

© Ю. В. Андрейчук¹,
А. А. Ширяева¹, А. С. Жук^{1,2},
Е. И. Степченкова^{2,1},
С. Г. Инге-Вечтомов^{2,1}

¹ФГБУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный университет»;

²Санкт-Петербургский филиал Института общей генетики им. Н. И. Вавилова РАН

Причиной таких заболеваний человека, как болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, болезнь Хантингтона и болезнь Луи-Герига, характеризующихся специфическими нейродегенеративными симптомами, является переход белков в амилоидную форму в нервных тканях. У пациентов, страдающих болезнью Альцгеймера, увеличена частота нервных клеток с аномальным числом хромосом, однако прямое влияние прионов на стабильность генома не исследовано в достаточной мере. В нашей работе мы изучили влияние приона [PSI+] на стабильность генома у дрожжей *S. cerevisiae* в системе альфа-тест. Мы показали, что прион [PSI+] снижает частоту «незаконной» гибридизации как в скрещиваниях $a \times a$, так и в скрещиваниях $a \times \alpha$, и приводит к снижению частот потерь хромосом и генных мутаций.

✿ **Ключевые слова:** прионы; мутационный процесс; стабильность генома; мутационные тест-системы.

ВЛИЯНИЕ ПРИОНИЗАЦИИ БЕЛКА SUP35 [PSI+] НА ЧАСТОТУ ГЕНЕТИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ, УЧИТЫВАЕМЫХ В АЛЬФА-ТЕСТЕ У ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

ВВЕДЕНИЕ

Прионы — амилоидные агрегаты белков с измененной третичной структурой, обладающие инфекционными свойствами и способные индуцировать переход других молекул белка из нативной в прионную форму. Амилоидизация белков у млекопитающих приводит к развитию ряда заболеваний, характеризующихся нейродегенеративными симптомами, таких как болезнь Альцгеймера, болезнь куру, болезнь Кройцфельда—Якоба, губчатые энцефалопатии мозга и другие. Моделью для изучения прионов млекопитающих служит дрожжевой фактор [PSI+] — прионизованная форма фактора терминации трансляции Sup35. В клетках [PSI+] дрожжей *S. cerevisiae* большинство молекул Sup35 образует агрегаты и теряет свою функциональность. Прионизация белка Sup35 приводит к тому, что в клетках [PSI+] происходит нарушение терминации трансляции, поскольку на фоне отсутствия функционального Sup35 рибосомы прочитывают нонсенс-кодона в мРНК как значащие. Прионизация Sup35 может быть выявлена по супрессии нонсенс-мутаций в различных генах.

У пациентов, страдающих болезнью Альцгеймера, выявлено 10-кратное увеличение частоты нерасхождения 21 хромосомы (происходит как гаплоидизация, так и гиперплоидия) (Yourov et al., 2009). Обнаружена способность прионной формы белка PrP млекопитающих связываться с микротрубочками цитоскелета. Такое связывание приона препятствует полимеризации тубулина (Niezanski et al., 2006), что, возможно, приводит к нарушению расхождения хромосом в митозе. У дрожжей *S. cerevisiae* с мутацией в генах *SUP45* и *SUP35* повышена частота потерь третьей хромосомы, такой фенотип коррелирует с чувствительностью к беномилу, который блокирует расхождение хромосом в анафазе (Borchsenius et al., 2000).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для изучения влияния приона [PSI+] на стабильность генетического материала мы использовали разработанную нами ранее тест-систему альфа-тест. Альфа-тест — удобная тест-система, позволяющая одновременно учитывать изменение частот разных типов генетических повреждений. В альфа-тесте могут быть учтены следующие генетические события: потери хромосом, генные мутации, конверсия гена, потеря плеча хромосомы и рекомбинация. Альфа-тест основан на использовании механизма переключения типа спаривания у гетероталлических штаммов дрожжей *S. cerevisiae* (Inge-Vechtsov et al., 1986). Тип спаривания у дрожжей регулирует локус *MAT*, расположенный в III хромосоме. Локус *MAT* представлен двумя идиоморфами — *MATa* и *MATalpha*, определяющими a - и альфа-типы спаривания соответственно. В норме спариваться могут только клетки противоположных типов спаривания, поэтому в «незаконных» скрещиваниях ($a \times a$) при смешивании двух штаммов одинакового типа спаривания (a) возникающие гибриды появляются в результате слияния родительских клеток, одна из которых перед гибридизацией переключила тип спаривания на противоположный ($a \rightarrow a$). Такое переключение типа спаривания воз-

Поступила в редакцию 19.04.2015
Принята к публикации 07.12.2015

можно в результате генетических изменений, нарушающих экспрессию идиоморфа *MATalpha*, которые могут быть учтены в альфа-тесте. Использование специально сконструированных штаммов позволяет определить генетическую активность различных факторов, общий уровень стабильности генома, а также выявить молекулярную природу генетических изменений, вызванных разными мутагенами.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Мы показали, что у штаммов, несущих прионную форму белка Sup35, происходит снижение частоты «незаконной» гибридизации в скрещиваниях $\alpha \times \alpha$ и $\alpha \times a$ в 2 раза, тогда как в скрещиваниях $\alpha \times a$ прионизация Sup35 не влияет на частоту гибридизации.

Мы также сравнили спектр генетических повреждений, возникающих на фоне прионизации Sup35 по сравнению со спектром в контрольном штамме [*psi*-]. У штамма [*PSI*+] частоты потерь хромосом и генных мутаций снижены в 2 раза и в 5 раз увеличена частота конверсии. Результаты, полученные в альфа-тесте, согласуются с результатами теста на индукцию прямых мутаций устойчивости к канаванину, в котором мы также наблюдали снижение частоты мутагенеза в 2 раза (табл. 1).

ОБСУЖДЕНИЕ

Мы исследовали влияние приона [*PSI*+] на стабильность генома с использованием альфа-теста и тес-

та на индукцию прямых мутаций устойчивости к канаванину. Мы впервые показали, что наличие приона [*PSI*+] приводит к снижению частоты генных мутаций и потерь хромосом, а также увеличению частоты генной конверсии. Механизм влияния приона на стабильность генома остается неизвестным. Мы предполагаем, что возможный механизм снижения частоты генных мутаций в штамме [*PSI*+] заключается в следующем: поскольку Sup35 в прионизированной форме теряет функциональные свойства, спонтанные нонсенс-мутации начинают прочитываться как значащие, поэтому в использованных нами тестах на мутагенность не проявляются. Известно, что Sup35 участвует в сегрегации хромосом в мейозе, возможно, с этой функцией белка связано влияние фактора [*PSI*+] на частоту потерь хромосом, снижение которой мы обнаружили в альфа-тесте у штамма [*PSI*+]. Возможно также, что влияние фактора [*PSI*+] на стабильность генома может быть косвенным и опосредовано изменением всего протеома, в том числе белков репарации. Так, нарушение терминации трансляции может приводить к удлинению пептидов за счет трансляции кодонов, расположенных в мРНК после стоп-кодона. Очевидно, такое изменение протеома не может не отразиться на функции целого ряда белков, контролирующих процессы мутагенеза или репарации ДНК. Роль прионов в поддержании стабильности генома требует дальнейшего изучения.

Работа поддержана грантом РФФИ № 15-04-08625 и грантом СПбГУ № 1.38.426.2015.

Таблица 1

Частота классов «незаконных» гибридов в скрещиваниях $\alpha \times \alpha$ и частота мутаций в тесте на индукцию прямых мутаций устойчивости к канаванину ($\times 10^{-8}$). Представлены медианы и доверительные интервалы

Учитываемые события	Штамм	
	[<i>psi</i> -]	[<i>PSI</i> +]
Общая частота «незаконной» гибридизации	61 (57,6–72)	30,6* (26,3–35,9)
Мутации и временные повреждения	4,0 (3,4–4,7)	2,08* (2,0–2,4)
Конверсия кассеты <i>HMRa</i> в локус <i>MAT</i>	0,17 (0,14–0,2)	0,98* (0,92–1,1)
Потеря правого плеча III хромосомы	7,15 (6,1–8,3)	7,21 (6,8–8,5)
Рекомбинация между кассетой <i>HMRa</i> и локусом <i>MAT</i>	0,29 (0,24–0,34)	0,24 (0,22–0,28)
Потеря III хромосомы	49,95 (42,0–58,0)	20,09* (19,0–24,0)
Частота возникновения мутантов, устойчивых к канаванину	147 (114–250)	63* (24–114)

* — достоверное отличие от штамма [*psi*-], ($p < 0,05$)

ЛИТЕРАТУРА

1. Borchsenius A. S., Tchourikova A. A., Inge-Vecht-
tomov S. G. (2000) Recessive mutations in SUP35 and
SUP45 genes coding for translation release factors af-
fect chromosome stability in *Saccharomyces cerevisiae*.
Curr. Genet. V. 37: P. 285–291.
2. Inge-Vecht-
tomov S. G., Repnevskaja M. V., Karpova T. S.
(1986) Hybridization of cells of the same mating type in
Saccharomyces yeasts. *Genetika.* V. 22: P. 2625–2626.
3. Iourov I. Y., Vorsanova S. G., Liehr T., Yurov Y. B.
(2009) Aneuploidy in the normal, Alzheimer's disease
and ataxia-telangiectasia brain: Differential expression and
pathological meaning. *Neurobiology of disease.* V. 34:
P. 212–220.
4. Nieznanski K., Podlubnaya Z. A., Nieznanski H.
(2006) Prion protein inhibits microtubule assembly
by inducing tubulin oligomerization. *Biochemical and
Biophysical Res. Com.* V. 349: P. 391–399.

**SUP35 PRIONIZATION [PSI+] INFLUENCE THE
FREQUENCY OF THE GENE AND CHROMOSOME
MUTATIONS, ACCOUNTED IN THE ALPHA-TEST IN
YEAST SACCHAROMYCES CEREVISIAE**

*Andreychuk Yu. V., Shiryayeva A. A., Zhuk A. S.,
Stepchenkova E. I., Inge-Vecht-
tomov S. G.*

✿ **SUMMARY:** *Background.* A lot of neurodegenerative diseases are
caused by amyloidization of proteins in nerve tissues. In the patients
brains suffered from Alzheimer's disease the high fraction of the nerve

cells with abnormal chromosome amount was revealed. There are some
data showing that prion form of protein PrP may prevent chromosome
segregation in mitosis. But the direct association of prionisation and ge-
nome stability was not revealed. *Materials and methods.* We compared
the yeast *S. cerevisiae* strain bearing the prion form of the termination
translation factor Sup35, and the strain with non-prionized Sup35 in the
alpha-test system. The model of the alpha-test is based on the mecha-
nism of mating type switching in heterothallic yeast strains. The MAT
locus that controls the mating type of yeast cell can be presented by two
idiomorphs: the *MATalpha* and *MATa* that determine the alpha and a cell
types, correspondingly. Only two cells with opposite mating types (al-
pha × a) could copulate. In the mixture of two yeast strains with alpha
mating type the hybrids appear only if one of the parent cells had changed
its mating type alpha → a. The mating type switching could course the
following genetic events: the loss of the chromosome, gene conversion,
recombination, loss of the arm of the chromosome, gene mutations and
temporary lesions. These events could be distinguished by using the
specially constructed alpha-test system. *Results.* The [PSI+] strain has
showed 2-times decreased frequency of «illegitimate» hybridization in
the alpha-test compared to [psi-] strain. But [PSI+] doesn't influence
the frequency of «legitimate» hybridization in the alpha × a crossing.
The prion [PSI+] also 2-times reduces the frequency of chromosome loss
and gene mutations and increases gene conversion 5-times. This results
are also confirmed by the canavanine test. *Conclusion.* We investigated
the effect of the Sup35 prionization on the genome stability. Unexpectedly
in the [PSI+] strain the frequency of «illegitimate» hybridization was
2-times lower, and frequency of gene mutations and chromosome loss
was also reduced. The mechanism of this effect is unclear and requires
the further investigation.

✿ **KEYWORDS:** prion; mutagenesis; genome stability; mutational test-
systems.

✿ Информация об авторах

Андрейчук Юлия Вячеславовна — младший научный сотрудник, Ин-
ститут трансляционной биомедицины. ФГБОУ ВПО «Санкт-Петер-
бургский государственный университет». 199034, Санкт-Петербург,
Университетская наб., д. 7/9. E-mail: Yullinnabk@yandex.ru.

Жук Анна Сергеевна — младший научный сотрудник, кафедра генети-
ки и биотехнологии, биологический факультет. ФГБОУ ВПО «Санкт-
Петербургский государственный университет». 199034, Санкт-Петер-
бург, Университетская наб., д. 7/9. E-mail: ania.zhuk@gmail.com.

Инге-Вечтомов Сергей Георгиевич — заведующий кафедрой генети-
ки и биотехнологии, биологический факультет. ФГБОУ ВПО «Санкт-
Петербургский государственный университет». 199034, Санкт-Петер-
бург, Университетская наб., д. 7/9. E-mail: ingevechtomov@gmail.com.

Степchenkova Елена Игоревна — заведующая лабораторией, лабо-
ратория мутагенеза и генетической токсикологии. Санкт-Петер-
бургский филиал Учреждения Российской академии наук Института
общей генетики им. Н. И. Вавилова РАН. 199034, Санкт-Петербург,
Университетская наб., д. 7/9. E-mail: stepchenkova@gmail.com.

Ширяева Анна Александровна — инженер-исследователь, кафедра ге-
нетики и биотехнологии, биологический факультет. ФГБОУ ВПО «Санкт-
Петербургский государственный университет». 199034, Санкт-Петер-
бург, Университетская наб., д. 7/9. E-mail: annabiologic@gmail.com.

Andreychuk Yulia Viacheslavovna — Junior research fellow,
Institute of translational biomedicine. Saint Petersburg State University.
199034, Saint Petersburg, Universitetskaya nab., 7/9, Russia.
E-mail: Yullinnabk@yandex.ru.

Zhuk Anna Sergeevna — Junior research fellow, Department of
genetics and biotechnology. Saint Petersburg State University. 199034,
Saint Petersburg, Universitetskaya nab., 7/9, Russia.
E-mail: ania.zhuk@gmail.com.

**Inge-Vecht-
tomov Sergey Georgievich** — Head of the department
of genetics and biotechnology. Saint Petersburg State University.
199034, Saint Petersburg, Universitetskaya nab., 7/9, Russia.
E-mail: ingevechtomov@gmail.com.

Stepchenkova Elena Igorevna — Head of the Laboratory, Laboratory
of mutagenesis and genotoxicology. St Petersburg Branch Russian
Academy of Sciences, Vavilov Institute of General Genetics. 199034,
Saint Petersburg, Universitetskaya nab., 7/9, Russia.
E-mail: stepchenkova@gmail.com.

Shiryayeva Anna Alexandrovna — Junior research fellow, Department
of genetics and biotechnology. Saint Petersburg State University.
199034, Saint Petersburg, Universitetskaya nab., 7/9, Russia.
E-mail: annabiologic@gmail.com.