация гаплоидных или диплоидных клеток [*PSI⁺*] [*SUP35 URA3*] плазмидой, несущей аллель [*sup35-n LEU2*], с последующей селективной потерей плазмиды [*SUP35 URA3*] на среде 5-FOA (Рисунок 14А) приводит к гибели клеток. При неселективной потере плазмид у мутантов [*PSI⁺*] [*SUP35/sup35-n*] на полной среде YEPD мы могли отобрать клетки [*LEU2*], которые либо сохранили мутацию *sup35-n*, но теряли прион, либо (что происходило в редких случаях) поддерживали прион, но вместо мутации *sup35-n* сохраняли ген *SUP35* дикого типа в результате рекомбинации между плазмидами [*sup35-n LEU2*] и [*SUP35 URA3*] (данные не представлены). Исключением стала мутация *sup35-240*, которая поддерживала жизнеспособность исходных штаммов [*PSI⁺*], вызывая элиминацию приона (см. ниже). Из этого следует, что в отсутствие гена *SUP35* мутации *sup35-n* несовместимы с [*PSI⁺*] как в гаплоидных, так и в диплоидных клетках, полученных трансформацией (Рисунок 18 и Рисунок 20). Таким образом, в нашем исследовании летальность штаммов [*PSI⁺*] проявлялась при значительном снижении только одного фактора терминации трансляции — eRF3, в то время как eRF1 имел нормальный клеточный уровень. Тем не менее, диплоидные штаммы с аналогичной комбинацией *sup35-n* и приона, полученные в результате скрещивания (Рисунок 14Б), могут терять *SUP35* дикого типа, сохраняя только мутантный аллель (см. ниже).

С одной стороны, гибель клеток при комбинации *sup35-n* и [*PSI⁺*] предсказуема, поскольку количество полноразмерного белка Sup35 у мутантов [*sup35-n*] значительно снижено по сравнению с диким типом (Рисунок 10), при этом часть функционального Sup35 уходит в агрегаты приона. Таким образом,

причиной летальности клеток [PSI^+] [$sup35-n$] становится чрезмерное сокращение функционального белка Sup35 (менее 0,5 % при 100 % у дикого типа) (см. выше).

С другой стороны, можно было бы ожидать проявление аллосупрессорной активности у приона в отношении мутаций $sup35-n$. В результате сила супрессии возрастет, и в клетке будет вырабатываться больше функционального белка Sup35, достаточного для поддержания жизнеспособности клеток. Тем не менее этого эффекта мы не наблюдали и предположили, что сильный вариант приона [PSI^+], который мы использовали в работе (Рисунок 15), токсичен для клеток [$sup35-n$], либо становится более токсичным в присутствии коротких белков Sup35-n. Белки Sup35-74, Sup35-218 или Sup35-21 по литературным данным эффективнее включаются в агрегаты Sup35 (см. выше) и могут потенциально изменять вариант [PSI^+]. Что примечательно, более половины вариантов приона, изученных ранее в скрининге были летальными или чрезвычайно токсичными для клеток [154].

Кроме того, ранее была показана несовместимость нонсенс-мутации $sup35-2$ с фактором [ETA^+] (слабый вариант [PSI^+]) [140, 241]. Мутация $sup35-2$ приводит к замене кодона UUG на стоп-кодон UAG, поэтому синтезируется укороченный белок Sup35, состоящий из 109 а.к.о. (наряду с уменьшенным количеством полноразмерного Sup35) [241]. При скрещивании линий [ETA^+] [$SUP35$] и [eta^-] [$sup35-2$] 97 % мейотических сегрегантов [$sup35-2$] были нежизнеспособны. При этом генетический анализ показал, что только 70 % жизнеспособных потомков были [ETA^+]. Этот парадокс, а именно высокая летальность мутантов [$sup35-2$], объясняется тем, что белок Sup35₁₀₉ встраивается в агрегаты [ETA^+] эффективнее, чем полноразмерный Sup35, и способствует повышению их стабильности при клеточных делениях. В результате фактора eRF3 становится недостаточно для поддержания жизнеспособности клеток [$sup35-2$] [241].

В нашем случае нельзя не обратить внимание на то, что если мутации $sup35-n$ изменяют вариант [PSI^+], то можно было бы ожидать разницу по жизнеспособности между разными мутантами [$sup35-n$], но мы ее не детектировали – клетки 100 % летальны в случае мутаций $sup35-21$, -74 и -218.

Также мы не обнаружили изменения размера агрегатов Sup35 как у гаплоидных, так и диплоидных мутантных штаммов [*PSI⁺*] [*SUP35/sup35-n*] по сравнению с диким типом (см. ниже).

Все диплоидные штаммы [*PSI⁺*] [*sup35-n*], полученные путем скрещивания гаплоидных клеток [*PSI⁺*] [*SUP35*] с мутантами [*psi⁻*] [*sup35-n*] и последующей потерей плазмиды [*SUP35 URA3*], были жизнеспособными. Изначально возникло предположение, что у гаплоидных клеток [*psi⁻*] [*sup35-n*] во время роста происходит отбор дополнительных мутаций в других локусах, улучшающих жизнеспособность таких мутантов. Однако полногеномное секвенирование штаммов [*psi⁻*] [*sup45-n*] и [*psi⁻*] [*sup35-n*], показало отсутствие у мутантов общих однонуклеотидных полиморфизмов, вставок или делеций. При этом было обнаружено систематическое увеличение количества копий плазмид, несущих мутантные аллели *sup45-n* или *sup35-n*. В случае мутантов [*sup35-n*] это позволяет обеспечивать достаточный уровень функционального белка Sup35 в клетке даже в присутствии приона [*PSI⁺*]. Таким образом, адаптация дрожжевых клеток к мутациям в генах факторов терминации трансляции происходит за счет увеличения количества плазмид, несущих мутантные аллели или в результате амплификации числа копий гена фактора терминации трансляции [147]. У мутантов также наблюдали увеличение экспрессии генов циклинов (на стадиях G1, S и G2), регулируемых транскрипционно, и снижение эффективности комплекса, стимулирующего анафазу. Анализ литературных данных позволил выдвинуть предположение о том, что увеличение копийности плазмид, вероятно, возникает за счет замедления клеточного цикла, дефектов и задержки в синтетической фазе, что позволяет интенсивно реплицировать плазмиды и накапливать различные белки [3]. Предположительно именно за счет этой адаптации диплоидные штаммы [*PSI⁺*] [*SUP35/sup35-n*], полученные скрещиванием, в отличие от гаплоидных и диплоидных штаммов [*PSI⁺*] [*SUP35/sup35-n*], полученных трансформацией, выживают после потери плазмиды с геном *SUP35* дикого типа.

4.3 Мутации *sup35-n* изменяют свойства приона [*PSI*⁺]

Все диплоидные мутантные штаммы [*sup35-n*] (кроме [*sup35-240*]) сохраняли [*PSI*⁺] после потери гена *SUP35*, однако некоторые свойства приона были изменены (Рисунок 21Б и Рисунок 22). По размеру и количеству агрегатов Sup35 мы детектировали вариацию даже среди клонов с одной и той же мутацией *sup35-n* (Рисунок 21БВ). Мы предположили, что у мутантных диплоидных штаммов [*PSI*⁺] [*sup35-n*] прион дестабилизируется из-за нехватки полноразмерного белка Sup35, а также за счет включения в него белков Sup35-n.

Для объяснения изменения свойств [*PSI*⁺] в присутствии мутаций *sup35-n* мы предполагаем по крайней мере два механизма. Во-первых, короткие белки Sup35-n могут с высокой эффективностью включаться в прионные агрегаты, что в свою очередь, может привести к изменению их размера. В дополнение к тому, что сказано выше про короткие белки Sup35-n (см. подраздел 4.1), ранее было также показано, что различные N-концевые фрагменты Sup35 (Sup35₁₋₁₃₃, Sup35₁₋₁₅₄ и Sup35₁₋₂₄₀) способны формировать агрегаты, состоящие только из таких коротких белков Sup35 [174]. Тем не менее, из этих данных не следует однозначно, могут ли короткие белки Sup35 включаться в агрегаты [*PSI*⁺], образованные полноразмерным белком, или они образуют агрегаты независимо. Агрегаты белка Sup35₁₋₂₄₀ (обозначен как Sup35NM в цитируемой работе) способны вызывать прионизацию полноразмерного растворимого белка Sup35 *in vitro* [173]. Это позволяет сделать вывод о том, что этот фрагмент включается в агрегаты [*PSI*⁺]. Кроме того, было показано, что N-концевые фрагменты Sup35 способны декорировать предсуществующие агрегаты Sup35 в штаммах [*PSI*⁺] [50]. Однако в этих экспериментах короткие белки Sup35 были слиты с репортерным белком M-GFP, поэтому это может потенциально влиять на взаимодействие с Sup35.

Второй механизм предполагает, что включение Sup35-n в агрегаты [*PSI*⁺] влияет на их фрагментацию клеточными шаперонами. Таким образом, мутация *sup35-n* может приводить к увеличению размера агрегатов и снижать число прионных семян в клетке. В свою очередь, дочерние клетки получают меньшее количество пропагонов, что приведет к ослаблению фактора [*PSI*⁺]. В случае

аллеля *sup35-74* второй механизм хорошо согласуется с идентификацией сайта связывания Hsp104 в Sup35. Участок белка Sup35 с 129 по 148 а.к.о. важен для взаимодействия этих двух белков и элиминации $[PSI^+]$ в условиях сверхпродукции Hsp104. При этом белок Sup35, лишенный этого участка, способен поддерживать прион [92]. Аналогичные *sup35-74* результаты, полученные для мутации *sup35-218*, позволяют предположить, возможное наличие неизвестного сайта для шаперонов в отсутствующей у белка Sup35-218 части М-домена (а.к.о. 182-256). Тем не менее этот механизм не подходит для объяснения эффекта мутации *sup35-21*, поскольку Sup35-21 включает весь NM-домен Sup35.

Необходимы дополнительные эксперименты для проверки двух вышеупомянутых механизмов. Таким образом, мы продемонстрировали, что нонсенс-мутации *sup35-n* могут влиять на свойства $[PSI^+]$, что, в свою очередь, может привести к образованию нового прионного варианта. Эксперимент с белковой трансформацией показал, что варианты $[PSI^+]$, поддерживаемые в диплоидных мутантах [*sup35-n*], отличаются от приона в штамме дикого типа [*SUP35*] (Рисунок 22А). Подробные молекулярные механизмы этого явления требуют дальнейших исследований.

Важно отметить, что у диплоидных клеток [*SUP35/sup35-n*] не удалось детектировать белки Sup35-n (Рисунок 13Б). Для эффективной терминации трансляции требуются оба фактора – eRF1 и eRF3 [203], поэтому возможно, что в клетках, несущих плазмиды [*SUP35/sup35-n*] вместе с двумя геномными копиями *SUP45*, количество Sup35 недостаточно для проявления эффекта антисупрессии (терминации трансляции на ПСК, возникшем в результате нонсенс-мутации *sup35-n*). В этом случае укороченный белок Sup35 не будет произведен клеткой (или его количество будет низким и не будет обнаружено в вестерн-блотах). Тем не менее ситуация может быть более сложной. Ранее в лаборатории Яна Стэнсфилда было показано, что транскрипционная регуляция нонсенс-аллеля *sup45-18* приводит к повышенной экспрессии полноразмерного белка Sup45 [14]. Авторы не смогли доказать эту гипотезу с помощью вестерн-блоттинга,

поскольку их антитела не распознавали N-концевую часть Sup45, но их данные указывают на то, что присутствие аллеля *sup45-n* может влиять на количество полноразмерного Sup45. Можно предположить существование подобного механизма в случае мутаций *sup35-n*.

4.4 Аллель *sup35-240* как новая мутация *PNM*

Мутация *sup35-240* представляет наибольший интерес в данной работе, поскольку несмотря на то, что она могла компенсировать отсутствие аллели *SUP35* дикого типа, у штаммов [*PSI*⁺] [*sup35-240*] происходила потеря приона. В результате это приводило к отбору исключительно [*psi*⁻] клеток, несущих аллель *sup35-240*. Минимальный фрагмент Sup35, который может быть включен в существующие прионные агрегаты, состоит из первых 49 а.к.о., его небольшое удлинение до 57-го остатка повышает эффективность этого процесса [169]. В нашей работе, используя тот же подход, мы продемонстрировали, что короткий белок Sup35-240 (56 а.к.о.) декорирует агрегаты Sup35 (Рисунок 23А). Таким образом, можно предположить, что включение белка Sup35-240 в прионные агрегаты приводит к их дестабилизации, или к образованию ненаследственных агрегатов Sup35. Альтернативно, белки Sup35-240 могут присоединяться к концам агрегатов и, таким образом, прерывать рост фибрилл. Такой механизм был предложен для объяснения межвидового барьера для передачи прионов [5]. Мы находим первую гипотезу более подходящей, потому что Sup35-240 включается в агрегаты [*PSI*⁺] с высокой эффективностью (Рисунок 23). Ранее мы предположили, что в варианте [*PSI*⁺], использованном в данной работе, первые 63-69 а.к.о. остатков белка Sup35 включены в супер-складчатую β-структуру [18]. Это означает, что Sup35-240 эффективно включается в существующие агрегаты Sup35, но не может правильно копировать их структуру, что может привести к дестабилизации [*PSI*⁺]. К сожалению, мы не смогли с помощью имеющихся антител обнаружить белок Sup35-240 без маркирования GFP в штаммах [*sup35-240*] (Рисунок 10Б). Тем не менее, мы предполагаем, что укороченный

фрагмент представлен в клетках, поскольку эффекты аллели *sup35-240* и конструкции *sup35-240-GFP* для соответствующего белка присутствуют и являются одинаковыми (Рисунок 23).

В литературе описаны случаи использования короткого химерного белка Sup35 длиной 61 а.к.о (*Sup35₁₋₆₁-GFP*) для визуализации предсуществующих прионных агрегатов [118, 119], а также для выделения типов прионных штаммов [142]. Было показано, что продолжительная сверхпродукция *Sup35₁₋₆₁-GFP* не изгоняет прионные варианты [VH-1] или [VK-1], однако наблюдается небольшое излечение [*PSI*⁺] в клетках, несущих вариант [VL-1] [118, 119]. Было также продемонстрировано, что сверхпродукция фрагментов Ure2p, а также слияние его с GFP излечивает прион [*URE3*] [66, 67]. Кроме того, конверсия нормального человеческого белка PrP в его прионную форму, ингибировалась пептидом, содержащим консервативную последовательность PrP, как в бесклеточной системе [32], так и в клетках культуры ткани [31].

Таким образом, мы можем сделать вывод, что мутация *sup35-240* предотвращает распространение [*PSI*⁺] и может рассматриваться как новая мутация *PNM*. Большинство белков Pnm показывают сниженную способность включаться в агрегаты [*PSI*⁺] *in vivo*, а также присутствие некоторых мутантных белков приводит к солюбилизации агрегатов Sup35 [50].

4.5 Заключение

Часть гена *SUP35*, в которой закодирован NM-домен белка Sup35, насыщена потенциальными стоп-кодонами (48% по сравнению с 34% для всего генома дрожжей) [216]. Следовательно, вероятность спонтанных нонсенс-мутаций в соответствующей области высока. Таким образом мы можем предположить, что мутации *sup35-n* можно встретить в диких дрожжевых штаммах. По-видимому, комбинация мутаций *sup35-n* с прионом [*PSI*⁺] также возможна, например, путем скрещивания соответствующих гаплоидных штаммов, или появления спонтанной мутации в диплоидных штаммах. При этом в большинстве случаев [*PSI*⁺] будет быстро исключен из популяции. Этот факт

объясняется либо летальностью комбинации *sup35-n* с прионом (*sup35-21*, *sup35-74* и *sup35-218*), либо *PNM*-эффектом самой мутации *sup35-n* (*sup35-240*). В случае, если [*PSI*⁺] не будет устранен по вышеуказанным причинам, он будет ослаблен и в конечном итоге исчезнет из популяции.

Было описано как минимум пять спонтанных мутаций гене *PRNP* (кодирует белок PrP), приводящих к появлению стоп-кодона вместо смыслового кодона [9]. Все эти мутации приводят к синтезу белка PrP, укороченного с С-конца, в котором отсутствует GPI-якорь, связывающийся с клеточной поверхностью. Существуют различные экспериментальные модели для изучения прионных заболеваний человека, среди которых наиболее распространена мышиная. Большинство современных мышиных моделей прионных заболеваний не полностью повторяют клинические, биохимические и патологические признаки болезни человека, хотя достигнут значительный прогресс в создании более точных моделей [230]. При этом о разработке успешной модели для изучения эффектов нонсенс-мутаций в гене *PRNP* пока не сообщалось. Вполне возможно, что дрожжи могут служить успешной моделью для изучения эффектов укороченных последовательностей прионных белков *in vivo*. В дальнейшем такие исследования смогут предложить потенциальную стратегию лечения прионных заболеваний человека и животных.

Выводы

1. При прочтении стоп-кодона, возникающего в результате мутации *sup35-240*, могут возникать полноразмерные белки, отличающиеся по свойствам от белка дикого типа. Мутация *sup35-240K* (Q56K) приводит к увеличению устойчивости клеток *S. cerevisiae* к паромомицину и стабилизации белка Sup35-Q56K, тогда как мутация *sup35-240Y* (Q56Y) не влияет на свойства белка Sup35.
2. Метод получения диплоидных штаммов, содержащих нонсенс-мутации *sup35* в сочетании с прионом [*PSI*⁺] (трансформация или скрещивание), определяет их дальнейшую жизнеспособность.
3. Мутации *sup35-21*, *sup35-74* и *sup35-218* несовместимы с прионом [*PSI*⁺] в гаплоидных и диплоидных штаммах, полученных трансформацией.
4. Мутации *sup35-21*, *sup35-74* и *sup35-218* изменяют свойства приона [*PSI*⁺] в диплоидных штаммах, полученных скрещиванием.
5. Нонсенс-мутация *sup35-240* приводит к потере приона [*PSI*⁺] и исчезновению его агрегатов в гаплоидных штаммах дрожжей, поэтому может рассматриваться, как новая мутация *PNM* ([*PSI*⁺] No More).

Список сокращений

- eIFs – факторы инициации трансляции (eukaryotic initiation factors)
- eEFs – факторы элонгации трансляции (eukaryotic elongation factors)
- eRFs – факторы терминации трансляции (eukaryotic termination factors)
- NMD – нонсенс-опосредованный распад мРНК (nonsense-mediated mRNA decay)
- OR – олигопептидные повторы (oligopeptide repeats)
- SDS – додецил-сульфат натрия
- а.к. – аминокислотная (последовательность)
- а.к.о. – аминокислотный остаток
- п.о. – пара оснований
- т.п.н. – тысяча пар нуклеотидов
- ОРС – открытая рамка считывания
- ПСК – преждевременный стоп-кодон
- ПКА – протеинкиназа А

Список литературы

1. Журавлева, Г.А. Генетический контроль терминации трансляции у эукариот: дис. ... докт. биол. наук: 03.00.15 / Галина Анатольевна Журавлева. — Санкт-Петербург, 2007. — 325 с.
2. Инге-Вечтомов, С.Г. Реверсии к прототрофности у дрожжей, нуждающихся в аденине / Сергей Георгиевич Инге-Вечтомов // Вестник ЛГУ. — 1964. — Vol. 2. — P. 112–117.
3. Максютенко, Е.М. Изучение механизмов адаптации к нарушениям процесса терминации трансляции у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*: дис. ... канд. биол. наук: 1.5.7 / Евгения Михайловна Максютенко — Москва, 2023. — 132 с.
4. Миронова, Л.Н. Генетический и эпигенетический контроль считывания стоп-кодонов у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*: дис. ... докт. биол. наук: 03.00.15 / Людмила Николаевна Миронова. — Санкт-Петербург, 2002. — 240 с.
5. Afanasieva, E.G. Molecular basis for transmission barrier and interference between closely related prion proteins in yeast / E.G. Afanasieva, V.V. Kushnirov, M.F. Tuite, M.D. Ter-Avanesyan // J. Biol. Chem. — 2011. — Vol. 286(18). — P. 15773–15780.
6. Alkalaeva, E.Z. *In vitro* reconstitution of eukaryotic translation reveals cooperativity between release factors eRF1 and eRF3 / E.Z. Alkalaeva, A.V. Pisarev, L.Y. Frolova, L.L. Kisselev, T.V. Pestova // Cell. — 2006. — Vol. 125(6). — P. 1125–1136.
7. An, L. Emergence and evolution of yeast prion and prion-like proteins / L. An, D. Fitzpatrick, P.M. Harrison // BMC Evol. Biol. — 2016. — Vol. 16(1). — P. 24.
8. Atkinson, G.C. Evolution of nonstop, no-go and nonsense-mediated mRNA decay and their termination factor-derived components / G.C. Atkinson, S.L. Baldauf, V. Haurlyuk // BMC Evol. Biol. — 2008. — Vol. 8(1). — P. 290.
9. Bagyinszky, E. Characterization of mutations in PRNP (prion) gene and their possible roles in neurodegenerative diseases / E. Bagyinszky, V.V. Giau, Y.C. Youn, S.S.A. An, S. Kim // Neuropsychiatr. Dis. Treat. — 2018. — Vol. 14. — P. 2067–2085.

10. Bailleul, P.A. Genetic study of interactions between the cytoskeletal assembly protein Sla1 and prion-forming domain of the release factor Sup35 (eRF3) in *Saccharomyces cerevisiae* / P.A. Bailleul, G.P. Newnam, J.N. Steenbergen, Y.O. Chernoff // *Genetics*. — 1999. — Vol. 153(1). — P. 81–94.
11. Bateman, D.A. The [*PSI*⁺] prion exists as a dynamic cloud of variants / D.A. Bateman, R.B. Wickner // *PLoS Genet*. — 2013. — Vol. 9(1). — P. e1003257.
12. Becker, T. Structural basis of highly conserved ribosome recycling in eukaryotes and archaea / T. Becker, S. Franckenberg, S. Wickles, C. J. Shoemaker, A.M. Anger, J. P. Armache, et al. // *Nature*. — 2012. — Vol. 482(7386). — P. 501–506.
13. Beiβel, C. Translation termination depends on the sequential ribosomal entry of eRF1 and eRF3 / C. Beiβel, B. Neumann, S. Uhse, I. Hampe, P. Karki, H. Krebber // *Nucleic Acids Res*. — 2019. — Vol. 47(9). — P. 4798–4813.
14. Betney, R. Regulation of release factor expression using a translational negative feedback loop: A systems analysis / R. Betney, E. De Silva, C. Mertens, Y. Knox, J. Krishnan, I. Stansfield // *RNA*. — 2012. — Vol. 18(12). — P. 2320–2334.
15. Bidou, L. Premature stop codons involved in muscular dystrophies show a broad spectrum of readthrough efficiencies in response to gentamicin treatment / L. Bidou, I. Hatin, N. Perez, V. Allamand, J.J. Panthier, J.P. Rousset // *Gene Ther*. — 2004. — Vol. 11(7). — P. 619–627.
16. Blanchet, S. New insights into the incorporation of natural suppressor tRNAs at stop codons in *Saccharomyces cerevisiae* / S. Blanchet, D. Cornu, M. Argentini, O. Namy // *Nucleic Acids Res*. — 2014. — Vol. 42(15). — P. 10061–10072.
17. Boeke, J.D. A positive selection for mutants lacking orotidine-5'-phosphate decarboxylase activity in yeast: 5-fluoro-orotic acid resistance / J.D. Boeke, F. La Croute, G.R. Fink // *Mol. Gen. Genet*. — 1984. — Vol. 197(2). — P. 345–346.
18. Bondarev, S.A. Effect of charged residues in the N-domain of Sup35 protein on prion [*PSI*⁺] stability and propagation / S.A. Bondarev, V.V. Shchepachev, A.V. Kajava, G.A. Zhouravleva // *J. Biol. Chem*. — 2013. — Vol. 288(40). — P. 28503–28513.

19. Bonetti, B. The efficiency of translation termination is determined by a synergistic interplay between upstream and downstream sequences in *Saccharomyces cerevisiae* / B. Bonetti, L. Fu, J. Moon, D.M. Bedwell // *J. Mol. Biol.* — 1995. — Vol. 251(3). — P. 334–345.
20. Borchsenius, A.S. Yeast prion protein derivative defective in aggregate shearing and production of new "seeds" / A. S. Borchsenius, R.D. Wegrzyn, G.P. Newnam, S.G. Inge-Vechtomov, Y.O. Chernoff // *EMBO J.* — 2001. — Vol. 20(23). — P. 6683–6691.
21. Borchsenius, A.S. Recessive mutations in *SUP35* and *SUP45* genes coding for translation release factors affect chromosome stability in *Saccharomyces cerevisiae* / A.S. Borchsenius, A.A. Tchourikova, S.G. Inge-Vechtomov // *Curr. Genet.* — 2000. — Vol. 37(5). — P. 285–291.
22. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / M.M. Bradford // *Anal. Biochem.* — 1976. — Vol. 72(1–2). — P. 248–254.
23. Bradley, M.E. Guanidine reduces stop codon read-through caused by missense mutations in *SUP35* or *SUP45* / M.E. Bradley, S. Bagriantsev, N. Vishveshwara, S.W. Liebman // *Yeast.* — 2003. — Vol. 20(7). — P. 625–632.
24. Bradley, M.E. The Sup35 domains required for maintenance of weak, strong or undifferentiated yeast [*PSI*⁺] prions / M.E. Bradley, S.W. Liebman // *Mol. Microbiol.* — 2004. — Vol. 51(6). — P. 1649–1659.
25. Breining, P. Yeast omnipotent suppressor *SUP1* (*SUP45*): nucleotide sequence of the wildtype and a mutant gene / P. Breining, W. Piepersberg // *Nucleic Acids Res.* — 1986. — Vol. 14(4). — P. 5187–5197.
26. Brown, A. Structural basis for stop codon recognition in eukaryotes / A. Brown, S. Shao, J. Murray, R.S. Hegde, V. Ramakrishnan // *Nature.* — 2015. — Vol. 524(7566). — P. 493–496.
27. Brown, C.M. Sequence analysis suggests that tetra-nucleotides signal the termination of protein synthesis in eukaryotes / C.M. Brown, P.A. Stockwell, C.N. Trotman, W.P. Tate // *Nucleic Acids Res.* — 1990. — Vol. 18(21). —

P. 6339–6345.

28. Cassan, M. UAG readthrough in mammalian cells: Effect of upstream and downstream stop codon contexts reveal different signals / M. Cassan, J.P. Rousset // *BMC Mol. Biol.* — 2001. — Vol. 2. — P. 3.

29. Celik, A. NMD: At the crossroads between translation termination and ribosome recycling / A. Celik, S. Kervestin, V. Jacobson // *Biochimie.* — 2015. — Vol. 114. — P. 2–9.

30. Chabelskaya, S. Nonsense mutations in the essential gene *SUP35* of *Saccharomyces cerevisiae* are non-lethal / S. Chabelskaya, D. Kiktev, S. Inge-Vechtomov, M. Philippe, G. Zhouravleva // *Mol. Genet. Genomics.* — 2004. — Vol. 272(3). — P. 297–307.

31. Chabry, J. Species-independent inhibition of abnormal prion protein (PrP) formation by a peptide containing a conserved PrP sequence / J. Chabry, S.A. Priola, K. Wehrly, J. Nishio, J. Hope, B. Chesebro // *J. Virol.* — 1999. — Vol. 73(8). — P. 6245–6250.

32. Chabry, J. Specific inhibition of *in vitro* formation of protease-resistant prion protein by synthetic peptides / J. Chabry, B. Caughey, B. Chesebro // *J. Biol. Chem.* — 1998. — Vol. 273(21). — P. 13203–13207.

33. Chamieh, H. NMD factors UPF2 and UPF3 bridge UPF1 to the exon junction complex and stimulate its RNA helicase activity / H. Chamieh, L. Ballut, F. Bonneau, H. Le Hir // *Nat. Struct. Mol. Biol.* — 2008. — Vol. 15(1). — P. 85–93.

34. Chapman, B. Translation termination in *Arabidopsis thaliana*: Characterisation of three versions of release factor 1 / B. Chapman, C. Brown // *Gene.* — 2004. — Vol. 341(1–2). — P. 219–225.

35. Cheng, Z. Structural insights into eRF3 and stop codon recognition by eRF1 / Z. Cheng, K. Saito, A.V. Pisarev, M. Wada, V.P. Pisareva, T.V. Pestova, et al. // *Genes Dev.* — 2009. — Vol. 23(9). — P. 1106–1118.

36. Chernoff, Y.O. Dosage-dependent translational suppression in yeast *Saccharomyces cerevisiae* / Y.O. Chernoff, S.G. Inge-Vechtomov, I.L. Derkach, M.V. Ptyushkina, O.V. Tarunina, A.R. Dagkesamanskaya, et al. // *Yeast.* — 1992. —

Vol. 8(7). — P. 489–499.

37. Chernoff, Y.O. Role of the chaperone protein Hsp104 in propagation of the yeast prion-like factor [*PSI*⁺] / Y.O. Chernoff, S.L. Lindquist, B.I. Ono, S.G. Inge-Vechtomov, S.W. Liebman // *Science*. — 1995. — Vol. 268(5212). — P. 880–884.

38. Chernoff, Y.O. Evolutionary conservation of prion-forming abilities of the yeast Sup35 protein / Y.O. Chernoff, A.P. Galkin, E. Lewitin, T.A. Chernova, G.P. Newnam, S.M. Belenkiy // *Mol. Microbiol.* — 2000. — Vol. 35(4). — P. 865–876.

39. Chernoff, Y.O. Stress and prions: Lessons from the yeast model / Y.O. Chernoff // *FEBS Letters*. — 2007. T. 581. № 19. C. 3695–3701.

40. Christiano, R. Global proteome turnover analyses of the yeasts *S. cerevisiae* and *S. pombe* / R. Christiano, N. Nagaraj, F. Fröhlich, T.C. Walther // *Cell Rep.* — 2014. — Vol. 9(5). — P. 1959–1965.

41. Colby, D.W. Prions / D.W. Colby, S.B. Prusiner // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* — 2011. — Vol. 3(1). — P. a006833–a006833.

42. Cosson, B. Poly(A)-binding protein acts in translation termination via eukaryotic release factor 3 interaction and does not influence [*PSI*⁺] propagation / B. Cosson, A. Couturier, S. Chabelskaya, D. Kiktev, S. Inge-Vechtomov, M. Philippe, et al. // *Mol. Cell. Biol.* — 2002. — Vol. 22(10). — P. 3301–3315.

43. Cox, B. S. Ψ , a cytoplasmic suppressor of super-suppressor in yeast / B.S. Cox // *Heredity (Edinb)*. — 1965. — Vol. 20(4). — P. 505–521.

44. Cox, B.S. The ψ factor of yeast: A problem in inheritance / B.S. Cox, M.F. Tuite, C.S. McLaughlin // *Yeast*. — 1988. — Vol. 4(3). — P. 159–178.

45. Cridge, A.G. Eukaryotic translational termination efficiency is influenced by the 3' nucleotides within the ribosomal mRNA channel / A.G. Cridge, C. Crowe-Mcauliffe, S.F. Mathew, W.P. Tate // *Nucleic Acids Res.* — 2018. — Vol. 46(4). — P. 1927–1944.

46. Culbertson, M.R. Frameshift suppression in *Saccharomyces cerevisiae*. II. Genetic properties of group II suppressors / M. R. Culbertson, K. M. Underbrink // *Genetics*. — 1980. — Vol. 95(4). — P. 833–853.

47. Czaplinski, K. The surveillance complex interacts with the translation release

factors to enhance termination and degrade aberrant mRNAs / K. Czaplinski, M.J. Ruiz-Echevarria, S.V. Paushkin, X. Han, Y. Weng, H.A. Perlick, et al. // *Genes Dev.* — 1998. — Vol. 12(11). — P. 1665–1677.

48. Dabrowski, M. Translational readthrough potential of natural termination codons in eucaryotes – The impact of RNA sequence / M. Dabrowski, Z. Bukowy-Bieryllo, E. Zietkiewicz // *RNA Biol.* — 2015. — Vol. 12(9). — P. 950–958.

49. Danilov, L.G. Design of a new $[PSI^+]$ -No-More mutation in *SUP35* with strong inhibitory effect on the $[PSI^+]$ prion propagation / L.G. Danilov, A.G. Matveenkov, V.E. Ryzhkova, M.V. Belousov, O.I. Poleshchuk, D.V. Likholetova, et al. // *Front. Mol. Neurosci.* — 2019. — Vol. 12. — P. 274.

50. DePace, A.H. A critical role for amino-terminal glutamine/asparagine repeats in the formation and propagation of a yeast prion / A.H. DePace, A. Santoso, P. Hillner, J.S. Weissman // *Cell.* — 1998. — Vol. 93(7). — P. 1241–1252.

51. Dergalev, A.A. Yeast Sup35 Prion structure: Two types, four parts, many variants / A.A. Dergalev, A.I. Alexandrov, R.I. Ivannikov, M.D. Ter-Avanesyan, V.V. Kushnirov // *Int. J. Mol. Sci.* — 2019. — Vol. 20(11). — P. 2633.

52. Dergalev, A.A. Dangerous stops: Nonsense mutations can dramatically increase frequency of prion conversion / A.A. Dergalev, V.N. Urakov, M.O. Agaphonov, A.I. Alexandrov, V.V. Kushnirov // *Int. J. Mol. Sci.* — 2021. — Vol. 22(4). — P. 1–13.

53. Derkatch, I.L. Genesis and variability of $[PSI^+]$ prion factors in *Saccharomyces cerevisiae* / I.L. Derkatch, Y.O. Chernoff, V.V. Kushnirov, S.G. Inge-Vechtomov, S.W. Liebman // *Genetics.* — 1996. — Vol. 144(4). — P. 1375–1386.

54. Derkatch, I.L. Genetic and environmental factors affecting the *de novo* appearance of the $[PSI^+]$ prion in *Saccharomyces cerevisiae* / I.L. Derkatch, M.E. Bradley, P. Zhou, Y.O. Chernoff, S.W. Liebman // *Genetics.* — 1997. — Vol. 147(2). — P. 507–519.

55. Derkatch, I.L. The *PNM2* mutation in the prion protein domain of *SUP35* has distinct effects on different variants of the $[PSI^+]$ prion in yeast / I.L. Derkatch, M.E. Bradley, P. Zhou, S.W. Liebman // *Curr. Genet.* — 1999. — Vol. 35(2). — P. 59–67.

56. Derkatch, I.L. Dependence and independence of [*PSI*⁺] and [*PIN*⁺]: A two-prion system in yeast? / I.L. Derkatch, M.E. Bradley, S.V.L. Masse, S.P. Zadorsky, G.V. Polozkov, S.G. Inge-Vechtomov, et al. // *EMBO J.* — 2000. — Vol. 19(9). — P. 1942–1952.
57. Derkatch, I.L. Prions affect the appearance of other prions: The story of [*PIN*⁺] / I.L. Derkatch, M.E. Bradley, J.Y. Hong, S.W. Liebman // *Cell.* — 2001. — Vol. 106(2). — P. 171–182.
58. Disalvo, S. Dominant prion mutants induce curing through pathways that promote chaperone-mediated disaggregation / S. Disalvo, A. Derdowski, J.A. Pezza, T.R. Serio // *Nat. Struct. Mol. Biol.* — 2011. — Vol. 18(4). — P. 486–493.
59. Doel, S.M. The dominant *PNM2*-mutation which eliminates the ψ factor of *Saccharomyces cerevisiae* is the result of a missense mutation in the *SUP35* gene / S.M. Doel, S.J. McCready, C.R. Nierras, B.S. Cox. // *Genetics.* — 1994. — Vol. 137(3). — P. 659–670.
60. Doronina, V.A. Oxidative stress conditions increase the frequency of *de novo* formation of the yeast [*PSI*⁺] prion / V.A. Doronina, G.L. Staniforth, S.H. Speldewinde, M.F. Tuite, C.M. Grant // *Mol. Microbiol.* — 2015. — Vol. 96(1). — P. 163–174.
61. Du, Z., Investigating the interactions of yeast prions: [*SWI*⁺], [*PSI*⁺], and [*PIN*⁺] / Z. Du, L. Li // *Genetics.* — 2014. — Vol. 197(2). — P. 685–700.
62. Dunn, J.G. Ribosome profiling reveals pervasive and regulated stop codon readthrough in *Drosophila melanogaster* / J.G. Dunn, C.K. Foo, N.G. Belletier, E.R. Gavis, J.S. Weissman // *Elife.* — 2013. — Vol. 2013(2). — P. e01179.
63. Dytham, C. Choosing and using statistics: a biologist's guide / C. Dytham // John Wiley & Sons. — 2012. — 320 p.
64. Eaglestone, S.S. Guanidine hydrochloride blocks a critical step in the propagation of the prion-like determinant [*PSI*⁺] of *Saccharomyces cerevisiae* / S.S. Eaglestone, L.W. Ruddock, B.S. Cox, M.F. Tuite // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* — 2000. — Vol. 97(1). — P. 240–244.
65. Ebihara, K. C-terminal interaction of translational release factors eRF1 and eRF3 of fission yeast: G-domain uncoupled binding and the role of conserved amino

acids / K. Ebihara, Y. Nakamura // RNA. — 1999. — Vol. 5(6). — P. 739–750.

66. Edskes, H.K. The [URE3] prion is an aggregated form of Ure2p that can be cured by overexpression of Ure2p fragments / H.K. Edskes, V.T. Gray, R.B. Wickner // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. — 1999. — Vol. 96(4). — P. 1498–1503.

67. Edskes, H.K. Conservation of a portion of the *S. cerevisiae* Ure2p prion domain that interacts with the full-length protein / H.K. Edskes, R.B. Wickner // Proc. Natl. Acad. Sci. — 2002. — Vol. 99(suppl 4). — P. 16384–16391.

68. Ejiri, S.I. Moonlighting functions of polypeptide elongation factor 1: From actin bundling to zinc finger protein R1-associated nuclear localization / S.I. Ejiri // Biosci. Biotechnol. Biochem. — 2002. — Vol. 66(1). — P. 1–21.

69. Eurwilaichitr, L. The C-terminus of eRF1 defines a functionally important domain for translation termination in *Saccharomyces cerevisiae* / L. Eurwilaichitr, F.M. Graves, I. Stansfield, M.F. Tuite // Mol. Microbiol. — 1999. — Vol. 32(3). — P. 485–496.

70. Eyler, D.E. Eukaryotic release factor 3 is required for multiple turnovers of peptide release catalysis by eukaryotic release factor 1 / D.E. Eyler, K.A. Wehner, R. Green // J. Biol. Chem. — 2013. — Vol. 288(41). — P. 29530–29538.

71. Fan-Minogue, H. Distinct eRF3 requirements suggest alternate eRF1 conformations mediate peptide release during eukaryotic translation termination / H. Fan-Minogue, M. Du, A.V. Pisarev, A.K. Kallmeyer, J. Salas-Marco, K.M. Keeling, et al. // Mol. Cell. — 2008. — Vol. 30(5). — P. 599–609.

72. Fearon, K. Premature translation termination mutations are efficiently suppressed in a highly conserved region of yeast Ste6p, a member of the ATP-binding cassette (ABC) transporter family / K. Fearon, V. McClendon, B. Bonetti, D.M. Bedwell // J. Biol. Chem. — 1994. — Vol. 269(27). — P. 17802–17808.

73. Floquet, C. Statistical analysis of readthrough levels for nonsense mutations in mammalian cells reveals a major determinant of response to gentamicin / C. Floquet, I. Hatin, J.P. Rousset, L. Bidou // PLoS Genet. — 2012. — Vol. 8(3). — P. e1002608.

74. Franzmann, T.M. Phase separation of a yeast prion protein promotes cellular fitness / T.M. Franzmann, M. Jahnel, A. Pozniakovsky, J. Mahamid, A.S. Holehouse,

E. Nüske, et al. // *Science*. — 2018. — Vol. 359(6371). — P. eaao5654.

75. Freitag, J. Cryptic peroxisomal targeting via alternative splicing and stop codon read-through in fungi / J. Freitag, J. Ast, M. Bölker // *Nature*. — 2012. — Vol. 485(7399). — P. 522–525.

76. Frolova, L. Eukaryotic polypeptide chain release factor eRF3 is an eRF1- and ribosome-dependent guanosine triphosphatase / L. Frolova, X. Le Goff, G. Zhouravleva, E. Davydova, M. Philippe, L. Kisselev // *RNA*. — 1996. — Vol. 2(4). — P. 334–341.

77. Frolova, L. Highly conserved NIKS tetrapeptide is functionally essential in eukaryotic translation termination factor eRF1 / L. Frolova, A. Seit-Nebi, L. Kisselev // *RNA*. — 2002. — Vol. 8(2). — P. 129–136.

78. Frolova, L.Y. A highly conserved eukaryotic protein family possessing properties of polypeptide chain release factor / L.Y. Frolova, X. Le Goff, H.H. Rasmussen, S. Cheperegin, G. Drugeon, M. Kress, et al. // *Nature*. — 1994. — Vol. 372(6507). — P. 701–703.

79. Frolova, L.Y. Mutations in the highly conserved GGQ motif of class I polypeptide release factors abolish ability of human eRF1 to trigger peptidyl-tRNA hydrolysis / L.Y. Frolova, R.Y. Tsivkovskii, G.F. Sivolobova, N.Y. Oparina, O.I. Serpinsky, V.M. Blinov, et al. // *RNA*. — 1999. — Vol. 5(8). — P. 1014–1020.

80. Funakoshi, Y. Mechanism of mRNA deadenylation: Evidence for a molecular interplay between translation termination factor eRF3 and mRNA deadenylases / Y. Funakoshi, Y. Doi, N. Hosoda, N. Uchida, M. Osawa, I. Shimada, et al. // *Genes Dev*. — 2007. — Vol. 21(23). — P. 3135–3148.

81. Gietz, R.D. Yeast transformation by the LiAc/SS carrier DNA/PEG method / R. D. Gietz // *Methods Mol. Biol*. — 2014. — Vol. 1163. — P. 33–44.

82. Glover, J.R. Self-seeded fibers formed by Sup35, the protein determinant of $[PSI^+]$, a heritable prion-like factor of *S. cerevisiae* / J.R. Glover, A.S. Kowal, E.C. Schirmer, M.M. Patino, J.J. Liu, S. Lindquist // *Cell*. — 1997. — Vol. 89(5). — P. 811–819.

83. Glover, J.R. Hsp104, Hsp70, and Hsp40: A novel chaperone system that

rescues previously aggregated proteins / J.R. Glover, S. Lindquist // *Cell*. — 1998. — Vol. 94(1). — P. 73–82.

84. Grant, C.M. Sup35 methionine oxidation is a trigger for *de novo* [PSI⁺] prion formation / C.M. Grant // *Prion*. — 2015. — Vol. 9(4). — P. 257–265.

85. Groenning, M. Binding mode of Thioflavin T and other molecular probes in the context of amyloid fibrils-current status / M. Groenning // *J. Chem. Biol.* — 2010. — Vol. 3(1). — P. 1–18.

86. Gross, T. The DEAD-Box RNA helicase Dbp5 functions in translation termination / T. Gross, A. Siepmann, D. Sturm, M. Windgassen, J.J. Scarcelli, M. Seedorf, et al. // *Science*. — 2007. — Vol. 315(5812). — P. 646–649.

87. Halfmann, R. Screening for amyloid aggregation by Semi-Denaturing Detergent-Agarose Gel Electrophoresis. / R. Halfmann, S. Lindquist // *J. Vis. Exp.* — 2008. (17). — P. 11–13.

88. Hall, D. Silent prions lying in wait: A two-hit model of prion/amyloid formation and infection / D. Hall, H. Edskes // *J. Mol. Biol.* — 2004. — Vol. 336(3). — P. 775–786.

89. Hamdan, N. ER stress causes widespread protein aggregation and prion formation / N. Hamdan, P. Kritsiligkou, C.M. Grant // *J. Cell Biol.* — 2017. — Vol. 216(8). — P. 2295–2304.

90. Hanahan, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids / D. Hanahan // *J. Mol. Biol.* — 1983. — Vol. 166(4). — P. 557–580.

91. Hellen, C.U.T. Translation termination and ribosome recycling in eukaryotes / C.U.T. Hellen // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* — 2018. — Vol. 10(10). — P. a032656.

92. Helsen, C.W. Insight into molecular basis of curing of [PSI⁺] prion by overexpression of 104-kDa heat shock protein (Hsp104). / C.W. Helsen, J.R. Glover // *J. Biol. Chem.* — 2012. — Vol. 287(1). — P. 542–556.

93. Himmelfarb, H.J. Isolation of the *SUP45* omnipotent suppressor *sene* of *Saccharomyces cerevisiae* and characterization of its gene product / H.J. Himmelfarb, E. Maicas, J.D. Friesen // *Mol. Cell. Biol.* — 1985. — Vol. 5(4). — P. 816–822.

94. Hoshino, S.I. Molecular cloning of a novel member of the eukaryotic polypeptide chain-releasing factors (eRF): Its identification as eRF3 interacting with eRF1 / S.I. Hoshino, M. Imai, M. Mizutani, Y. Kikuchi, F. Hanaoka, M. Ui, et al. // *J. Biol. Chem.* — 1998. — Vol. 273(35). — P. 22254–22259.

95. Hoshino, S.I. The eukaryotic polypeptide chain releasing factor (eRF3/GSPT) carrying the translation termination signal to the 3'-poly(A) tail of mRNA. Direct association of eRF3/GSPT with polyadenylate-binding protein / S.I. Hoshino, M. Imai, T. Kobayashi, N. Uchida, T. Katada // *J. Biol. Chem.* — 1999. — Vol. 274(24). — P. 16677–16680.

96. Howard, M.T. Sequence specificity of aminoglycoside-induced stop codon readthrough: Potential implications for treatment of Duchenne muscular dystrophy / M.T. Howard, B.H. Shirts, L.M. Petros, K.M. Flanigan, R.F. Gesteland, J.F. Atkins // *Ann. Neurol.* — 2000. — Vol. 48(2). — P. 164–169.

97. Iadanza, M.G. A new era for understanding amyloid structures and disease / M.G. Iadanza, M.P. Jackson, E.W. Hewitt, N.A. Ranson, S.E. Radford // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* — 2018. — Vol. 19(12). — P. 755–773.

98. Inge-Vechtomov, S. Eukaryotic release factors (eRFs) history / S. Inge-Vechtomov, G. Zhouravleva, M. Philippe // *Biol. Cell.* — 2003. — Vol. 95(3–4). — P. 195–209.

99. Inoue, H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids / H. Inoue, H. Nojima, H. Okayama // *Gene.* — 1990. — Vol. 96(1). — P. 23–28.

100. Ito, K. Conserved motifs in prokaryotic and eukaryotic polypeptide release factors: tRNA-protein mimicry hypothesis / K. Ito, K. Ebihara, M. Uno, Y. Nakamura // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* — 1996. — Vol. 93(11). — P. 5443–5448.

101. Ito, K. Single amino acid substitution in prokaryote polypeptide release factor 2 permits it to terminate translation at all three stop codons / K. Ito, M. Uno, Y. Nakamura // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* — 1998. — Vol. 95(14). — P. 8165–8169.

102. Ivanov, P.V. Interactions between UPF1, eRFs, PABP and the exon junction complex suggest an integrated model for mammalian NMD pathways / P.V. Ivanov, N.H. Gehring, J.B. Kunz, M.W. Hentze, A.E. Kulozik // *EMBO J.* — 2008. —

Vol. 27(5). — P. 736–747.

103. Jung, G. Guanidine hydrochloride inhibits Hsp104 activity *in vivo*: A possible explanation for its effect in curing yeast prions / G. Jung, D.C. Masison // *Curr. Microbiol.* — 2001. — Vol. 43(1). — P. 7–10.

104. Kabani, M. Yeast prions assembly and propagation: Contributions of the prion and non-prion moieties and the nature of assemblies / M. Kabani, R. Melki // *Prion.* — 2011. — Vol. 5(4). — P. 277–284.

105. Kabani, M. A role for the proteasome in the turnover of Sup35p and in [*PSI*⁺] prion propagation / M. Kabani, V. Redeker, R. Melki // *Mol. Microbiol.* — 2014. — Vol. 92(3). — P. 507–528.

106. Kaiser, C. *Methods in yeast genetics* / C. Kaiser, S. Michaelis, A. Mitchell // New York: CSHL Press. — 1994. — 234 p.

107. Kajava, A.V. A model for Ure2p prion filaments and other amyloids: The parallel superpleated β -structure / A.V. Kajava, U. Baxa, R.B. Wickner, A.C. Steven // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* — 2004. — Vol. 101(21). — P. 7885–7890.

108. Kalastavadi, T. Analysis of the [*RNQ*⁺] prion reveals stability of amyloid fibers as the key determinant of yeast prion variant propagation / T. Kalastavadi, H.L. True // *J. Biol. Chem.* — 2010. — Vol. 285(27). — P. 20748–20755.

109. Kelly, A. C. Sex, prions, and plasmids in yeast / A.C. Kelly, F.P. Shewmaker, D. Kryndushkin, R.B. Wickner // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* — 2012. — Vol. 109(40). — P. E2683–E2690.

110. Kervestin, S. NMD: A multifaceted response to premature translational termination / S. Kervestin, A. Jacobson // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* — 2012. — Vol. 13(11). — P. 700–712.

111. Khoshnevis, S. The iron-sulphur protein RNase L inhibitor functions in translation termination / S. Khoshnevis, T. Gross, C. Rotte, C. Baierlein, R. Ficner, H. Krebber // *EMBO Rep.* — 2010. — Vol. 11(3). — P. 214–219.

112. Kiktev, D. The paradox of viable *sup45* STOP mutations: a necessary equilibrium between translational readthrough, activity and stability of the protein / D. Kiktev, S. Moskalenko, O. Murina, A. Baudin-Baillieu, J.-P. Rousset, G.

Zhouravleva // Mol. Genet. Genomics. — 2009. — Vol. 282(1). — P. 83–96.

113. Kiktev, D.A. Feedback control of prion formation and propagation by the ribosome-associated chaperone complex / D.A. Kiktev, M.M. Melomed, C.D. Lu, G.P. Newnam, Y.O. Chernoff // Mol. Microbiol. — 2015. — Vol. 96(3). — P. 621–632.

114. Kiktev, D. Prion-dependent lethality of *sup45* mutants in *Saccharomyces cerevisiae* / D. Kiktev, S.I. Vechtomov, G. Zhouravleva // Prion. — 2007. — Vol. 1(2). — P. 136–143.

115. Kikuchi, Y. A yeast gene required for the G1-to-S transition encodes a protein containing an A-kinase target site and GTPase domain. / Y. Kikuchi, H. Shimatake, A. Kikuchi // EMBO J. — 1988. — Vol. 7(4). — P. 1175–1182.

116. Kim, O.T.P. Newly sequenced eRF1s from ciliates: the diversity of stop codon usage and the molecular surfaces that are important for stop codon interactions / O.T.P. Kim, K. Yura, N. Go, T. Harumoto // Gene. — 2005. — Vol. 346. — P. 277–286.

117. Kim, O.T.P. Ciliates use both variant and universal genetic codes: Evidence of omnipotent eRF1s in the class Litostomatea / O.T.P. Kim, A. Sakurai, K. Saito, K. Ito, K. Ikehara, T. Harumoto // Gene. — 2008. — Vol. 417(1–2). — P. 51–58.

118. King, C.Y. Supporting the structural basis of prion strains: Induction and identification of [*PSI*⁺] variants / C.Y. King // J. Mol. Biol. — 2001. — Vol. 307(5). — P. 1247–1260.

119. King, C.Y. Protein-only transmission of three yeast prion strains / C.Y. King, R. Diaz-Avalos // Nature. — 2004. — Vol. 428(6980). — P. 319–323.

120. Kleppe, A.S. Robustness by intrinsically disordered C-termini and translational readthrough / A.S. Kleppe, E. Bornberg-Bauer // Nucleic Acids Res. — 2018. — Vol. 46(19). — P. 10184–10194.

121. Kobayashi, T. The GTP-binding release factor eRF3 as a key mediator coupling translation termination to mRNA decay / T. Kobayashi, Y. Funakoshi, S.I. Hoshino, T. Katada // J. Biol. Chem. — 2004. — Vol. 279(44). — P. 45693–45700.

122. Kochneva-Pervukhova, N.V. Mechanism of inhibition of Ψ^+ prion determinant propagation by a mutation of the N-terminus of the yeast Sup35 protein /

N.V. Kochneva-Pervukhova, S.V. Paushkin, V.V. Kushnirov, B.S. Cox, M.F. Tuite, M.D. Ter-Avanesyan // *EMBO J.* — 1998. — Vol. 17(19). — P. 5805–5810.

123. Kochneva-Pervukhova, N.V. [*PSI*⁺] prion generation in yeast: Characterization of the "strain" difference / N.V. Kochneva-Pervukhova, M.B. Chechenova, I.A. Valouev, V.V. Kushnirov, V.N. Smirnov, M.D. Ter-Avanesyan // *Yeast.* — 2001. — Vol. 18(6). — P. 489–497.

124. Kong, C. Crystal structure and functional analysis of the eukaryotic class II release factor eRF3 from *S. pombe* / C. Kong, K. Ito, M.A. Walsh, M. Wada, Y. Liu, S. Kumar, et al. // *Mol. Cell.* — 2004. — Vol. 14(2). — P. 233–245.

125. Kryndushkin, D.S. Yeast [*PSI*⁺] prion aggregates are formed by small Sup35 polymers fragmented by Hsp104. / D.S. Kryndushkin, I.M. Alexandrov, M.D. Ter-Avanesyan, V.V. Kushnirov // *J. Biol. Chem.* — 2003. — Vol. 278(49). — P. 49636–49643.

126. Kushnirov, V.V. Structural bases of prion variation in yeast / V.V. Kushnirov, A.A. Dergalev, M.K. Alieva, A.I. Alexandrov // *Int. J. Mol. Sci.* — 2022. — Vol. 23(10). — P. 5738.

127. Kushnirov, V.V. Localization of possible functional domains in *sup2* gene product of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* / V.V. Kushnirov, M.D. Ter-Avanesyan, A.P. Surguchov, V.N. Smirnov, S.G. Inge-Vechtomov // *FEBS Lett.* — 1987. — Vol. 215(2). — P. 257–260.

128. Kushnirov, V.V. Nucleotide sequence of the *SUP2* (*SUP35*) gene of *Saccharomyces cerevisiae* / V.V. Kushnirov, M.D. Ter-Avanesyan, M.V. Telckov, A.P. Surguchov, V.N. Smirnov, S.G. Inge-Vechtomov // *Gene.* — 1988. — Vol. 66(1). — P. 45–54.

129. Kushnirov, V.V. Rapid and reliable protein extraction from yeast / V.V. Kushnirov // *Yeast.* — 2000. — Vol. 16(9). — P. 857–860.

130. Kushnirov, V.V. Purification and analysis of prion and amyloid aggregates / V.V. Kushnirov, I.M. Alexandrov, O.V. Mitkevich, I.S. Shkundina, M.D. Ter-Avanesyan // *Methods.* — 2006. — Vol. 39(1). — P. 50–55.

131. Kushnirov, V.V. Structure and functional similarity of yeast Sup35p and Ure2p

proteins to mammalian prions / V.V. Kushnirov, M.D. Ter-Avanesian, V.N. Smirnov // Mol. Biol. — 1995. — Vol. 29(4). — P. 750–755.

132. Kushnirov, V.V. Structure and replication of yeast prions / V.V. Kushnirov, M.D. Ter-Avanesyan // Cell. — 1998. — Vol. 94(1). — P. 13–16.

133. Kuzmiak, H.A. Applying nonsense-mediated mRNA decay research to the clinic: progress and challenges / H.A. Kuzmiak, L.E. Maquat // Trends Mol. Med. — 2006. T. 12. № 7. C. 306–316.

134. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 / U.K. Laemmli // Nature. — 1970. — Vol. 227(5259). — P. 680–685.

135. Lancaster, A.K. The spontaneous appearance rate of the yeast prion [*PSI*⁺] and its implications for the evolution of the evolvability properties of the [*PSI*⁺] system / A.K. Lancaster, J.P. Bardill, H.L. True, J. Masel // Genetics. — 2010. — Vol. 184(2). — P. 393–400.

136. Lee, H.L.R. Pharmaceutical therapies to recode nonsense mutations in inherited diseases / H.L.R. Lee, J.P. Dougherty // Pharmacol. Ther. — 2012. — Vol. 136(2). — P. 227–266.

137. Leeds, P. The product of the yeast *UPF1* gene is required for rapid turnover of mRNAs containing a premature translational termination codon / P. Leeds, S. W. Peltz, A. Jacobson, M. R. Culbertson // Genes Dev. — 1991. — Vol. 5(12). — P. 2303–2313.

138. Leeds, P. Gene products that promote mRNA turnover in *Saccharomyces cerevisiae* / P. Leeds, J. M. Wood, B. S. Lee, M. R. Culbertson // Mol. Cell. Biol. — 1992. — Vol. 12(5). — P. 2165–2177.

139. Liang, A. The ciliate *Euplotes octocarinatus* expresses two polypeptide release factors of the type eRF1 / A. Liang, C. Brünen-Nieweler, T. Muramatsu, Y. Kuchino, H. Beier, K. Heckmann // Gene. — 2001. — Vol. 262(1–2). — P. 161–168.

140. Liebman, S.W. A non-Mendelian factor, [*ETA*⁺], causes lethality of yeast omnipotent-suppressor strains / S.W. Liebman, J.A. All-Robyn // Curr. Genet. — 1984. — Vol. 8(8). — P. 567–573.

141. Liebman, S.W. Prions in yeast / S.W. Liebman, Y.O. Chernoff // Genetics. —

2012. — Vol. 191(4). — P. 1041–1072.

142. Lin, J.Y. Inter-allelic prion propagation reveals conformational relationships among a multitude of [*PSI*⁺] strains / J.Y. Lin, T.Y. Liao, H.C. Lee, C.Y. King // *PLoS Genet.* — 2011. — Vol. 7(9). — P. e1002297.

143. Liu, J.J. Oligopeptide-repeat expansions modulate "protein-only" inheritance in yeast / J.J. Liu, S. Lindquist // *Nature.* — 1999. — Vol. 400(6744). — P. 573–576.

144. Liu, J.J. Changes in the middle region of Sup35 profoundly alter the nature of epigenetic inheritance for the yeast prion [*PSI*⁺] / J.J. Liu, N. Sondheimer, S.L. Lindquist // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* — 2002. — Vol. 99(SUPPL. 4). — P. 16446–16453.

145. Loughran, G. Evidence of efficient stop codon readthrough in four mammalian genes / G. Loughran, M.-Y. Chou, I.P. Ivanov, I. Jungreis, M. Kellis, A. M. Kiran, et al. // *Nucleic Acids Res.* — 2014. — Vol. 42(14). — P. 8928–8938.

146. Loughran, G. Stop codon readthrough generates a C-terminally extended variant of the human Vitamin D receptor with reduced calcitriol response / G. Loughran, I. Jungreis, I. Tzani, M. Power, R.I. Dmitriev, I.P. Ivanov, et al. // *J. Biol. Chem.* — 2018. — Vol. 293(12). — P. 4434–4444.

147. Maksiutenko, E.M. Gene Amplification as a mechanism of yeast adaptation to nonsense mutations in release factor genes / E.M. Maksiutenko, Y.A. Barbitoff, A.G. Matveenko, S.E. Moskalenko, G.A. Zhouravleva // *Genes (Basel).* — 2021. — Vol. 12(12). — P. 2019.

148. Mangus, D. A. Poly(A)-binding proteins: Multifunctional scaffolds for the post-transcriptional control of gene expression / D.A. Mangus, M.C. Evans, A. Jacobson // *Genome Biology.* — 2003. — Vol. 4(7). — P. 223.

149. Manuvakhova, M. Aminoglycoside antibiotics mediate context-dependent suppression of termination codons in a mammalian translation system / M. Manuvakhova, K. Keeling, D.M. Bedwell // *RNA.* — 2000. — Vol. 6(7). — P. 1044–1055.

150. Matheisl, S. Structure of a human translation termination complex / S. Matheisl, O. Berninghausen, T. Becker, R. Beckmann // *Nucleic Acids Res.* — 2015.

— Vol. 43(18). — P. 8615–8626.

151. Matiiv, A.B. Structure and polymorphism of amyloid and amyloid-like aggregates / A.B. Matiiv, N.P. Trubitsina, A.G. Matveenko, Y.A. Barbitoff, G.A. Zhouravleva, S.A. Bondarev // *Biochem.* — 2022. — Vol. 87(5). — P. 450–463.

152. Matveenko, A.G. SFP1-mediated prion-dependent lethality is caused by increased Sup35 aggregation and alleviated by Sis1 / A.G. Matveenko, P.B. Drozdova, M.V. Belousov, S.E. Moskalenko, S.A. Bondarev, Y.A. Barbitoff, et al. // *Genes Cells.* — 2016. — Vol. 21(12). — P. 1290–1308.

153. McCaughan, K.K. Translational termination efficiency in mammals is influenced by the base following the stop codon / K.K. McCaughan, C.M. Brown, M.E. Dalphin, M.J. Berry, W.P. Tate // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* — 1995. — Vol. 92(12). — P. 5431–5.

154. McGlinchey, R.P. Suicidal [*PSI*⁺] is a lethal yeast prion / R.P. McGlinchey, D. Kryndushkin, R.B. Wickner // *Proc. Natl. Acad. Sci.* — 2011. — Vol. 108(13). — P. 5337–5341.

155. Merkulova, T.I. C-terminal domains of human translation termination factors eRF1 and eRF3 mediate their *in vivo* interaction / T.I. Merkulova, L.Y. Frolova, M. Lazar, J. Camonis, L.L. Kisselev // *FEBS Lett.* — 1999. — Vol. 443(1). — P. 41–47.

156. Mikhailova, T. RNA helicase DDX19 stabilizes ribosomal elongation and termination complexes / T. Mikhailova, E. Shuvalova, A. Ivanov, D. Susorov, A. Shuvalov, P.M. Kolosov, et al. // *Nucleic Acids Res.* — 2017. — Vol. 45(3). — P. 1307–1318.

157. Mogk, A. Cooperation of Hsp70 and Hsp100 chaperone machines in protein disaggregation / A. Mogk, E. Kummer, B. Bukau // *Front. Mol. Biosci.* — 2015. — Vol. 2. — P. 22.

158. Morano, K.A. The response to heat shock and oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae* / K.A. Morano, C.M. Grant, W.S. Moye-Rowley // *Genetics.* — 2012. — Vol. 190(4). — P. 1157–1195.

159. Moskalenko, S.E. Viable nonsense mutants for the essential gene *SUP45* of

Saccharomyces cerevisiae / S.E. Moskalenko, S.V. Chabelskaya, S.G. Inge-Vechtomov, M. Philippe, G.A. Zhouravleva // BMC Mol. Biol. — 2003. — Vol. 4. — P. 2.

160. Na, I. A putative role of the Sup35p C-terminal domain in the cytoskeleton organization during yeast mitosis / I. Na, K.D. Reddy, L. Breydo, B. Xue, V.N. Uversky // Mol. Biosyst. — 2014. — Vol. 10(4). — P. 925–940.

161. Nakayashiki, T. Yeast [*PSI*⁺] "prions" that are crosstransmissible and susceptible beyond a species barrier through a quasi-prion state / T. Nakayashiki, K. Ebihara, H. Bannai, Y. Nakamura // Mol. Cell. — 2001. — Vol. 7(6). — P. 1121–1130.

162. Natarajan, A. Comparison of mutant forms of the green fluorescent protein as expression markers in Chinese hamster ovary (CHO) and *Saccharomyces cerevisiae* cells / A. Natarajan, S. Subramanian, F. Srienc // J. Biotechnol. — 1998. — Vol. 62(1). — P. 29–45.

163. Ness, F. Guanidine hydrochloride inhibits the generation of prion "seeds" but not prion protein aggregation in yeast / F. Ness, P. Ferreira, B.S. Cox, M.F. Tuite // Mol. Cell. Biol. — 2002. — Vol. 22(15). — P. 5593–5605.

164. Ness, F. Over-expression of the molecular chaperone Hsp104 in *Saccharomyces cerevisiae* results in the malpartition of [*PSI*⁺] propagons / F. Ness, B.S. Cox, J. Wongwigkarn, W.R. Naeimi, M.F. Tuite // Mol. Microbiol. — 2017. — Vol. 104(1). — P. 125–143.

165. Newnam, G.P. Antagonistic interactions between yeast chaperones Hsp104 and Hsp70 in prion curing / G.P. Newnam, R.D. Wegrzyn, S.L. Lindquist, Y.O. Chernoff // Mol. Cell. Biol. — 1999. — Vol. 19(2). — P. 1325–1333.

166. Newnam, G.P. Destabilization and recovery of a yeast prion after mild heat shock / G.P. Newnam, J.L. Birchmore, Y.O. Chernoff // J. Mol. Biol. — 2011. — Vol. 408(3). — P. 432–448.

167. Ohhashi, Y. Differences in prion strain conformations result from non-native interactions in a nucleus / Y. Ohhashi, K. Ito, B.H. Toyama, J.S. Weissman, M. Tanaka // Nat. Chem. Biol. — 2010. — Vol. 6(3). — P. 225–230.

168. Ohhashi, Y. Molecular basis for diversification of yeast prion strain

conformation / Y. Ohhashi, Y. Yamaguchi, H. Kurahashi, Y.O. Kamatari, S. Sugiyama, B. Uluca, et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. — 2018. — Vol. 115(10). — P. 2389–2394.

169. Osherovich, L.Z. Dissection and design of yeast prions / L.Z. Osherovich, B.S. Cox, M.F. Tuite, J.S. Weissman // PLoS Biol. — 2004. — Vol. 2(4). — P. 442–451.

170. Palma, M. Deciphering the molecular mechanism of stop codon readthrough / M. Palma, F. Lejeune // Biol. Rev. — 2021. — Vol. 96(1). — P. 310–329.

171. Park, Y.N. Hsp104 overexpression cures *Saccharomyces cerevisiae* [*PSI*⁺] by causing dissolution of the prion seeds / Y.N. Park, X.Zhao, Y.I. Yim, H. Todor, R. Ellerbrock, M. Reidy, et al. // Eukaryot. Cell. — 2014. — Vol. 13(5). — P. 635–647.

172. Patino, M. M. Support for the prion hypothesis for inheritance of a phenotypic trait in yeast / M.M. Patino, J.J. Liu, J.R. Glover, S. Lindquist // Science. — 1996. — Vol. 273(5275). — P. 622–626.

173. Paushkin, S.V. Propagation of the yeast prion-like [*PSI*⁺] determinant is mediated by oligomerization of the *SUP35*-encoded polypeptide chain release factor / S.V. Paushkin, V.V Kushnirov, V.N. Smirnov, M.D. Ter-Avanesyan // EMBO J. — 1996. — Vol. 15(12). — P. 3127–3134.

174. Paushkin, S.V. *In vitro* propagation of the prion-like state of yeast Sup35 protein / S.V Paushkin, V.V Kushnirov, V.N. Smirnov, M.D. Ter-avanesyanyan // Science. — 1997. — Vol. 277. — P. 381–383.

175. Pedersen, W.T. Effects of the nucleotide 3' to an amber codon on ribosomal selection rates of suppressor tRNA and release factor-1 / W. T. Pedersen, J. F. Curran // J. Mol. Biol. — 1991. — Vol. 219(2). — P. 231–241.

176. Pei, F. A dominant-negative mutant inhibits multiple prion variants through a common mechanism / F. Pei, S. DiSalvo, S.S. Sindi, T.R. Serio // PLoS Genet. — 2017. — Vol. 13(10). — P. e1007085.

177. Pisarev, A. V. The role of ABCE1 in eukaryotic posttermination ribosomal recycling / A.V. Pisarev, M.A. Skabkin, V.P. Pisareva, O.V. Skabkina, A.M. Rakotondrafara, M.W. Hentze, et al. // Mol. Cell. — 2010. — Vol. 37(2). — P. 196–210.

178. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R foundation for statistical computing. <https://www.R-project.org/> / R Core Team // R Found. Stat. Comput. — 2023. — Vol. 2. — P. 2021.
179. Rajon, E. Evolution of molecular error rates and the consequences for evolvability / E. Rajon, J. Masel // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. — 2011. — Vol. 108(3). — P. 1082–1087.
180. Resende, C.G. Prion protein gene polymorphisms in *Saccharomyces cerevisiae* / C.G. Resende, T.F. Outeiro, L. Sands, S. Lindquist, M.F. Tuite // Mol. Microbiol. — 2003. — Vol. 49(4). — P. 1005–1017.
181. Roque, S. Interaction between the poly(A)-binding protein Pab1 and the eukaryotic release factor eRF3 regulates translation termination but not mRNA decay in *Saccharomyces cerevisiae* / S. Roque, M. Cerciati, S. Gaugué, L. Mora, A. G. Floch, M. De Zamaroczy, et al. // RNA. — 2015. — Vol. 21(1). — P. 124–134.
182. Salas-Marco, J. Distinct paths to stop codon reassignment by the variant-code organisms tetrahymena and euplotes / J. Salas-Marco, H. Fan-Minogue, A.K. Kallmeyer, L.A. Klobutcher, P.J. Farabaugh, D.M. Bedwell // Mol. Cell. Biol. — 2006. — Vol. 26(2). — P. 438–447.
183. Salas-Marco, J. GTP hydrolysis by eRF3 facilitates stop codon decoding during eukaryotic translation termination / J. Salas-Marco, D. M. Bedwell // Mol. Cell. Biol. — 2004. — Vol. 24(17). — P. 7769–7778.
184. Salnikova, A. B. Nonsense suppression in yeast cells overproducing Sup35 (eRF3) is caused by its non-heritable amyloids / A.B. Salnikova, D.S. Kryndushkin, V.N. Smirnov, V.V. Kushnirov, M.D. Ter-Avanesyan // J. Biol. Chem. — 2005. — Vol. 280(10). — P. 8808–8812.
185. Sambrook, J. Molecular cloning: a laboratory manual / J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis // New York: CSHL Press, — 1989. — 723 p.
186. Santoso, A. Molecular basis of a yeast prion species barrier / A. Santoso, P. Chien, L.Z. Osherovich, J.S. Weissman // Cell. — 2000. — Vol. 100(2). — P. 277–288.
187. Sasikumar, A.N. The many roles of the eukaryotic elongation factor 1 complex / A.N. Sasikumar, W.B. Perez, T.G. Kinzy // Wiley Interdiscip. Rev. RNA. — 2012. —

Vol. 3(4). — P. 543–555.

188. Schaefer, M.H. Evolution and function of CAG/polyglutamine repeats in protein-protein interaction networks / M.H. Schaefer, E.E. Wanker, M.A. Andrade-Navarro // *Nucleic Acids Res.* — 2012. — Vol. 40(10). — P. 4273–4287.

189. Schlumpberger, M. Induction of distinct [*URE3*] yeast prion strains / M. Schlumpberger, S.B. Prusiner, I. Herskowitz // *Mol. Cell. Biol.* — 2001. — Vol. 21(20). — P. 7035–7046.

190. Schneider, C.A. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis / C.A. Schneider, W.S. Rasband, K.W. Eliceiri // *Nat. Methods.* — 2012. — Vol. 9(7). — P. 671–675.

191. Schuller, A.P. Roadblocks and resolutions in eukaryotic translation / A.P. Schuller, R. Green. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* — 2018. — Vol. 19(8). — P. 526–541.

192. Seit-Nebi, A. Class-1 translation termination factors: Invariant GGQ minidomain is essential for release activity and ribosome binding but not for stop codon recognition / A. Seit-Nebi, L. Frolova, J. Justesen, L. Kisselev // *Nucleic Acids Res.* — 2001. — Vol. 29(19). — P. 3982–3987.

193. Serdar, L.D. ATP hydrolysis by UPF1 is required for efficient translation termination at premature stop codons / L.D. Serdar, D.J.L. Whiteside, K.E. Baker // *Nat. Commun.* — 2016. — Vol. 7. — P. 14021.

194. Serio, T.R. Yeast prion [*PSI*⁺] and its determinant, Sup35p / T.R. Serio, A.G. Cashikar, J.J. Moslehi, A.S. Kowal, S.L. Lindquist // *Methods Enzymol.* — 1999. — Vol. 309(1997). — P. 649–673.

195. Shao, S. Decoding mammalian ribosome-mRNA states by translational GTPase complexes / S. Shao, J. Murray, A. Brown, J. Taunton, V. Ramakrishnan, R.S. Hegde // *Cell.* — 2016. — Vol. 167(5). — P. 1229–1240.

196. Sharma, J. [*PSI*⁺] prion variant establishment in yeast / J. Sharma, S.W. Liebman // *Mol. Microbiol.* — 2012. — Vol. 86(4). — P. 866–881.

197. Shoemaker, C.J. Kinetic analysis reveals the ordered coupling of translation termination and ribosome recycling in yeast / C.J. Shoemaker, R. Green // *Proc. Natl.*

Acad. Sci. U. S. A. — 2011. — Vol. 108(51). — P. E1392–E1398.

198. Sikorski, R.S. A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae* / R.S. Sikorski, P. Hieter // Genetics. — 1989. — Vol. 122(1). — P. 19–27.

199. Singh, A. Phenotypic suppression and misreading in *Saccharomyces cerevisiae* / A. Singh, D. Ursic, J. Davies // Nature. — 1979. — Vol. 277(5692). — P. 146–148.

200. Skuzeski, J.M. The signal for a leaky UAG stop codon in several plant viruses includes the two downstream codons / J.M. Skuzeski, L.M. Nichols, R.F. Gesteland, J.F. Atkins // J. Mol. Biol. — 1991. — Vol. 218(2). — P. 365–373.

201. Song, H. The crystal structure of human eukaryotic release factor eRF1 — mechanism of stop codon recognition and peptidyl-tRNA hydrolysis / H. Song, P. Mugnier, A.K. Das, H.M. Webb, D.R. Evans, M.F. Tuite, et al. // Cell. — 2000. — Vol. 100(3). — P. 311–321.

202. Speldewinde, S. The frequency of yeast [*PSI*⁺] prion formation is increased during chronological ageing / S. Speldewinde, C. Grant // Microb. Cell. — 2017. — Vol. 4(4). — P. 127–132.

203. Stansfield, I. The products of the *SUP45* (eRF1) and *SUP35* genes interact to mediate translation termination in *Saccharomyces cerevisiae* / I. Stansfield, K.M. Jones, V.V. Kushnirov, A.R. Dagkesamanskaya, A.I. Poznyakovski, S.V. Paushkin, et al. // EMBO J. — 1995. — Vol. 14(17). — P. 4365–4373.

204. Stansfield, I. Depletion in the levels of the release factor eRF1 causes a reduction in the efficiency of translation termination in yeast / I. Stansfield, L. Eurwilaichitr, Akhmaloka, M.F. Tuite // Mol. Microbiol. — 1996. — Vol. 20(6). — P. 1135–1143.

205. Sulatskaya, A.I. Point mutations affecting yeast prion propagation change the structure of its amyloid fibrils / A.I. Sulatskaya, S.A. Bondarev, M.I. Sulatsky, N.P. Trubitsina, M.V. Belousov, G.A. Zhouravleva, et al. // J. Mol. Liq. — 2020. — Vol. 314. — P. 113618.

206. Surguchov, A.P. Absence of structural homology between *sup1* and *sup2* genes of yeast *Saccharomyces cerevisiae* and identification of their transcripts /

A.P. Surguchov, M.V. Telkov, V.N. Smirnov // FEBS Lett. — 1986. — Vol. 206(1). — P. 147–150.

207. Tanaka, M. Conformational variations in an infectious protein determine prion strain differences / M. Tanaka, P. Chien, N. Naber, R. Cooke, J.S. Weissman // Nature. — 2004. — Vol. 428(6980). — P. 323–328.

208. Tanaka, M. The physical basis of how prion conformations determine strain phenotypes / M. Tanaka, S.R. Collins, B.H. Toyama, J.S. Weissman // Nature. — 2006. — Vol. 442(7102). — P. 585–589.

209. Tanaka, M. A protein transformation protocol for introducing yeast prion particles into yeast // Elsevier. — 2010. — C. 681–693.

210. Tate, W.P. Translational termination efficiency in both bacteria and mammals is regulated by the base following the stop codon / W.P. Tate, E.S. Poole, J.A. Horsfield, S.A. Mannering, C.M. Brown, J.G. Moffat, et al. // Biochem. cell Biol. — 1995. — Vol. 73(11–12). — P. 1095–1103.

211. Tate, W.P. Three, four or more: The translational stop signal at length / W.P. Tate, S.A. Mannering // Mol. Microbiol. — 1996. — Vol. 21(2). — P. 213–219.

212. Ter-Avanesyan, M.D. The *SUP35* omnipotent suppressor gene is involved in the maintenance of the non-Mendelian determinant [*PSI*⁺] in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* / M.D. Ter-Avanesyan, A.R. Dagkesamanskaya, V.V. Kushnirov, V.N. Smirnov // Genetics. — 1994. — Vol. 137(3). — P. 671–676.

213. Ter-Avanesyan, M.D. Deletion analysis of the *SUP35* gene of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* reveals two non-overlapping functional regions in the encoded protein / M.D. Ter-Avanesyan, V.V. Kushnirov, A.R. Dagkesamanskaya, S.A. Didichenko, Y.O. Chernoff, S.G. Inge-Vechtomov, et al. // Mol. Microbiol. — 1993. — Vol. 7(5). — P. 683–692.

214. Tikhomirova, V.L. Sensitivity of *sup35* and *sup45* suppressor mutants in *Saccharomyces cerevisiae* to the anti microtubule drug benomyl / V.L. Tikhomirova, S.G. Inge-Vechtomov // Curr. Genet. — 1996. — Vol. 30(1). — P. 44–49.

215. Tork, S. The major 5' determinant in stop codon read-through involves two adjacent adenines / S. Tork, I. Hatin, J. P. Rousset, C. Fabret // Nucleic Acids Res. —

2004. — Vol. 32(2). — P. 415–421.

216. Trubitsina, N.P. From past to future: Suppressor mutations in yeast genes encoding translation termination factors / N.P. Trubitsina, O.M. Zemlyanko, S.E. Moskalenko, G.A. Zhouravleva // *Biol. Commun.* — 2019. — Vol. 64(2). — P. 89–109.

217. Trubitsina, N.P. Nonsense mutations in the yeast *SUP35* gene affect the [*PSI*⁺] prion propagation / N.P. Trubitsina, O.M. Zemlyanko, S.A. Bondarev, G.A. Zhouravleva // *Int. J. Mol. Sci.* — 2020. — Vol. 21(5). — P. 1648.

218. True, H.L. A yeast prion provides a mechanism for genetic variation and phenotypic diversity / H.L. True, S.L. Lindquist // *Nature*. — 2000. — Vol. 407(6803). — P. 477.

219. Tyedmers, J. Prion switching in response to environmental stress / J. Tyedmers, M.L. Madariaga, S. Lindquist // *PLoS Biol.* — 2008. — Vol. 6(11). — P. 2605–2613.

220. Uchida, N.A novel role of the mammalian GSPT/eRF3 associating with poly(A)-binding protein in cap/poly(A)-dependent translation / N. Uchida, S.-I. Hoshino, H. Imataka, N. Sonenberg, T. Katada // *J. Biol. Chem.* — 2002. — Vol. 277(52). — P. 50286–50292.

221. Uptain, S.M. Strains of [*PSI*⁺] are distinguished by their efficiencies of prion-mediated conformational conversion / S.M. Uptain, G.J. Sawicki, B. Caughey, S. Lindquist // *EMBO J.* — 2001. — Vol. 20(22). — P. 6236–6245.

222. Urakov, V.N. Ribosome-bound Pub1 modulates stop codon decoding during translation termination in yeast / V.N. Urakov, O.V. Mitkevich, I.V. Safenkova, M.D. Ter-Avanesyanyan // *FEBS J.* — 2017. — Vol. 284(12). — P. 1914–1930.

223. Valouev, I.A. Translation termination factors function outside of translation: Yeast eRF1 interacts with myosin light chain, Mlc1p, to effect cytokinesis / I.A. Valouev, V.N. Urakov, N.V. Kochneva-Pervukhova, V.N. Smirnov, M.D. Ter-Avanesyanyan // *Mol. Microbiol.* — 2004. — Vol. 53(2). — P. 687–696.

224. Valouev, I.A. Yeast polypeptide chain release factors eRF1 and eRF3 are involved in cytoskeleton organization and cell cycle regulation / I.A. Valouev,

V.V. Kushnirov, M.D. Ter-Avanesyan // Cell Motil. Cytoskeleton. — 2002. — Vol. 52(3). — P. 161–173.

225. Verges, K. J. Strain conformation, primary structure and the propagation of the yeast prion [*PSI*⁺] / K. J. Verges, M. H. Smith, B. H. Toyama, J. S. Weissman // Nat. Struct. Mol. Biol. — 2011. — Vol. 18(4). — P. 493–500.

226. Volkov, K. N-terminal extension of *Saccharomyces cerevisiae* translation termination factor eRF3 influences the suppression efficiency of *sup35* mutations / K. Volkov, K. Osipov, I. Valouev, S. Inge-Vechtomov, L. Mironova // FEMS Yeast Res. — 2007. — Vol. 7(3). — P. 357–365.

227. Volkov, K.V. Novel non-mendelian determinant involved in the control of translation accuracy in *Saccharomyces cerevisiae* / K.V. Volkov, A.Y. Aksenova, M.J. Soom, K.V. Osipov, A.V. Svitin, C. Kurischko, et al. // Genetics. — 2002. — Vol. 160(1). — P. 25–36.

228. Wang, K. A prolonged chronological lifespan is an unexpected benefit of the [*PSI*⁺] prion in yeast / K. Wang, R. Melki, M. Kabani // PLoS One. — 2017. — Vol. 12(9). — P. e0184905.

229. Wang, W. The role of Upf proteins in modulating the translation read-through of nonsense-containing transcripts / W. Wang, K. Czaplinski, Y. Rao, S. W. Peltz // EMBO J. — 2001. — Vol. 20(4). — P. 880–890.

230. Watts, J. C. Experimental models of inherited PrP prion diseases / J.C. Watts, S.B. Prusiner // Cold Spring Harb. Perspect. Med. — 2017. — Vol. 7(11). — P. a027151.

231. Westergard, L. Extracellular environment modulates the formation and propagation of particular amyloid structures / L. Westergard, H.L. True // Mol. Microbiol. — 2014. — Vol. 92(4). — P. 698–715.

232. Wickner, R.B. [*URE3*] as an altered *URE2* protein: Evidence for a prion analog in *Saccharomyces cerevisiae* / R.B. Wickner // Science. — 1994. — Vol. 264(5158). — P. 566–569.

233. Wickner, R.B. Yeast prions: structure, biology, and prion-handling systems / R.B. Wickner, F.P. Shewmaker, D.A. Bateman, H.K. Edskes, A. Gorkovskiy,

- Y. Dayani, et al. // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* — 2015. — Vol. 79(1). — P. 1–17.
234. Wickner, R.B. Yeast prions compared to functional prions and amyloids // *J. Mol. Biol.* — 2018. — Vol. 430(20). — P. 3707–3719.
235. Wickner, R.B. Study of amyloids using yeast / R.B. Wickner, D. Kryndushkin, F. Shewmaker, R. McGlinchey, H.K. Edskes // *Methods Mol. Biol.* — 2018. — Vol. 1779. — P. 313–339.
236. Wickner, R.B. Anti-prion systems in yeast / R.B. Wickner // *J. Biol. Chem.* — 2019. — Vol. 294(5). — P. 1729–1738.
237. Wilson, P.G. SUF12 suppressor protein of yeast. A fusion protein related to the EF-1 family of elongation factors / P.G. Wilson, M.R. Culbertson // *J. Mol. Biol.* — 1988. — Vol. 199(4). — P. 559–573.
238. Winkler, J. Hsp70 targets Hsp100 chaperones to substrates for protein disaggregation and prion fragmentation / J. Winkler, J. Tyedmers, B. Bukau, A. Mogk // *J. Cell Biol.* — 2012. — Vol. 198(3). — P. 387–404.
239. Zhang, T. An improved method for whole protein extraction from yeast *Saccharomyces cerevisiae* / T. Zhang, J. Lei, H. Yang, K. Xu, R. Wang, Z. Zhang // *Yeast.* — 2011. — Vol. 28. — P. 795–798.
240. Zhao, X. Heat shock protein 104 (Hsp104)-mediated curing of [*PSI*⁺] yeast prions depends on both [*PSI*⁺] conformation and the properties of the Hsp104 homologs / X. Zhao, R. Rodriguez, R.E. Silberman, J.M. Ahearn, S. Saidha, K.C. Cummins, et al. // *J. Biol. Chem.* — 2017. — Vol. 292(21). — P. 8630–8641.
241. Zhou, P. The yeast non-Mendelian factor [*ETA*⁺] is a variant of [*PSI*⁺], a prion-like form of release factor eRF3 / P. Zhou, I.L. Derkatch, S.M. Uptain, M.M. Patino, S. Lindquist, S.W. Liebman // *EMBO J.* — 1999. — Vol. 18(5). — P. 1182–1191.
242. Zhouravleva, G. Termination of translation in eukaryotes is governed by two interacting polypeptide chain release factors, eRF1 and eRF3 / G. Zhouravleva, L. Frolova, X. Le Goff, R. Le Guellec, S. Inge-Vechtomov, L. Kisselev, et al. // *EMBO J.* — 1995. — Vol. 14(16). — P. 4065–4072.
243. Zhouravleva, G. To stick or not to stick: Prion domains from yeast to mammals / G. Zhouravleva, V. Alenin, S. Inge-Vechtomov, Y. Chernoff // *Recent Res. Dev. Mol.*

Cell Biol. — 2002. — Vol. 3. — P. 185–219.

244. Zhouravleva, G.A. Role of proteins interacting with the eRF1 and eRF3 release factors in the regulation of translation and prionization / G.A. Zhouravleva, S.A. Bondarev, O.M. Zemlyanko, S.E. Moskalenko // Mol. Biol. (Mosk). — 2022. — Vol. 56(2). — P. 206–226.

245. Zhouravleva, G.A. How big is the yeast prion universe? / G.A. Zhouravleva, S.A. Bondarev, N.P. Trubitsina // Int. J. Mol. Sci. — 2023. — Vol. 24(14). — P. 11651.

Благодарности

В заключение я хочу принести слова искренней благодарности своему научному руководителю Журавлевой Галине Анатольевне за чуткое руководство, терпение, бесконечные идеи по работе, помощь в планировании и обсуждении полученных результатов. Благодаря Галине Анатольевне я обрела ценный научный и педагогический опыт.

Я благодарна Бондареву Станиславу Александровичу, который был моим научным руководителем в бакалавриате. С ним я освоила основные методики, познакомилась с особенностями работы в научной среде. Для меня он во многом стал примером, на который хотелось равняться, особенно в сложные моменты научного труда. Также хочу поблагодарить Дроздову Полину Борисовну, которая своим примером воспитала во мне серьезное отношение к работе в лаборатории и науке в целом, любознательность и неугасающее желание к саморазвитию.

Благодарю моих коллег, которые внесли большой вклад в работу при выполнении диссертационного исследования, помогали в проведении экспериментов и обсуждении полученных результатов. В первую очередь я благодарю Бондарева Станислава Александровича, Землянку Ольгу Михайловну, Москаленко Светлану Евгеньевну, Матиива Антона Богдановича, Матвеевко Андрея Георгиевича и всех остальных коллег кафедры генетики и биотехнологии СПбГУ.

Отдельно выражаю теплую благодарность Матииву Антону Богдановичу за поддержку и готовность помочь на всех этапах подготовки диссертации.

Хочется поблагодарить сотрудников Научного парка СПбГУ за возможность работать на высокотехнологичном оборудовании, особенно Романович Анну Эдуардовну за проведение секвенирования.

Моим близким и друзьям приношу благодарность за безграничную поддержку, терпение и веру в меня. Не могу представить мой научный путь без моих родителей – Трубициной Елены Дмитриевны и Трубицина Павла Борисовича.