

## ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГЕНОВ *Saccharomyces cerevisiae*, ВЛИЯЮЩИХ НА СИНТЕТИЧЕСКУЮ ЛЕТАЛЬНОСТЬ ПРИОНА [*PSI*<sup>+</sup>] С МУТАЦИЯМИ В ГЕНЕ *SUP45*

© 2013 г. А. Г. Матвеевко, О. М. Землянко, Г. А. Журавлева

Кафедра генетики и биотехнологии Санкт-Петербургского государственного университета,  
Санкт-Петербург, 199034

Поступила в редакцию 22.01.2013 г.

Принята к печати 25.02.2013 г.

Ранее мы разработали тест-систему, позволяющую проводить поиск генов, влияющих на свойства белков Sup35 и Sup45. Эта система основана на использовании феномена летальности диплоидов, совмещающих мутации в гене *SUP45* с прионом [*PSI*<sup>+</sup>]. Летальность такой комбинации зависит как от типа мутации *sup45*, так и от свойств приона. Вариант [*PSI*<sup>+</sup>] – сильный супрессор ([*PSI*<sup>+</sup>)<sup>S</sup>), в гетерозиготном состоянии проявляет синтетическую летальность со всеми нонсенс-мутациями и некоторыми миссенс-мутациями *sup45*. Присутствие дополнительных копий тестируемого гена, влияющего на фенотипическое проявление приона [*PSI*<sup>+</sup>] либо на свойства факторов терминации трансляции, приводит к усилению или ослаблению летальности диплоидов. Скрининг библиотеки генов с использованием данной тест-системы позволил установить влияние на синтетическую летальность 10 фрагментов геномной ДНК дрожжей. Делеционный анализ этих участков привел к идентификации генов *HLJ1* и *TEF2* как генов, влияющих на прионизацию белка Sup35 и/или на эффективность терминации трансляции.

**Ключевые слова:** прионы, [*PSI*<sup>+</sup>], терминация трансляции, eRF1, eRF3, *SUP45*, *SUP35*, синтетическая летальность.

THE IDENTIFICATION OF *Saccharomyces cerevisiae* GENES LEADING TO SYNTHETIC LETHALITY OF PRION [*PSI*<sup>+</sup>] WITH *SUP45* MUTATIONS, by A. G. Matveenko, O. M. Zemlyanko, G. A. Zhouravleva\* (Department of Genetics and Biotechnology, St Petersburg State University, 199034, St Petersburg, Russia; \*e-mail: zhouravleva@rambler.ru). Previously, we proposed a test system allowing to perform search for genes that influence the properties of the Sup35 and Sup45 protein. This test is based on the phenomenon of lethality of diploids that combine mutations in *SUP45* gene with [*PSI*<sup>+</sup>] prion. Lethality of this combination depends on the type of *sup45* mutation, and the properties of the prion. [*PSI*<sup>+</sup>] variant, which is a strong suppressor ([*PSI*<sup>+</sup>)<sup>S</sup>), showing synthetic lethality with all the nonsense mutations and some missense *sup45* mutations in the heterozygote state. The presence of extra copies of a gene under test that affects the phenotypic manifestation of prion [*PSI*<sup>+</sup>] or translation termination factors properties, leads to the increase or decrease in diploid lethality. Gene library screening using this test system allowed us to establish the effect of ten fragments of genomic DNA of yeast on synthetic lethality. Deletion analysis of these regions has led to the identification of the *HLJ1* and *TEF2* genes, as affecting Sup35 protein prionization and/or the efficiency of translation termination.

**Keywords:** translation termination, [*PSI*<sup>+</sup>], prion, eRF1, *SUP45*, *SUP35*.

DOI: 10.7868/S0026898413040113

Белок eRF3 (Sup35) в комплексе с eRF1 (Sup45) необходим для терминации трансляции [1, 2]. Частичная инактивация Sup35, обусловленная его агрегацией в клетках [*PSI*<sup>+</sup>] [3, 4], приводит к нарушению терминации трансляции, что проявляется в доминантной omnipotentной нонсенс-супрессии [5, 6]. Клетки дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* содержат более 10 белков, которые могут прионизоваться [7]. Детерминант [*PSI*<sup>+</sup>] является од-

ним из наиболее изученных прионов дрожжей (см. обзор [8]). Агрегаты Sup35 локализуются в цитоплазме, поэтому [*PSI*<sup>+</sup>] наследуется как нехромосомный генетический детерминант. В одном и том же штамме можно получить варианты [*PSI*<sup>+</sup>], различающиеся по таким свойствам, как эффективность нонсенс-супрессии, стабильность в митозе и мейозе [9]. Все варианты [*PSI*<sup>+</sup>] могут быть элиминированы при росте культуры в присутствии низких концентраций хлорида гуа-

\*Эл. почта: zhouravleva@rambler.ru

нидина [10]. Присутствие приона [*PSI*<sup>+</sup>] приводит к нежизнеспособности штамма, содержащего некоторые мутации *sup45* или *sup35* (см. обзор [11]). Нами показано, что сочетание в диплоидном штамме гетерозиготной мутации в гене *SUP45* и приона [*PSI*<sup>+</sup>] летально для гибрида [12]. Летальность такой комбинации зависит как от типа мутации *sup45*, так и от свойств приона. Сильный супрессор – вариант [*PSI*<sup>+</sup>] (“сильный” [*PSI*<sup>+</sup>], или [*PSI*<sup>+</sup>]<sup>S</sup>), проявляет несовместимость со всеми нонсенс-мутациями и некоторыми миссенс-мутациями *sup45* в гетерозиготном состоянии. Полученные данные свидетельствуют о том, что летальность гибридов связана с уменьшением количества белка Sup45 в клетке с нонсенс-мутациями *sup45* либо со снижением активности Sup45 в клетках с миссенс-мутациями.

Стабильность приона [*PSI*<sup>+</sup>] в ряду клеточных делений и ряд других его свойств зависит от шаперонов семейств Hsp104 [13], Hsp70 [14, 15], Hsp40 [16] и некоторых других белков, в число которых могут входить как белки, чье взаимодействие с Sup35 хорошо известно, так и новые, еще не идентифицированные белки. Показано, что фактор [*PSI*<sup>+</sup>] приводит к гибели гаплоидных штаммов, несущих некоторые мутации *sup35* или *sup45* [17, 18]. Сходный эффект наблюдали при совмещении в гаплоидном штамме мутаций *sup35* и *sup45* [19]. Вследствие этого синтетическая летальность, или несовместимость [*PSI*<sup>+</sup>] и мутаций *sup35* и *sup45*, вероятно, связана с нарушениями терминации трансляции. С учетом этих фактов, ранее мы разработали систему поиска генов дрожжей, способных влиять на прион [*PSI*<sup>+</sup>] или на аппарат трансляции [12, 20]. В настоящей работе идентифицированы гены, влияющие на синтетическую летальность мутаций *sup45* и приона [*PSI*<sup>+</sup>].

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Штаммы.** Для амплификации плазмидной ДНК использовали штамм *Escherichia coli* XL1-Blue (*recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1* [*F'*, *proAB, lacIq, Δ(lacZ)M15, Tn10(tet)*]) [21]. В работе использовали штаммы дрожжей *S. cerevisiae* OT56 и OT55 (*MATα ade1-14 his3Δ200 leu2-3, 112 ura3-52 trp1-289* [*PSI*<sup>+</sup>]), изогенные производные штамма 74-D694 [13]. Штамм OT56 [*PSI*<sup>+</sup>] содержит сильный супрессор – прион [*PSI*<sup>+</sup>]<sup>S</sup>. Прион [*PSI*<sup>+</sup>]<sup>W</sup> штамма OT55 является слабым супрессором. Штамм OT56 [*psi*<sup>-</sup>] получен на основе OT56 [*PSI*<sup>+</sup>] путем элиминации [*PSI*<sup>+</sup>] (см. ниже). Штамм 1A-D1628 (*MATα ade1-14 his3 lys2 trp1-289 ura3-52 leu2-3, 112 SUP45::HIS3* [pRS315/*SUP45*]) содержит делецию гена *SUP45*, компенсируемую плазмидой с геном *SUP45* дикого типа либо с мутантными аллелями *sup45*, описанными ранее

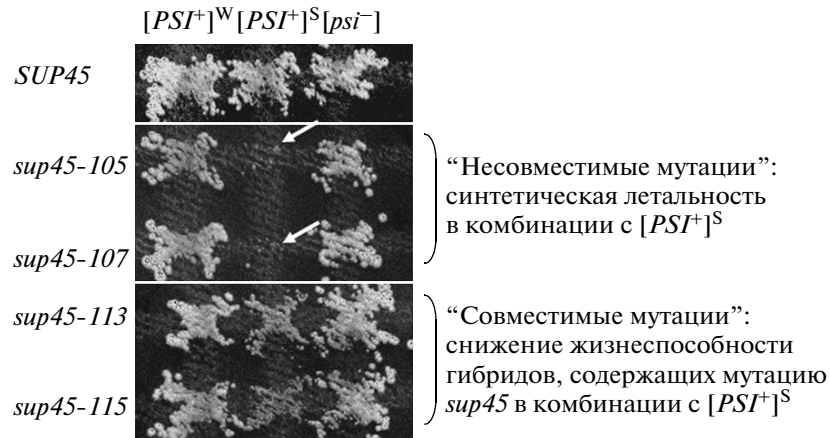
[22, 23]. Варианты штамма 1B-D1606 (*MATα ade1-14 his7-1 leu2-3, 112 ura3-52 trp1-289 lys9-A21*) несут ген *SUP45* дикого типа либо мутации *sup45* на хромосоме [22].

**Плазмиды.** Центромерные плазмиды, содержащие ген *SUP45* дикого типа или один из мутантных аллелей (*sup45-n* или *sup45-m*), были сконструированы ранее [22, 23] на основе плазмид pRS315 и pRS316 [24]. Плаزمида pRS316-P<sub>GPD1</sub> получена на основе плазмиды pGPD-PrP-YFP [25], из которой удалили химерную конструкцию PrP-YFP. Также использовали коммерческий банк генов *S. cerevisiae* на мультикопийном векторе YEp13 (American Type Culture Collection, ATCC № 37323; <http://www.lgcstandards-atcc.org>). Банк состоял из набора плазмид, несущих фрагменты дрожжевой геномной ДНК размером 5–20 т.п.н., полученные при обработке генома рестриктазой Sau3AI и клонированные в вектор YEp13 по сайту рестрикции BamHI. Плазмида YEp13lac181-TEF2 [26] любезно предоставлена лабораторией М.Д. Тер-Аванесяна.

**Среды и условия культивирования.** Использовали стандартные культуральные среды, применяемые при работе с дрожжами: полную среду (YPD), синтетическую среду (SC) и селективные среды, не содержащие отдельных компонентов среды SC, и др. [27]. Бактерии выращивали на полной среде (LB). Устойчивые к ампициллину трансформанты отбирали на среде LB, содержащей ампициллин в концентрации 100 мкг/мл. Штаммы дрожжей выращивали при температуре 26°C, штаммы бактерий – при 37°C. Использовали стандартные методы работы с дрожжами-сахаромицетами [27, 28]. Высокоэффективную трансформацию дрожжей и выделение плазмидной ДНК из дрожжей проводили по методикам, описанным ранее [29, 30]. Для селекции клеток [*psi*<sup>-</sup>] использовали среду YPD с гидрохлоридом гуанидина (“Sigma”) в концентрации 5 мМ.

**Секвенирование.** Концевые участки фрагментов из банка генов дрожжей секвенировали с использованием олигонуклеотидов 175 и 176, соответствующих участкам YEp13, прилегающим к сайту BamHI, по которому клонировали фрагменты хромосом дрожжей (табл. 1). Концевые районы вставок плазмид библиотеки генов секвенировали на коммерческой основе в ООО “Синтол” (г. Москва). Поиск участков генома *S. cerevisiae*, соответствующих данным секвенирования, проводили при помощи online приложения на сайтах <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov> и <http://www.yeastgenome.org/cgi-bin/blast-sgd.pl>, использующего алгоритм BLAST.

Фрагмент плазмиды из банка генов YEp13-1825, содержащий ген *HLJ1* и фланкирующие его районы, амплифицировали с использованием праймеров Hlj1\_out-Sall\_f и Hlj1\_out\_PstI\_r. Ген



**Рис. 1.** Синтетическая летальность мутаций *sup45* и приона  $[PSI^+]$  у диплоидов. Слева указаны номера мутаций (штампы, содержащие мутантные аллели, посеяны в виде горизонтальных штрихов); наверху – варианты приона  $[PSI^+]$  (соответствующие штампы посеяны в виде вертикальных штрихов). В случае синтетической летальности гибриды на перекресте штрихов не образуются (отмечено стрелками). Здесь и далее S – сильный, strong, W – слабый, weak  $[PSI^+]$ .

*MCM1* и его вариант *MCM1Δ5'* с делецией участка размером 330 п.н., кодирующего С-концевой фрагмент Mcm1, амплифицировали с использованием праймеров MCM1-F-BamHI, mcm1MC-F-BamHI и MCM1-R-SacI.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### Поиск новых белков, влияющих на синтетическую летальность приона $[PSI^+]$ и мутаций *sup45*

Ранее мы разработали тест-систему для поиска генов, влияющих на фенотипическое проявление дрожжевого приона  $[PSI^+]$  [12, 20]. Эта тест-система основана на качественной оценке жизнеспособности диплоидного штамма, содержащего одновременно прион  $[PSI^+]$ , мутацию *sup45* в гетерозиготном состоянии и тестируемый ген на многокопийной плазмиде. Синтетическая летальность проявляется как отсутствие роста диплоидных клеток с генотипом *SUP45/sup45*  $[PSI^+]$  (рис. 1). Например, мутации *sup45-105* и *sup45-107* (“несовместимые” мутации на рис. 1) обнаруживают синтетическую летальность с

сильным вариантом приона  $[PSI^+]^S$ , в то время как мутации *sup45-113* и *sup45-115* (“совместимые” мутации на рис. 1) приводят к ослаблению роста гибридов, содержащих  $[PSI^+]^S$ . В ходе скрининга библиотеки генов дрожжей на основе мультикопийного вектора YEр13 проанализировали 16650 конструкций, что позволило идентифицировать гены, как подавляющие рост диплоидов (далее – усиливающие синтетическую летальность), так и способствующие росту гибридов (далее – уменьшающие синтетическую летальность) (табл. 2) [20]. В дальнейшем мы использовали конструкции, которые влияли на синтетическую летальность приона  $[PSI^+]$  и специфических мутаций в гене *SUP45* (далее – тест-система) при первичном скрининге.

Для проведения вторичного скрининга штаммы OT55  $[PSI^+]^W$  и OT56  $[PSI^+]^S$  трансформировали указанными конструкциями. Трансформированные клетки скрещивали с производными штамма 1A-D1628, несущими мутации *sup45* на центромерной плазмиде pRS316. В качестве тестерных использовали мутации *sup45-105*, *sup45-107* (нонсенс-мутации), *sup45-113* и *sup45-115* (сла-

**Таблица 1.** Праймеры, использованные в работе

Название	Нуклеотидная последовательность (5' → 3')	Локализация
175	САСТАТCGACTACGCGATCA	YEр13
176	CGCCAGCAACCGCACCTGT	YEр13
Hlj1_out-SalI_f	AAACGTTCGACCTCGACACTCCTA	<i>HLJ1</i>
Hlj1_out_PstI_r	CACACTGCAGTAAAGACAGTATTGGC	<i>HLJ1</i>
MCM1-F-BamHI	CCACGGATCCAAAATGTCAGACATCGAAGAAGGTA	<i>MCM1</i>
mcm1MC-F-BamHI	GGATCCATAATGACGCAGCAGGAAGGTAGAA	<i>MCM1</i>
MCM1-R-SacI	AATCGGAGCTCTTAGTATTGGCCTTGTTGCGGTT	<i>MCM1</i>

бые миссенс-мутации). В качестве контроля использовали вариант штамма 1A-D1628, несущий аллель *SUP45* дикого типа. Рост гибридов оценивали на среде, не содержащей лейцин, урацил и гистидин.

После повторной проверки отобрали 10 плазмид, из которых одна стабильно снижала синтетическую летальность мутаций *sup45* с прионом [*PSI*<sup>+</sup>]<sup>S</sup> (группа I, табл. 2), а остальные девять — повышали (группа V, табл. 2), после чего секвенировали концевые участки геномных вставок. Фрагменты генома *S. cerevisiae*, соответствующие вставкам на плаزمиде геномной библиотеки, представлены в табл. 3. Конструкции YEp13-4236 и YEp13-4600 содержат по два фрагмента генома,

так как концевые районы, секвенированные с прямого и обратного праймеров, в штамме S288C (геном которого секвенирован полностью) локализируются на разных хромосомах.

**Сверхэкспрессия гена *HLJ1* ингибирует рост гибридов, несущих [*PSI*<sup>+</sup>] в комбинации с мутациями *sup45***

Особое внимание мы обратили на ген *HLJ1*, так как две независимые плазмиды (YEp13-1825 и YEp13-5618) содержали один и тот же участок хромосомы 13, несущий гены *YMR160W* и *HLJ1* (табл. 3). Продукт этого гена, белок Hlj1, является шапероном семейства Hsp40. Известно, что по

**Таблица 2.** Результаты скрининга библиотеки генов

Группа (эффект)	Жизнеспособность диплоидов*					Отобран-ные клоны, число	Изолиро-ванные гены	Ссылка
	<i>SUP45</i>	<i>sup45-105</i> (UAA)	<i>sup45-107</i> (UGA)	<i>sup45-103</i> (L21S) <sup>S</sup>	<i>sup45-115</i> (S70F) <sup>W</sup>			
I (снятие эффекта)	+	+	+	+	+	24	<i>SUP45</i> , <i>RNQ1</i> **, <i>HSP104</i>	[12, 20]
II (изменение эффекта)	+	+	-	-	+	16		
III »	+	-	+	-	+	23		
IV »	+	+	+	-	+	8		
V (усиление эффекта)	+	-	-	-	-	64	<i>CUR1</i>	[20]
VI (нет эффекта)	+	-	-	-	+	16515		
<b>Всего</b>						<b>16650</b>		

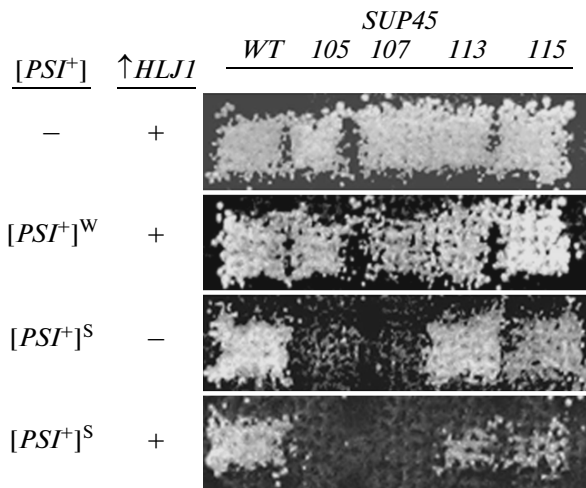
\* Диплоидов получали скрещиванием производных штамма OT56 [*PSI*<sup>+</sup>]<sup>S</sup>, трансформированных плазмидами из библиотеки генов, с указанными мутантами *sup45*. Жизнеспособность диплоидов оценивали на селективной среде SC-Ura-Leu. Группа VI объединяет трансформантов, характер несовместимости которых не изменен по сравнению с исходным штаммом. S — strong suppressor; W — weak suppressor.

\*\* Изолирован фрагмент гена, кодирующий C-концевой участок Rnq1.

**Таблица 3.** Фрагменты генома дрожжей, присутствующие на плазмиде библиотеки генов, и их эффект на синтетическую летальность приона [*PSI*<sup>+</sup>] и мутаций *sup45*

Плаزمид	Ген	Эффект*
YEp13-124	<i>BLM3</i> , <i>SEC4</i> , <i>VTC2</i>	↑
YEp13-184-2	<i>PRP43</i> , <i>COQ8</i> , <i>tW(CCA)G1</i> , <i>YGL117W</i> , <i>CDC20</i>	↓
YEp13-1317	<i>TEF2</i> , <i>MUD1</i> , <i>CBP6</i> , <i>GRS1</i> , <i>MRPL36</i> , <i>TFC1</i>	↑
YEp13-1825	<i>YMR160W</i> , <i>HLJ1</i> , <i>DNF3</i>	↑
YEp13-2084	<i>YET2</i> , <i>ARA2</i> , <i>tF(GAA)M</i> , <i>ARG80</i> , <i>MCM1</i> , <i>SOC4</i>	↑
YEp13-3414	<i>SVF1</i> , <i>MRP1</i> , <i>YDC348C</i>	↑
YEp13-3665	<i>RTS1</i> , <i>ERP4</i> , <i>PET127</i> , <i>ROD1</i>	↑
YEp13-4236	<i>MCA1</i> , <i>BFRI</i> , <i>PET56</i> , <i>HIS3</i> , <i>QCR2</i> , <i>AQY1</i> , <i>HPA2</i> , <i>OPT2</i> , <i>YPR195C</i>	↑
YEp13-4600	<i>RPA12</i> , <i>CCT5</i> , <i>ARP3</i> , <i>TOR1</i> , <i>CDS18</i> , <i>BNI4</i> , <i>CSL4</i> , <i>PDR16</i>	↑
YEp13-5618	<i>YMR155W</i> , <i>TPP1</i> , <i>AIM36</i> , <i>MRPS8</i> , <i>ATG16</i> , <i>YMR160W</i> , <i>HLJ1</i>	↑

\* Стрелками обозначены эффекты проанализированных вставок: вверх — усиление, вниз — ослабление летальности соответственно.



**Рис. 2.** Увеличение экспрессии гена *HLJ1* усиливает синтетическую летальность приона [PSI<sup>+</sup>] и мутаций *sup45*. Скрещивания штамма 1A-D1628 [pRS315/SUP45] и его производных, несущих плазмиды pRS315/*sup45*, с [PSI<sup>+</sup>]- и [psi<sup>-</sup>]-вариантами штаммов OT55 [PSI<sup>+</sup>]<sup>W</sup> и OT56 [PSI<sup>+</sup>]<sup>S</sup> в присутствии дополнительной копии гена *HLJ1* (+) на плазмиде. Номера мутаций указаны сверху.

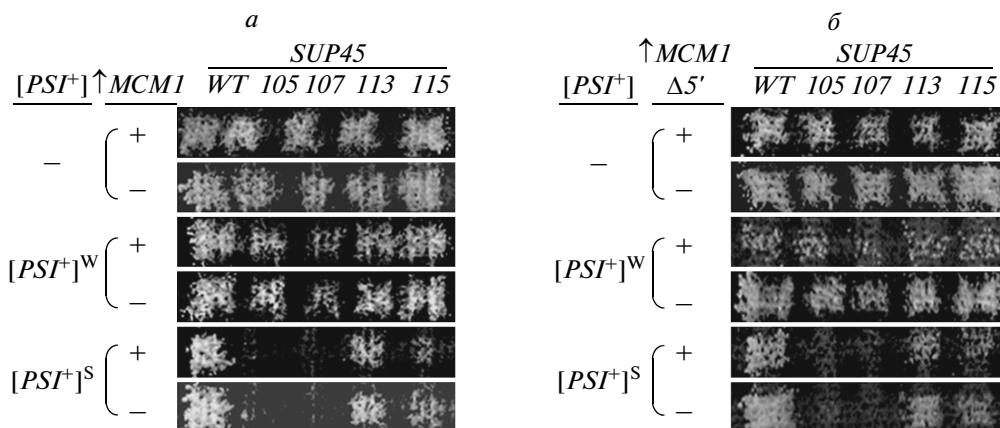
крайней мере два других представителя этого семейства, Ydj1 и Sis1, влияют на прионизацию Sup35. Однако влияние гена *HLJ1* или его продукта на прионы дрожжей (или процесс терминации трансляции) остается неизученным. На первом этапе необходимо было выяснить, связан ли эффект конструкций YEp13-1825 и YEp13-5618 со сверхэкспрессией именно гена *HLJ1*. Ген *HLJ1* с фланкирующими его районами амплифицировали при помощи ПЦР, клонировали в плазмиду pRS425 и проверили в тест-системе. Оказалось, что сверхэкспрессия гена *HLJ1* действительно

приводит к синтетической летальности мутаций *sup45-113* и *sup45-115* с сильным вариантом приона [PSI<sup>+</sup>]<sup>S</sup> (рис. 2).

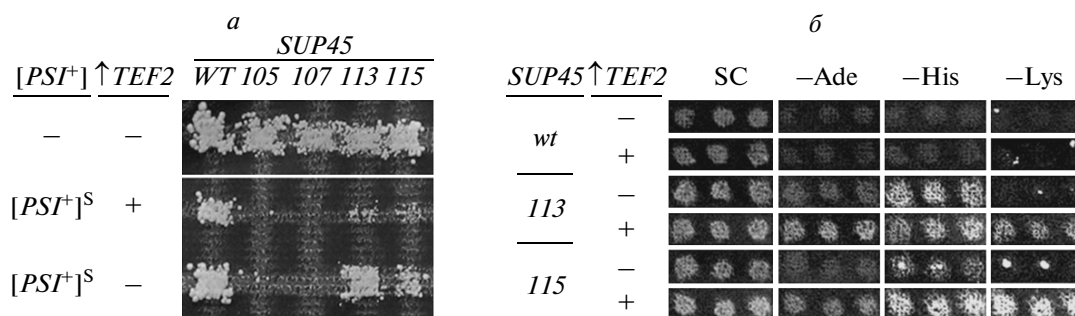
#### Ген *MCM1* не влияет на синтетическую летальность приона [PSI<sup>+</sup>] с мутациями *sup45*

Среди генов, обнаруженных в плазмиде YEp13-2084, наиболее вероятным кандидатом на роль в описываемых эффектах, считается ген *MCM1*. Он кодирует регулятор транскрипции из семейства MADS, который может действовать как активатор или репрессор генов, зависящих от типа спаривания [31]. Белок Mcm1 состоит из 286 аминокислотных остатков, но для выполнения им функции регулятора транскрипции достаточно N-концевого участка (аминокислотные остатки 1–96) [32]. Особый интерес для нас представлял C-концевой район, обогащенный остатками аспарагина и глутамина, что ранее позволило отнести Mcm1 к потенциально прионогенным белкам [33].

С помощью ПЦР были амплифицированы два варианта гена *MCM1*: первый кодирует полноразмерный белок, а второй – укороченный с N-конца фрагмент Mcm1 (аминокислотные остатки 110–286). ПЦР-фрагменты клонировали в плазмиде pRS316, содержащей сильный конститутивный промотор *pGPD1*. Анализ полученных плазмид в тест-системе не выявил их значительного влияния на синтетическую летальность (рис. 3). Результаты скрещивания с участием трансформантов pRS316-P<sub>GPD1</sub>-*MCM1* не отличались от контрольных скрещиваний, в то время как присутствие плазмиды pRS316-P<sub>GPD1</sub>-*MCM1Δ5'* приводило либо к снижению жизнеспособности всех гибридов, либо к снижению у тестируемого штамма способности к скрещиванию. Мы на-



**Рис. 3.** Увеличение экспрессии гена *MCM1* не влияет существенно на синтетическую летальность приона [PSI<sup>+</sup>] и мутаций *sup45*. Скрещивания штамма 1A-D1628 [pRS315/SUP45] и его производных, несущих плазмиды pRS315/*sup45*, с [PSI<sup>+</sup>]- и [psi<sup>-</sup>]-вариантами штаммов OT55 [PSI<sup>+</sup>]<sup>W</sup> и OT56 [PSI<sup>+</sup>]<sup>S</sup> в присутствии дополнительной копии гена *MCM1* (а) или его делеционного варианта *MCM1Δ5'* (б). Номера мутаций указаны сверху.



**Рис. 4.** Увеличение экспрессии гена *TEF2* усиливает синтетическую летальность приона  $[PSI^+]$  и мутаций *sup45*. *a* – Скрещивания штамма 1А-Д1628 [pRS316/SUP45] и его производных, несущих плазмиды pRS316/sup45, со штаммом ОТ56  $[PSI^+]^S$  в присутствии дополнительных копий гена *TEF2* на плазмиде (+). В качестве контроля (–) использовали плазмиду pRS425. Номера мутаций указаны сверху. *b* – Усиление нонсенс-супрессии в производных штамма 1Б-Д1606, несущих мутантные аллели *SUP45*, при сверхэкспрессии гена *TEF2*. Представлены штаммы с геном *SUP45* дикого типа и с мутациями *sup45-113* и *sup45-115*. Показано по три репрезентативных клона в условиях поддержания вектора и их отпечатки на селективные среды.

блюдали угнетение роста всех гибридов, содержащих данную плазмиду. Следует отметить, что этот эффект нельзя объяснить синтетической летальностью приона  $[PSI^+]$  с мутантными аллелями *sup45*, так как ослабление роста гибридов наблюдалось как в присутствии гена *SUP45* дикого типа, так и при скрещивании трансформантов штаммов ОТ56  $[psi^-]$  и ОТ55  $[PSI^+]^W$ .

#### Ген *TEF2* усиливает синтетическую летальность приона $[PSI^+]$ с мутациями *sup45*

Анализ нуклеотидных последовательностей, полученных при секвенировании концевых районов плазмиды YEp13-1317, показал, что эта плаزمида содержит участок хромосомы II с генами *TEF2*, *MUD1*, *CBP6*, *GRS1*, *MRPL36*. Наибольший интерес для нас представляет ген *TEF2*, так как он, как и его паралог *TEF1*, кодирует фактор элонгации трансляции eEF1A. Как показано ранее, *TEF2* влияет на эффективность терминации, что проявляется в том числе как снижение уровня нонсенс-супрессии при инактивации одного из двух генов – *TEF1* и *TEF2* (см. [34]). Мы хотели убедиться, что усиление летальности в присутствии плазмиды YEp13-1317 связано именно с геном *TEF2*. С этой целью мы проанализировали в тест-системе мультикопийный вектор YEp13-1317-*TEF2*, экспрессирующий этот ген. Оказалось, что введение дополнительных копий гена *TEF2* действительно влияет на рост гибридов и усиливает синтетическую летальность  $[PSI^+]$  с мутациями *sup45* (рис. 4а).

Мы предположили, что сверхэкспрессия *TEF2* может приводить к усилению нонсенс-супрессии у штаммов с мутациями *sup45-113* или *sup45-115* как описано ранее [26]. Для проверки данной гипотезы производные штамма 1Б-Д1606, маркированные четырьмя нонсенс-мутациями в генах

биосинтеза разных аминокислот и несущие мутантные аллели *sup45-113* или *sup45-115*, трансформировали вектором YEp13-1317-*TEF2*. В качестве контроля использовали штамм 1Б-Д1606, несущий на хромосоме аллель *SUP45* дикого типа. Проанализировали по 12 трансформантов каждого варианта штамма. Клоны “печатали” на селективные среды без аденина, гистидина, лизина и триптофана для проверки супрессии. Репрезентативные результаты представлены на рис. 4б. Штаммы с мутантными аллелями *sup45* в присутствии *TEF2* росли лучше, чем с контрольным вектором.

#### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В контроле прионизации участвуют по крайней мере два белка семейства Hsp40 – Ydj1 и Sis1. Показано, что эти белки работают в комплексе с шаперонами Hsp70. Все Hsp40 содержат высококонсервативный J-домен, который стимулирует АТФазную активность Hsp70 [35]. Гидролиз АТФ приводит к конформационным изменениям, которые повышают эффективность связывания шаперонов с субстратом, переводя Hsp70 в функциональное состояние [36, 37]. Таким образом, белки Hsp40 могут отвечать за субстратную специфичность Hsp70. Предполагается, что когда Ssa1 в комплексе с Hsp40 выполняет функции дезагрегазы, белки Ydj1 и Sis1 взаимодействуют с агрегатами, в том числе и прионными, и регулируют работу Ssa1. Повышение уровня экспрессии Ydj1 или гомологичного ему Arj1 ослабляет некоторые штаммы  $[PSI^+]$  [16]. Sis1 выполняет роль антагониста Ydj1, его присутствие в клетке необходимо для формирования и поддержания большинства прионов.

Hj1, как и Sis1, принадлежит к классу J-белков типа II, но в отличие от Ydj1 и Sis1 он находится на

мембране эндоплазматического ретикулума (ЭПР) [38]. В нашей работе сверхэкспрессия *HLJ1* привела к усилению синтетической летальности. По-видимому, *Hlj1* влияет на прионизацию, усиливая варианты [*PSI*<sup>+</sup>]. Таким образом, несмотря на структурное сходство с *Ydj1*, эти два кошаперона антагонистически влияют на [*PSI*<sup>+</sup>]. Следовательно, эту способность *Hlj1* можно объяснить его сходством с *Sis1*, который также принадлежит к J-белкам типа II. Скорее всего, *Ssa1* не является партнером *Hlj1*, так как их физическое взаимодействие не показано. Возможно, существует также ассоциированный с ЭПР шаперон *Hsp70*, влияющий на прионные свойства [*PSI*<sup>+</sup>]. Показано также, что *Hlj1* вместе с комплексом *Ssa1-Ydj1* отвечает за ЭПР-ассоциированную деградацию интегральных мембранных белков [39].

Ген *MCM1* относится к жизненно важным генам дрожжей. Он входит в семейство факторов транскрипции с доменом MADS. Основная функция белка *Mcm1* – участие в контроле работы генов, зависящих от типа спаривания, причем функции этого гена различаются в клетках разного типа спаривания (см. [40]). При помощи делеционного анализа показано, что N-домен, содержащий MADS-боксы, необходим и достаточен для выполнения белком *Mcm1* своих функций в контроле клеточного роста и регуляции, связанной с типом спаривания [32, 41]. Функции C-домена пока остаются неясными. Этот домен обогащен остатками аспарагина и глутамина, что характерно для многих прионогенных белков, и свидетельствует в пользу его возможной агрегации. Тем не менее, в нашей работе экспрессия всего гена *MCM1*, как и участка, кодирующего его C-домен, не дала эффекта в тест-системе. Ухудшение роста гибридов при сверхэкспрессии *MCM1Δ5'* можно объяснить токсичностью для клетки. Известно, например, что сверхэкспрессия N-концевого полиглутаминового (polyQ) домена гентингина (*mHtt*) приводит к гибели клеток дрожжей, и на этот процесс прямо влияют шапероны и прион [*PIN*<sup>+</sup>] [42]. Поскольку для C-домена белка *Mcm1* характерно очень высокое (49%) содержание остатков Q и N, не исключено, что наблюдаемое нами снижение жизнеспособности клеток при экспрессии C-домена *Mcm1* связано с токсичностью polyQ.

Как и плазмиды, содержащие ген *HLJ1*, конструкция *YEp13-1317* подавляла рост диплоидов, совмещающих мутации *sup45-113* и *sup45-115* в комбинации с сильным вариантом приона [*PSI*<sup>+</sup>]<sup>S</sup>. Показано, что данный эффект вызывает продукт гена *TEF2*, кодирующего фактор элонгации трансляции eEF1A. Нежизнеспособность гибридов, несущих плазмиду *YEp13-1317*, можно объяснить снижением точности терминации трансляции при избытке этого фактора. Это согласуется с полученными ранее данными, согласно кото-

рым сверхэкспрессия гена *TEF2* повышает вероятность прочтения стоп-кодона как значащего [26]. Однако эта работа выполнена на весьма специфической системе летального взаимодействия мутаций *sup45-sl23ts* и *SUP35-C*. Мы используем сходную систему, но она имеет принципиальные отличия. Во-первых, наша система в качестве фактора, создающего дефицит функциональных молекул *Sup35* и, как следствие, *Sup45*, содержит прион [*PSI*<sup>+</sup>]. Во-вторых, показатели роста и жизнеспособности оцениваются на гибридных клетках, а это означает, что во всех клетках присутствуют гены дикого типа, кодирующие факторы терминации трансляции. В нашей работе также показан эффект усиления супрессии, вызванной мутациями *sup45*, при сверхэкспрессии *TEF2*.

Влияние eEF1A на точность трансляции можно объяснить его участием в механизме “кинетической коррекции”. В процессе образования кодон-антикодоновой пары происходит гидролиз GTP до GDP, что приводит к высвобождению eEF1A из комплекса с aa-tРНК и рибосомой. При образовании “неправильной” кодон-антикодоновой пары энергия гидролиза GTP может тратиться на высвобождение aa-tРНК из A-сайта рибосомы. Необходимость в гидролизе GTP для поддержания точности трансляции подтверждали с помощью анализа мутаций, которые влияют на связывание eEF1A с GTP и на гидролиз GTP. Так аминокислотные замены, локализованные в пределах GTP-связывающей консенсусной последовательности NKXD фактора eEF1A, приводят к перекодировке кодонов в системе *in vitro*, а *in vivo* в 4 раза повышают уровень прочтения всех трех стоп-кодонов как значащих [43].

Эффект улучшения роста гибридов получен только при использовании конструкции *YEp13-184-2* (табл. 3). Однако этот эффект был не настолько сильным, как в случае, например, экспрессии *SUP35-C* [12]. Кроме того, гибриды, полученные при скрещивании *OT56 [PSI*<sup>+</sup>]<sup>S</sup> со штаммом *1A-D1628*, несущим мутацию *sup45-107*, растут лучше, чем гибриды, полученные в аналогичном скрещивании с мутацией *sup45-105*. Подобная избирательность в изменении нонсенс-супрессорных свойств может говорить о роли гена tРНК. Как известно, присутствие дополнительных молекул некоторых естественных tРНК может приводить к аллель-специфичному прочтению нонсенс-кодонов [44]. Действительно, оказалось, что данный фрагмент содержит триптофановую tРНК *tW-G1* с антикодоном CCA. Нонсенс-мутации *sup45-105* и *sup45-107* различаются по своей природе: в случае *sup45-105* кодон, соответствующий глутаминовой кислоте, заменен на стоп-кодон UAA, а в *sup45-107* лейциновый кодон заменен стоп-кодоном UGA. Таким образом, разный уровень супрессии этих двух мутаций

можно объяснить тем, что два первых основания нонсенс-кодона UGA комплементарны двум основаниям антикодона в тРНК. В UAA есть только одно основание, комплементарное CCA, поэтому данная тРНК при ее избытке с большей вероятностью сможет связаться не с UAA (*sup45-105*), а с UGA (*sup45-107*) в тот момент, когда рибосома подойдет к соответствующему нонсенс-триплету на мРНК *SUP45*. Сходные результаты получили ранее при изучении влияния супрессорной тРНК *SUQ5* в используемой нами тест-системе [12]. В этом случае мутантная сериновая тРНК *SUQ5* – супрессор нонсенс-кодона UAA, была способна восстанавливать жизнеспособность штаммов, несущих фактор [*PSI<sup>+</sup>*] в комбинации с нонсенс-мутацией *sup45-105* (UAA), но не с *sup45-107* (UGA).

Авторы благодарят М.Д. Тер-Аванесяна, Д.А. Киктева и С.Е. Москаленко за предоставленные плазмиды и штаммы дрожжей.

Работа получила финансовую поддержку Российского фонда фундаментальных исследований (10-04-00237) и программы Президиума Российской академии наук “Происхождение и эволюция гео-биологических систем”.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Zhouravleva G., Frolova L., Le Goff X., Le Guellec R., Inge-Vechtomo S., Kisselev L., Philippe M. 1995. Termination of translation in eukaryotes is governed by two interacting polypeptide chain release factors, eRF1 and eRF3. *EMBO J.* **14**, 4065–4072.
- Stansfield I., Jones K.M., Kushnirov V.V., Dagkesamanskaya A.R., Poznyakovski A.I., Paushkin S.V., Nierres C.B., Cox B.S., Ter-Avanesyan M.D., Tuite M.F. 1995. The products of the *SUP45* (eRF1) and *SUP35* genes interact to mediate translation termination in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* **14**, 4365–4373.
- Patino M.M., Liu J.J., Glover J.R., Lindquist S. 1996. Support for the prion hypothesis for inheritance of a phenotypic trait in yeast. *Science*. **273**, 622–626.
- Paushkin S.V., Kushnirov V.V., Smirnov V.N., Ter-Avanesyan M.D. 1996. Propagation of the yeast prion-like [*psi<sup>+</sup>*] determinant is mediated by oligomerization of the *SUP35*-encoded polypeptide chain release factor. *EMBO J.* **15**, 3127–3134.
- Cox B.S. 1965. *PSI<sup>+</sup>*, a cytoplasmic suppressor of supersuppressor in yeast. *Heredity*. **20**, 505–521.
- Liebman S.W., Sherman F. 1979. Extrachromosomal *psi<sup>+</sup>* determinant suppresses nonsense mutations in yeast. *J. Bacteriol.* **139**, 1068–1071.
- Alberti S., Halfmann R., King O., Kapila A., Lindquist S. 2009. A systematic survey identifies prions and illuminates sequence features of prionogenic proteins. *Cell*. **137**, 146–158.
- Tuite M.F., Cox B.S. 2007. The genetic control of the formation and propagation of the [*PSI<sup>+</sup>*] prion of yeast. *Prion*. **1**, 101–109.
- Derkatch I.L., Chernoff Y.O., Kushnirov V.V., Inge-Vechtomo S.G., Liebman S.W. 1996. Genesis and variability of [*PSI*] prion factors in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. **144**, 1375–1386.
- Tuite M.F., Mundy C.R., Cox B.S. 1981. Agents that cause a high frequency of genetic change from [*psi<sup>+</sup>*] to [*psi<sup>-</sup>*] in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. **98**, 691–711.
- Cox B.S., Tuite M.F., McLaughlin C.S. 1988. The *psi* factor of yeast: a problem in inheritance. *Yeast*. **4**, 59–178.
- Kiktev D., Inge-Vechtomo S.G., Zhouravleva G. 2007. Prion-dependent lethality of *sup45* mutants in *Saccharomyces cerevisiae*. *Prion*. **1**, 136–143.
- Chernoff Y.O., Lindquist S.L., Ono B., Inge-Vechtomo S.G., Liebman S.W. 1995. Role of the chaperone protein Hsp104 in propagation of the yeast prion-like factor [*psi<sup>+</sup>*]. *Science*. **268**, 880–884.
- Chernoff Y.O., Newnam G.P., Kumar J., Allen K., Zink A.D. 1999. Evidence for a protein mutator in yeast: role of the Hsp70-related chaperone *ssb* in formation, stability, and toxicity of the [*PSI*] prion. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 8103–8112.
- Newnam G.P., Wegrzyn R.D., Lindquist S.L., Chernoff Y.O. 1999. Antagonistic interactions between yeast chaperones Hsp104 and Hsp70 in prion curing. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 1325–1333.
- Kryndushkin D.S., Smirnov V.N., Ter-Avanesyan M.D., Kushnirov V.V. 2002. Increased expression of Hsp40 chaperones, transcriptional factors and ribosomal protein Rpp0 can cure yeast prions. *J. Biol. Chem.* **277**, 23702–23708.
- Liebman S.W., All-Robyn J.A. 1984. A non-mendelian factor, [*eta<sup>+</sup>*], causes lethality of yeast omnipotent-suppressor strains. *Curr. Genet.* **8**, 567–573.
- All-Robyn J.A., Kelley-Geraghty D., Griffin E., Brown N., Liebman S.W. 1990. Isolation of omnipotent suppressors in an [*eta<sup>+</sup>*] yeast strain. *Genetics*. **124**, 505–514.
- Тиходеев О.Н., Гетманова Е.В., Тихомирова В.Л., Инге-Вечтомо С.Г. 1990. Неоднозначность трансляции у дрожжей: генетический контроль и модификации. В кн.: *Молекулярные механизмы генетических процессов*. М.: Наука, 218–228.
- Киктев Д.А., Чернов Ю.О., Архипенко А.В., Журавлева Г.А. 2011. Идентификация генов, влияющих на синтетическую летальность генетического и эпигенетического изменений в факторах термации трансляции у дрожжей. *Докл. Акад. Наук*. **438**, 416–418.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. 1989. *Molecular cloning a laboratory manual*. N.Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press.
- Moskalenko S.E., Chabelskaya S.V., Inge-Vechtomo S.G., Philippe M., Zhouravleva G.A. 2003. Viable nonsense mutants for the essential gene *SUP45* of *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Mol. Biol.* **4**, 2.
- Москаленко С.Е., Журавлева Г.А., Соом М.И., Шабельская С.В., Волков К.В., Земляно О.М., Филипп М., Миронова Л.Н., Инге-Вечтомо С.Г. 2004. Характеристика миссенс-мутаций в гене *SUP45* дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, кодирующем фактор термации трансляции eRF1. *Генетика*. **40**, 599–606.



24. Sikorski R.S., Hieter P. 1989. A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. **122**, 19–27.
25. Рубель А.А., Коржова В.В., Сайфитдинова А.Ф., Антонен К.С., Инге-Вечтомов С.Г., Галкин А.П. 2012. Белок PrP и амилоид бета взаимодействуют в дрожжах *Saccharomyces cerevisiae*. *Экологическая генетика*. **10**, 74–80.
26. Valouev I.A., Fominov G.V., Sokolova E.E., Smirnov V.N., Ter-Avanesyan M.D. 2009. Elongation factor eEF1B modulates functions of the release factors eRF1 and eRF3 and the efficiency of translation termination in yeast. *BMC Mol. Biol.* **10**, 60.
27. Guthrie C., Fink G.R. 1991. Guide to yeast genetics and molecular biology. San Diego: Acad. Press.
28. Rose M.D., Winston F.M., Hieter P., Sherman F. 1990. Methods in yeast genetics a laboratory course manual. N.Y: Cold Spring Harbor Lab. Press.
29. Kaiser C., Michaelis S., Mitchell A. 1994. Methods in yeast genetics. N.Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press.
30. Gietz R.D., Schiestl R.H., Willems A.R., Woods R.A. 1995. Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. *Yeast*. **11**, 355–360.
31. Elble R., Tye B.K. 1991. Both activation and repression of a-mating-type-specific genes in yeast require transcription factor Mcm1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **88**, 10966–10970.
32. Bruhn L., Hwang-Shum J.J., Sprague G.F., Jr. 1992. The N-terminal 96 residues of *MCM1*, a regulator of cell type-specific genes in *Saccharomyces cerevisiae*, are sufficient for DNA binding, transcription activation, and interaction with alpha 1. *Mol. Cell. Biol.* **12**, 3563–3572.
33. Michelitsch M.D., Weissman J.S. 2000. A census of glutamine/asparagine-rich regions: implications for their conserved function and the prediction of novel prions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **97**, 11910–11915.
34. Valente L., Kinzy T.G. 2003. Yeast as a sensor of factors affecting the accuracy of protein synthesis. *Cell. Mol. Life Sci.* **60**, 2115–2130.
35. Szabo A., Langer T., Schroder H., Flanagan J., Bukau B., Hartl F.U. 1994. The ATP hydrolysis-dependent reaction cycle of the *Escherichia coli* Hsp70 system DnaK, DnaJ, and GrpE. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **91**, 10345–10349.
36. Cyr D.M., Lu X., Douglas M.G. 1992. Regulation of Hsp70 function by an eukaryotic DnaJ homolog. *J. Biol. Chem.* **267**, 20927–20931.
37. Langer T., Lu C., Echols H., Flanagan J., Hayer M.K., Hartl F.U. 1992. Successive action of DnaK, DnaJ and GroEL along the pathway of chaperone-mediated protein folding. *Nature*. **356**, 683–689.
38. Qiu X.B., Shao Y.M., Miao S., Wang L. 2006. The diversity of the DnaJ/Hsp40 family, the crucial partners for Hsp70 chaperones. *Cell. Mol. Life Sci.* **63**, 2560–2570.
39. Huyer G., Piluek W.F., Fansler Z., Kreft S.G., Hochstrasser M., Brodsky J.L., Michaelis S. 2004. Distinct machinery is required in *Saccharomyces cerevisiae* for the endoplasmic reticulum-associated degradation of a multispanning membrane protein and a soluble luminal protein. *J. Biol. Chem.* **279**, 38369–38378.
40. Mead J., Bruning A.R., Gill M.K., Steiner A.M., Acton T.B., Vershon A.K. 2002. Interactions of the Mcm1 MADS box protein with cofactors that regulate mating in yeast. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 4607–4621.
41. Christ C., Tye B.K. 1991. Functional domains of the yeast transcription/replication factor *MCM1*. *Genes Dev.* **5**, 751–763.
42. Meriin A.B., Zhang X., He X., Newnam G.P., Chernoff Y.O., Sherman M.Y. 2002. Huntington toxicity in yeast model depends on polyglutamine aggregation mediated by a prion-like protein Rnq1. *J. Cell Biol.* **157**, 997–1004.
43. Carr-Schmid A., Valente L., Loik V.I., Williams T., Starita L.M., Kinzy T.G. 1999. Mutations in elongation factor 1beta, a guanine nucleotide exchange factor, enhance translational fidelity. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 5257–5266.
44. Beier H., Grimm M. 2001. Misreading of termination codons in eukaryotes by natural nonsense suppressor tRNAs. *Nucl. Acids Res.* **29**, 4767–4782.