



СТАРЕНИЕ И ДОЛГОЛЕТИЕ, БОЛЕЗНИ ЗРЕЛОГО ВОЗРАСТА

О.Е. Цапоница,
А.Г. Лада, А.А. Рубель,
В.В. Наволоцкая, И.Т. Петрова,
С.Г. Инге-Вечтомов,
А.П. Галкин

АНАЛИЗ ЭФФЕКТОВ ПРОДУКЦИИ ГИБРИДНОГО БЕЛКА A_{β} -Sup35MC В ДРОЖЖАХ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Биологический НИИ Санкт-Петербургского государственного университета, отдел генетики, лаборатория генетики животных;
Санкт-Петербургский государственный университет, кафедра генетики и селекции, Санкт-Петербург

✿ A_{β} -пептид является основным компонентом амилоидных бляшек, вызывающих нейротоксический эффект при болезни Альцгеймера. Мы сконструировали дрожжевой штамм, содержащий плазмиду с гибридным геном A_{β} -SUP35MC на фоне делеции хромосомной копии гена SUP35. Полученные данные свидетельствуют о том, что гибридный белок A_{β} -Sup35MC является дрожжевым прионом.

✿ **Ключевые слова:** болезнь Альцгеймера; пептид A_{β} ; SUP35; дрожжи; тест-система; нонсенс-супрессия; прионы; терминация трансляции.

ВВЕДЕНИЕ

В связи с увеличением средней продолжительности жизни человека, исследования болезней зрелого возраста стали одним из приоритетных направлений современной биомедицины. Целый ряд возрастных нейродегенеративных заболеваний связан с формированием в тканях головного мозга высокомолекулярных белковых тяжей. Наибольший практический интерес представляет болезнь Альцгеймера (одна из широко распространенных форм старческого маразма). У людей среднего возраста это заболевание встречается достаточно редко, однако после 85 лет болезнь Альцгеймера настигает каждого третьего [20]. По оценкам специалистов в настоящее время в мире насчитывается более 12 миллионов людей, страдающих этим неизлечимым недугом [5] и с увеличением средней продолжительности жизни их число будет возрастать. По прогнозам нобелевского лауреата Стенли Прусинера к 2050-му году только в США число больных этой формой старческого маразма составит 20 миллионов [20]. Наряду со спонтанными формами заболевания описаны мутации, вызывающие наследственную предрасположенность к возникновению болезни Альцгеймера у относительно молодых людей. Есть основания полагать, что развитию этого нейродегенеративного заболевания может способствовать ушиб головного мозга [17].

Болезнь Альцгеймера связана с накоплением в тканях центральной нервной системы так называемых амилоидных бляшек, основным компонентом которых является амилоидный β -пептид (далее A_{β}). A_{β} -пептид состоит из 40 или 42-х аминокислот и представляет собой продукт одного из двух путей протеолиза белка APP (*Amyloid Precursor Protein*) [29]. Некоторые авторы связывают формирование амилоидных бляшек с увеличением количества мономеров A_{β} -пептида, которое наблюдается при нарушении процессинга APP [4, 23, 24]. В олигомерной изоформе A_{β} -пептид представлен в виде β -слоев и вызывает нейротоксический эффект [19].

Поиск факторов, контролирующих агрегацию A_{β} , проводится в экспериментах на млекопитающих, в культуре клеток или в системе *in*

in vitro. Совершенно очевидно, что эти подходы не позволяют осуществлять масштабный скрининг агентов, блокирующих формирование амилоидных тяжей. Сравнительно недавно было показано, что A_{β} -пептид человека способен образовывать агрегаты в дрожжевой клетке [12]. Дрожжи являются удобным модельным объектом для анализа факторов, контролирующих процесс амилоидогенеза. К сожалению, агрегация A_{β} в дрожжах не имеет фенотипического проявления, а проводить масштабный скрининг агентов, блокирующих амилоидогенез, опираясь лишь на биохимические критерии, практически невозможно.

Мы разрабатываем тест-систему, в которой агрегация A_{β} -пептида человека должна иметь фенотипическое проявление по критерию «рост—отсутствие роста дрожжей на селективной среде». С этой целью мы модифицировали хорошо известную систему для анализа прионоподобной агрегации дрожжевого белка Sup35, играющего роль вспомогательного фактора терминации трансляции [30]. Белок Sup35 имеет 3 домена — N, M и C [25]. Домен C выполняет функцию фактора терминации трансляции. Он может работать и в отсутствие доменов N и M [25, 11]. Домен M, по всей вероятности, является своеобразным шарниром и обеспечивает независимую укладку N и C доменов. Кроме того, с последовательностью домена M связывается дрожжевой шаперон Hsp104 [14], контролирующий воспроизведение прионной изоформы Sup35^r [7]. Домен N отвечает за прионоподобную агрегацию Sup35^r [25]. В прионной олигомерной изоформе [*PSI*⁺] белок Sup35 частично инактивирован, что приводит к повышению вероятности считывания стоп-кодонов и, как следствие, проявлению нонсенс-супрессорного фенотипа.

Для анализа эффектов конформационных переключений пептида A_{β} мы решили сконструировать дрожжевой штамм, содержащий плазмиду с гибридным геном A_{β} -*SUP35MC* на фоне делеции хромосомной копии *SUP35*. Данный штамм должен быть маркирован нонсенс мутацией *ade1-14*, что позволит оценивать уровень точности терминации трансляции в соответствии с ростом штамма на среде без аденина. Согласно нашей гипотезе олигомеризация гибридного фактора терминации трансляции A_{β} -Sup35MC за счет агрегации последовательностей A_{β} должна вызывать супрессию нонсенс-мутации *ade1-14(UGA)*. В этом случае данный стоп-кодон с определенной частотой будет прочитываться как значащий, что приведет к синтезу полноразмерного белка Ade1 и росту штамма в среде без аденина. Таким образом, агрегация A_{β} -пептида может иметь фенотипическое

проявление в гетерологичной системе. Предложенный подход позволит исследовать механизм агрегации A_{β} -пептида, а также может быть использован для массового скрининга белков, пептидов и других агентов, регулирующих и блокирующих агрегацию амилоидного пептида.

В этой статье представлены результаты первого этапа работы по генетическому анализу фенотипических эффектов продукции гибридного белка A_{β} -Sup35MC в дрожжевой клетке.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовались стандартные генетические методы трансформации дрожжей с использованием ацетата лития и ДНК-носителя [21] и трансформации бактерий [15]. Реакции рестрикции и лигирования осуществляли с помощью ферментов компаний «Promega» и «Fermentas» согласно протоколу производителей.

Среды и условия культивирования

Для культивирования *E. coli* использовали жидкую и твердую среду LB и жидкую среду SOB [15]. Дрожжи культивировали при 30 °C на стандартных твердых и жидких средах [2, 1, 22]. Использовали полную среду YAPD, а также селективные среды на основе MD, в которые добавляли витамины, микроэлементы и необходимые аминокислоты в стандартных концентрациях. Для экспрессии гибридного гена A_{β} -*SUP35MC*, находящегося под контролем индуцибельного промотора *CUP1*, в среды добавляли $CuSO_4$ в концентрации от 3-х до 300 μ M. Для элиминации прионных детерминант использовали твердую среду YAPD с добавлением 5мM хлорида гуанидина (GuHCl).

Штаммы

Для амплификации плазмидной ДНК использовали штамм *E. coli* HB101 [15]. В работе использованы автодиплоидные штаммы *Saccharomyces cerevisiae* GT109, GT111 и GT113, полученные нами ранее [8]. Генотипы штаммов представлены в табл. 1. Последовательность гена *Sup35* в одном из гомологов хромосомы 4 заменена последовательностью гена *HIS3*. Штаммы гомозиготны по нонсенс-мутации *ade1-14(UGA)* и маркированы рядом других мутаций. Штаммы GT109 и GT111 содержат фактор [*PIN*⁺], в отличие от штамма GT113, который имеет статус [*pin*⁻]. Фактор [*PIN*⁺] представляет собой прионную изоформу белка Rnq1. Прионоподобные аг-

регаты Rnq1 способствуют индукции фактора [*PSI*⁺] при сверхпродукции белка Sup35 [10].

Для получения гаплоидных штаммов $\Delta sup35::HIS3$ [P_{CUP1} - A_{β} - $SUP35MC(URA3)$] автодиплоидные изогенные штаммы GT109, GT111 и GT113 были трансформированы плазмидой [P_{CUP1} - A_{β} - $SUP35MC(URA3)$] (см. далее). Трансформантов отбирали на синтетической селективной среде без урацила. Полученные штаммы были обозначены GT109-1, GT111-1 и GT113-1 соответственно. С помощью случайной выборки аскоспор в мейотическом потомстве диплоидных трансформантов были получены гаплоидные сегреганты $\Delta sup35::HIS3$ [P_{CUP1} - A_{β} - $SUP35MC(URA3)$]. Эти гаплоидные штаммы были названы 1-GT109-1, 1-GT111-1 и 1-GT113-1 соответственно. Жизнеспособность гаплоидных штаммов, несущих делецию хромосомной копии *SUP35*, обеспечивается за счет экспрессии гибридного гена A_{β} -*SUP35MC*.

Штамм GT111 был также трансформирован плазмидой [P_{CUP1} - $SUP35MC(URA3)$] (см. далее). Из полученных трансформантов (GT111-2) с помощью случайной выборки аскоспор был получен гаплоидный штамм 1-GT111-2 ($\Delta sup35::HIS3$ [P_{CUP1} - $SUP35MC(URA3)$]). Генотипы полученных штаммов представлены в табл. 1.

Плазмиды

Плазида pKT218,620 [18] содержит мутантную последовательность *HSP104* под контролем индуцибельного промотора *GAL1*, бактериальный и дрожжевой районы инициации репликации, ген

устойчивости к ампициллину — *Amp*^R и ген *LEU2*. Экспрессия мутантной последовательности имеет доминантный эффект и приводит к инактивации АТФ-й активности всего клеточного пула Hsp104p. Плазида любезно предоставлена Ю. Черновым (Inst. of Technology, Atlanta, Georgia, USA).

Однокопийные центромерные плазмиды — [P_{SUP35} - $SUP35MC(URA3)$] [P_{SUP35} - $SUP35MC(LEU2)$] — сконструированные на базе векторов pRS316 и pRS315 соответственно, содержат последовательность *SUP35MC* под контролем конститутивного промотора гена *SUP35* (P_{SUP35}), бактериальный и дрожжевой районы инициации репликации, ген устойчивости к ампициллину — *Amp*^R, гены *URA3* (*LEU2*) и полилинкер. Плазмиды любезно предоставлены Ю. Черновым.

Плазмиды

[P_{CUP1} - $SUP35MC(URA3)$]

и [P_{CUP1} - A_{β} - $SUP35MC(URA3)$] были сконструированы в данной работе. Промотор *SUP35* в плазмиде [P_{SUP35} - $SUP35MC(URA3)$] фланкирован сайтами рестрикции XhoI и BamHI. Мы заменили этот фрагмент на последовательность, кодирующую промотор *CUP1* (в дальнейшем P_{CUP1}), фланкированную такими же сайтами рестрикции. Плазида [P_{CUP1} - $SUP35MC(URA3)$] содержит последовательность P_{CUP1} - $SUP35MC$, бактериальный и дрожжевой районы инициации репликации, ген устойчивости к ампициллину — *Amp*^R, ген *URA3* и полилинкер.

Таблица 1

Генотипы штаммов, использованных в работе

Штамм	Генотип	Источник
GT109	<i>MATa/MATa ade1-14(UGA)/ade1-14(UGA) Δhis3/Δhis3 leu2-3, 122/leu2-3, 112 lys2/lys2 ura3-52/ura3-52 trp1-289/trp1-289 SUP35/Δsup35::HIS3 [PSI⁺] [PIN⁺]</i>	(Chernoff et al., 2000)
GT111	[<i>psi</i> ⁻] [<i>pin</i> ⁺] дериват GT109	(Chernoff et al., 2000)
GT113	[<i>psi</i> ⁻] [<i>pin</i> ⁻] дериват GT109	(Chernoff et al., 2000)
GT109-1	GT109 [P_{CUP1} - A_{β} - $SUP35MC(URA3)$]	Получен в данной работе
GT111-1	GT111 [P_{CUP1} - A_{β} - $SUP35MC(URA3)$]	Получен в данной работе
GT113-1	GT113 [P_{CUP1} - A_{β} - $SUP35MC(URA3)$]	Получен в данной работе
GT111-2	GT111 [P_{CUP1} - $SUP35MC(URA3)$]	Получен в данной работе
1-GT109-1	<i>MATa ade1-14(UGA) Δhis3 leu2-3 lys2 ura3-52 trp1-289 Δ sup35::HIS3 [P_{CUP1}-A_β-SUP35MC(URA3)] [PIN⁺]</i> (гаплоидный сегрегант GT109)	Получен в данной работе
1-GT111-1	<i>MATa ade1-14(UGA) Δhis3 leu2-3 lys2 ura3-52 trp1-289 Δ sup35::HIS3 [P_{CUP1}-A_β-SUP35MC(URA3)] [PIN⁺]</i> (гаплоидный сегрегант GT111)	Получен в данной работе
1-GT113-1	<i>MATa ade1-14(UGA) Δhis3 leu2-3 lys2 ura3-52 trp1-289 Δ sup35::HIS3 [P_{CUP1}-A_β-SUP35MC(URA3)] [pin⁻]</i> (гаплоидный сегрегант GT113)	Получен в данной работе
1-GT111-2	<i>MATa ade1-14(UGA) Δhis3 leu2-3 lys2 ura3-52 trp1-289 Δ sup35::HIS3 [P_{CUP1}-SUP35MC(URA3)] [PIN⁺]</i> (гаплоидный сегрегант GT111-2)	Получен в данной работе

Последовательность, кодирующая A_{β} -пептид человека, была получена из тотальной РНК мозга абортуса при помощи метода RT-PCR (обратной полимеразной цепной реакции). Синтез кДНК проводился с помощью набора реактивов и согласно протоколу фирмы «Fermentas». Праймеры содержат регуляторные последовательности, сайты рестрикции BamHI и SacI и последовательности комплементарные 5' и 3' концам A_{β} , кодирующего 40 аминокислот.

• F-primer:

5' GGGTCCAC GGATCC TAT ATG TCT
GATGCAGAATTCCGACAT 3'

• R-primer:

5' GTTATAAA GGATCC
GACAACACCGCCACCAT 3'

Аmplифицированная последовательность была секвенирована и встроена в плазмиду [P_{CUP1} - $SUP35MC(URA3)$] по сайту BamHI расположенному след за промотором $CUP1$. Центромержная плазида [P_{CUP1} - A_{β} - $SUP35MC(URA3)$] содержит последовательность A_{β} - $SUP35MC$ под контролем индуцибельного промотора $CUP1$, бактериальный и дрожжевой районы инициации репликации, ген устойчивости к ампициллину — Amp^R и ген $URA3$.

Учет нонсенс-супрессии

Нонсенс-супрессия в гаплоидных штаммах $\Delta sup35$ [P_{CUP1} - A_{β} - $SUP35MC(URA3)$], несущих нонсенс-мутацию $ade1-14$, оценивали визуально по росту штамма на твердой среде без аденина. Уровень нонсенс-супрессии в данной системе зависит от уровня экспрессии гена P_{CUP1} - A_{β} - $SUP35MC$. Используемый нами промотор $CUP1$ дает возможность регулировать экспрессию A_{β} - $SUP35MC$ при помощи изменения концентрации ионов меди в питательной среде. Штаммы выращивали на твердой синтетической среде, содержащей необходимые добавки, а также $CuSO_4$ в концентрациях 3, 50, 100, 150, 200, 250 и 300 μM и затем перепечатывали на среду без аденина с такой же концентрацией $CuSO_4$. Рост штаммов учитывали ежедневно в течение 14 дней.

РЕЗУЛЬТАТЫ

1. Эффект экспрессии гибридного гена A_{β} - $SUP35MC$ на фоне делеции хромосомной копии гена $SUP35$

Гаплоидные штаммы, содержащие гибридный ген P_{CUP1} - A_{β} - $SUP35MC$ на фоне делеции хромо-

сомной копии $SUP35$, жизнеспособны на полной среде YAPD и синтетических средах. Жизнеспособность исследуемых штаммов свидетельствует о том, что гибридная последовательность A_{β} - $SUP35MC$ компенсирует отсутствие интактного гена $SUP35$.

Изменяя концентрацию ионов меди в питательной среде, мы провели анализ влияния уровня экспрессии гибридного гена A_{β} - $SUP35MC$ на супрессию нонсенс-мутации $ade1-14(UGA)$. Результаты приведены в табл. 2.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что при увеличении продукции химерного белка A_{β} - $Sup35MC$ закономерно повышается эффективность терминации трансляции (см. табл. 2). Все три штамма (1-GT109-1, 1-GT111-1 и 1-GT113-1), содержащие химерный ген, имеют одинаковые характеристики роста на среде без аденина. Таким образом, [PIN]-статус гаплоидных штаммов, а также наличие или отсутствие [PSI^+]-фактора в исходных диплоидных штаммах не влияют на эффективность работы гибридного фактора терминации трансляции A_{β} - $Sup35MC$.

В штаммах, несущих гибридный ген P_{CUP1} - A_{β} - $SUP35MC$, даже при высоком уровне продукции A_{β} - $Sup35MC$ (150 μM $CuSO_4$) нонсенс-супрессия ингибируется не полностью — рост на среде без аденина наблюдается на 5-й, 6-й день. В контроле у штамма 1-GT111-2, содержащего плазмиду с конструкцией P_{CUP1} - $SUP35MC$, нонсенс-супрессия не отмечается при добавлении 100 μM $CuSO_4$ (см. табл. 2). Очевидно, при одинаковом уровне продукции $Sup35MC$ обеспечивает более высокую эффективность терминации трансляции, чем гибридный белок A_{β} - $Sup35MC$.

Увеличение продукции A_{β} - $Sup35MC$ (250 и 300 μM $CuSO_4$) вызывает почти полное подавление нонсенс-супрессии (см. табл. 2). При этом выявляются лишь отдельные редкие колонии, демонстрирующие активный рост на среде без аденина. Такие колонии были отобраны, рассеяны истощающим штрихом на полной среде и отдельные клоны были отпечатаны на среду без аденина с добавлением 150 μM $CuSO_4$. В потомстве некоторых колоний все полученные клоны демонстрировали рост на этой селективной среде на вторые сутки инкубации (рис. 1). Этот признак стабильно наследовался в ряду клеточных поколений.

Таким образом, были отобраны штаммы, характеризующиеся высоким уровнем нонсенс-супрессии. Один из таких гаплоидных штаммов (n1-1-GT111-1) был выбран нами для дальнейшей работы. Во всех экспериментах, описанных далее, во все среды добавляли 150 μM $CuSO_4$ для обес-

Таблица 2

Рост штаммов на среде без аденина с различной концентрацией CuSO_4

Штамм	Концентрация CuSO_4 в среде, μM	Начало роста на среде без аденина, дни
1-GT109-1, 1-GT111-1 и 1-GT113-1* (Δsup35 [$P_{\text{CUP1}}\text{-A}_\beta\text{-SUP35MC(URA3)}$])	3	2
	50	4
	100	4
	150	6
	200	7
	250	10
1-GT111-2 (Δsup35 [$P_{\text{CUP1}}\text{-SUP35MC(URA3)}$])	300	14
	3	6
	50	10
	100	—**
	150	—
	200	—
250	—	
300	—	

Примечание: * — для всех трех штаммов отмечены одинаковые характеристики роста на среде без аденина; ** — символ «—» обозначает, что за 14 дней наблюдений рост на селективной среде отмечен не был.

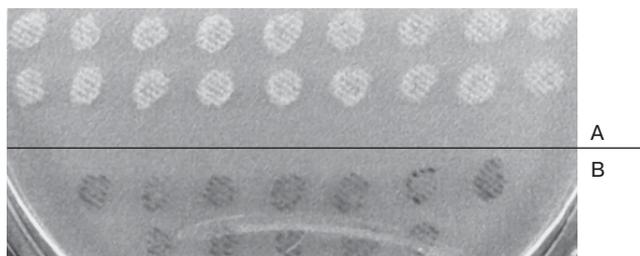


Рис. 1. Рост штамма 1-GT111-1 на среде без аденина, содержащей 150 мМ CuSO_4 (третий день учета на селективной среде):

А — клоны, полученные из одной колонии, в которой произошла индукция nonsense-супрессии; **Б** — клоны исходного штамма 1-GT111-1.

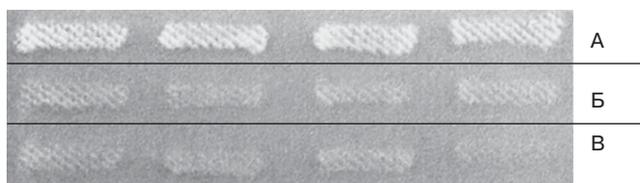


Рис. 2. Рост на среде без аденина, содержащей 150 мМ CuSO_4 (третий день учета на селективной среде):

А — штамм 1-GT111-1 характеризуется высоким уровнем nonsense-супрессии; **Б** — штамм 1-GT111-2; **В** — в штамме 1-GT111-2 плазмиды [$P_{\text{CUP1}}\text{-SUP35MC(LEU2)}$] замещена на плазмиду [$P_{\text{CUP1}}\text{-A}_\beta\text{-SUP35MC(URA3)}$], выделенную из штамма 1-GT111-1.

печения стабильного уровня продукции белка $\text{A}_\beta\text{-Sup35MC}$.

2. Анализ факторов, индуцирующих nonsense-супрессию на фоне продукции гибридного белка $\text{A}_\beta\text{-Sup35MC}$

Индукция nonsense-супрессии в штамме n1-1-GT111-1 может объясняться следующими факторами:

1) nonsense-супрессия вызвана мутацией в плазмиде, содержащей гибридный ген $\text{A}_\beta\text{-SUP35MC}$;

2) снижение точности терминации трансляции является следствием мутации в геноме штамма n1-1-GT111-1;

3) nonsense-супрессия связана с прионизацией и, как следствие, частичной инактивацией гибридного белка $\text{A}_\beta\text{-Sup35MC}$.

Для проверки первой гипотезы плазмиды $P_{\text{CUP1}}\text{-A}_\beta\text{-SUP35MC(URA3)}$ была выделена из клеток штамма n1-1-GT111-1 и использована для трансформации штамма 1-GT111-2, который имеет идентичный генотип, но содержит плазмиду $P_{\text{CUP1}}\text{-SUP35MC(LEU2)}$. На следующем этапе плазмиды с маркерным геном LEU2 была утрачена, и дрожжи содержали лишь плазмиду $P_{\text{CUP1}}\text{-A}_\beta\text{-SUP35MC(URA3)}$. Если штамм n1-1-GT111-1 растет на среде без аденина уже на вторые сутки, то штамм, полученный в результате данного эксперимента и содержащий ту же самую плазмиду, начинает расти лишь на 5–6 день (рис. 2). На основании представленных данных можно заключить, что nonsense-супрессия, характерная для штамма n1-1-GT111-1, не связана с возникновением каких-либо мутаций в последовательности плазмиды, кодирующей гибридный белок $\text{A}_\beta\text{-Sup35MC}$.

Для анализа возможного влияния мутаций или цитоплазматических детерминант, которые могли возникнуть или имелись в исследуемом штамме, на индукцию nonsense-супрессорного фенотипа был проведен эксперимент, схема которого представлена на рис. 3.

Штамм n1-1-GT111-1 был трансформирован центромерной плазмидой $P_{\text{SUP35}}\text{-SUP35MC(LEU2)}$. Из четырех индивидуальных трансформантов было отобрано по восемь клонов, потерявших плазмиду $P_{\text{CUP1}}\text{-SUP35MC(URA3)}$. Анализ роста на среде без аденина показал, что экспрессия последовательности SUP35MC приводит к элиминации nonsense-супрессии (рис. 4б). Если бы nonsense-супрессия в штамме n1-1-GT111-1 была вызвана мутацией в генах, контролирующей точность терминации трансляции (например, в гене SUP45), то описанная замена плазмид не повлияла бы на характер роста штамма на среде без аденина. Эти данные дают основание полагать, что

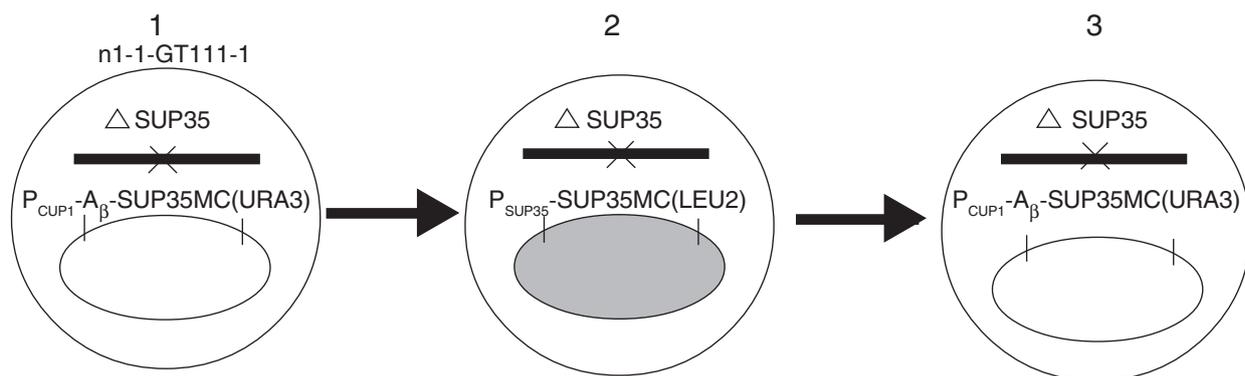


Рис. 3. Схема последовательной замены плазмид в штамме *n1-1-GT111-1*:

1 — штамм *n1-1-GT111-1* содержит плазмиду $[P_{CUP1-A_{\beta}}-SUP35MC(URA3)]$; 2 — исходная плаزمида заменена на $[P_{SUP35}-SUP35MC(LEU2)]$; 3 — после замены плазмид штамм вновь содержит плазмиду $[P_{CUP1-A_{\beta}}-SUP35MC(URA3)]$.

нонсенс-супрессорный фенотип не связан с возникновением супрессорных мутаций в геноме исследуемого штамма. Тем не менее остается вероятность того, что мутация или неизвестный прионный детерминант, влияющие на точность терминирования трансляции, проявляются лишь на фоне продукции гибридного белка A_{β} -Sup35MC. Для проверки такой возможности мы вновь заменили плазмиды:

$P_{SUP35}-SUP35MC(LEU2) \rightarrow P_{CUP1-A_{\beta}}-SUP35MC(URA3)$ (см. рис. 3).

Следует отметить, что в этом эксперименте штамм трансформировали ДНК плазмиды $P_{CUP1-A_{\beta}}-SUP35MC(URA3)$, выделенной из бактерий, которую использовали ранее для получения штамма *1-GT111-1*. На следующем этапе плазмиды $P_{SUP35}-SUP35MC(LEU2)$ была утрачена, и трансформанты были отпечатаны на среду без аденина. Штамм, полученный в результате эксперимента с заменами плазмид, генетически идентичен исходному штамму *n1-1-GT111-1* и характеризуется таким же высоким уровнем нонсенс-супрессии (рис. 4в).

На основании полученных данных можно заключить, что в штамме *n1-1-GT111-1* имеется некий фактор, вызывающий нонсенс-супрессию при продукции белка A_{β} -Sup35MC.

Для проверки гипотезы о прионной природе данного фактора штамм *n1-1-GT111-1* пассировали на среде с дрожжевым антиприонным агентом $GuHCl$. Известно, что использование $GuHCl$ приводит к элиминации дрожжевых приноподобных факторов $[PSI^+]$, $[PIN^+]$ и $[URE3]$ [9, 26, 28]. После трех последовательных пересевов на среде YAPD с добавлением $5\mu M$ $GuHCl$ дрожжи клонировали истощающим штрихом на среде YAPD. Отдельные клоны были пересеяны на полную среду и затем от-

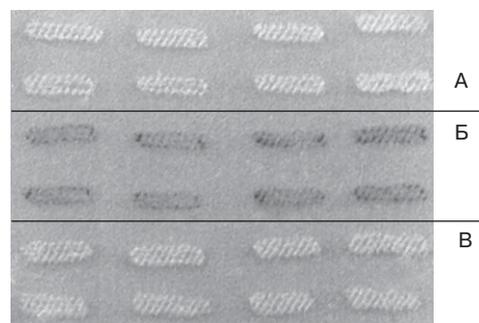


Рис. 4. Рост на среде без аденина, содержащей $150\mu M$ $CuSO_4$ в эксперименте с последовательной заменой плазмид (третий день учета на селективной среде):

А — штамм *n1-1-GT111-1* содержит плазмиду $[P_{CUP1-A_{\beta}}-SUP35MC(URA3)]$;
Б — замена плазмиды $[P_{CUP1-A_{\beta}}-SUP35MC(URA3)]$ на плазмиду $[P_{SUP35}-SUP35MC(LEU2)]$;
В — замена плазмиды $[P_{SUP35}-SUP35MC(LEU2)]$ на плазмиду $[P_{CUP1-A_{\beta}}-SUP35MC(URA3)]$.

печатаны на среду без аденина. Пассирование на среде с $GuHCl$ привело к элиминации нонсенс-супрессии у 97% из 128-ми проанализированных клонов (рис. 5).

В деривате штамма *n1-1-GT111-1*, утратившем нонсенс-супрессорный фенотип в результате пассирования на $GuHCl$, была проведена последовательная замена плазмид по схеме, приведенной на рис. 3. В этом случае после плазмидных замен нонсенс-супрессия не наблюдалась (результаты не представлены). Таким образом, использование $GuHCl$ приводит к элиминации некоего дрожжевого детерминанта, который способен взаимодействовать с гибридным белком A_{β} -Sup35MCp.

На наш взгляд можно предложить лишь одно непротиворечивое объяснение полученных результатов — в штамме *n1-1-GT111-1* произошла ин-

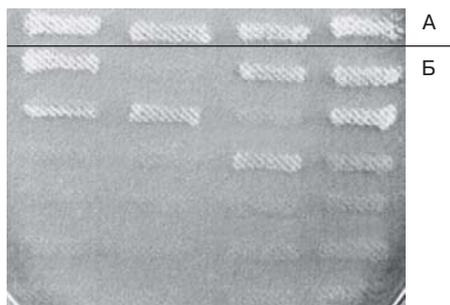


Рис. 5. Рост штамма *n1-1-GT111-1* на среде $-Ade + 150 \mu M CuSO_4$ до (А) и после (Б) пассирования на среде с $CuHCl$ (третий день учета на селективной среде)

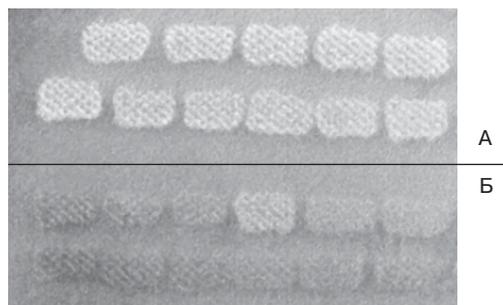


Рис. 6. Рост на среде $-Ade + 150 \mu M CuSO_4$ (А) клонов штамма *n1-1-GT111-1* и (Б) клонов этого же штамма после временной инактивации *Hsp104p* (третий день учета на селективной среде)

дукция неизвестного дрожжевого прионоподобного фактора, который сам по себе не вызывает нонсенс-супрессии (рис. 4б), однако его присутствие индуцирует прионизацию и, как следствие, частичную инактивацию A_{β} -Sup35Mcr. Это приводит к проявлению нонсенс-супрессорного фенотипа.

3. Влияние шаперона *Hsp104* на проявление нонсенс-супрессии

Мы показали, что нонсенс-супрессия, характерная для штамма, несущего гибридный ген A_{β} -SUP35MC, элиминируется под действием антиприонного агента $CuHCl$. Известно, что $CuHCl$ инактивирует ГТФ-азную активность дрожжевого шаперона *Hsp104*, который играет ключевую роль в стабильной передаче прионных агрегатов в ряду клеточных поколений [6, 7, 16]. По всей вероятности в штаммах [*PSI⁺*] *Hsp104p* «расщепляет» крупные агрегаты *Sup35p* на олигомеры, которые передаются при клеточных делениях и служат в качестве затравки для прионизации новых мономеров [13]. Делеция *HSP104* или инактивация соответствующего белка приводят к формированию крупных прионных агрегатов, которые не могут передаваться из клетки в клетку [3]. Как уже было сказано, полученные нами данные свидетельствуют о том, что нонсенс-супрессия, наблюдаемая в нашей системе, определяется прионизацией гибридного белка A_{β} -Sup35MC. Поскольку нонсенс-супрессия, характерная для штамма *n1-1-GT111-1*, элиминируется под воздействием $CuHCl$, то следует ожидать, что аналогичный эффект будет наблюдаться и в случае инактивации *Hsp104p*. Для проверки этой гипотезы штамм *n1-1-GT111-1* был трансформирован плазмидой *rKT218,620*, несущей маркерный ген *LEU2* и мутантный вариант гена *HSP104* под контролем индуцибельного *GAL1*-промотора. Известно, что данная мутация имеет доминантный эффект и приводит к инактивации всего клеточ-

ного пула белка *Hsp104* [27]. Трансформантов отбирали на синтетической среде без лейцина и отсеивали на среду без лейцина с галактозой для активации экспрессии мутантного варианта гена *HSP104*. В качестве контроля тех же трансформантов отсеивали на среду без лейцина с добавлением глюкозы. После трех последовательных пассажей на указанных средах трансформантов клонировали истощающим штрихом на полной среде *YAPD*, отбирали отдельные клоны и методом отпечатков переносили на среду без аденина. Всего был проанализирован 71 клон. Инактивация клеточного пула *Hsp104p* привела к потере нонсенс-супрессорного фенотипа у 64 клонов (90%), в то время как в контроле нонсенс-супрессорный фенотип стабильно наследуется (рис. 6). Таким образом, инактивация *Hsp104p*, как и воздействие $CuHCl$, приводит к элиминации нонсенс-супрессии, что подтверждает гипотезу о прионной конформации гибридного белка A_{β} -Sup35MC.

ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что гибридный белок A_{β} -Sup35MC выполняет функцию дрожжевого фактора терминации трансляции и обеспечивает жизнеспособность штаммов на фоне делеции *SUP35*. Эффективность терминации трансляции закономерно повышается с увеличением уровня продукции A_{β} -Sup35Mcr (см. табл. 2). Следует отметить, что исследуемый гибридный белок выполняет функцию фактора терминации трансляции менее эффективно, чем полноразмерный *Sup35p* или его делетированный вариант *Sup35MC* (см. табл. 2). По всей вероятности, активность гибридного белка в первую очередь зависит от его третичной структуры. Теоретически можно предположить, что последовательность A_{β} замеща-

ющая N домен, взаимодействует с C доменом, что приводит к снижению активности гибридного белка. Кроме того, в результате нарушения третичной структуры может быть нарушено взаимодействие гибридного белка с функциональными партнерами Sup35p. Нельзя также исключить, что некоторые последовательности, замещающие N домен, подвергаются атаке дрожжевых протеаз, что дестабилизирует гибридный белок и приводит к снижению его активности.

Мы показали, что нонсенс-супрессия на фоне продукции гибридного белка A_{β} -Sup35MC не связана с супрессорными мутациями в геноме исследуемого штамма или мутациями в плазмиде P_{CUP1} - A_{β} -SUP35MC(URA3). Пассирование штамма на среде с универсальным антиприонным агентом GuHCl приводит к элиминации нонсенс-супрессии. Полученные результаты свидетельствуют в пользу гипотезы, согласно которой индукция нонсенс-супрессии вызвана прионизацией и частичной инактивацией гибридного белка A_{β} -Sup35MC. Известно, что белок Sup35MC без N-домена не агрегирует даже при сверхпродукции [25], следовательно прионизация A_{β} -Sup35MC возможна лишь за счет конформационных переключений A_{β} -пептида, который играет роль прионизирующего домена. Фактор, вызывающий нонсенс-супрессию в результате прионизации A_{β} -Sup35MCp, был назван нами $[A_{\beta}^+]$. Штаммы, не содержащие данный фактор, или утратившие нонсенс-супрессорный фенотип после обработки ГГХ были обозначены как $[A_{\beta}^-]$. Вместе с тем полученные результаты не укладываются в простую схему, согласно которой нонсенс-супрессия объясняется лишь появлением прионной изоформы A_{β} -Sup35MCp (фактора $[A_{\beta}^+]$). Согласно общепринятым представлениям, прионный олигомер является своеобразной конформационной матрицей для присоединения и конверсии новых мономеров. В одном из экспериментов в штамме, содержащем фактор $[A_{\beta}^+]$, проводилась последовательная замена плазмид:

$$P_{CUP1}\text{-}A_{\beta}\text{-SUP35MC(URA3)} \rightarrow P_{SUP35}\text{-SUP35MC(LEU2)} \rightarrow P_{CUP1}\text{-}A_{\beta}\text{-SUP35MC(URA3)}.$$

Как можно видеть из этой схемы, на одном из этапов в исследуемом штамме гибридный ген A_{β} -SUP35MC был замещен на последовательность SUP35MC. Таким образом, матрица для прионной конверсии (белок A_{β} -Sup35MC) была утрачена. Это вполне объяснимо привело к исчезновению эффекта нонсенс-супрессии (см. рис. 4б).

Однако при последующей обратной замене $P_{SUP35}\text{-SUP35MC(LEU2)} \rightarrow P_{CUP1}\text{-}A_{\beta}\text{-SUP35MC(URA3)}$ произошло восстановление нонсенс-супрессорного фенотипа (см. рис. 4в). Возникает вопрос: что спо-

собствует индукции нонсенс-супрессии *de novo* в отсутствие прионной изоформы белка A_{β} -Sup35MC?

Все наблюдаемые эффекты объясняются в рамках гипотезы, согласно которой прионизация и частичная инактивация гибридного белка A_{β} -Sup35MC происходит только на фоне индукции неизвестного дрожжевого прионоподобного фактора, названного нами $[ABA^+]$ (от Amyloid Beta Agregase). Мы полагаем, что в штамме n1-1-GT111-1 произошла спонтанная индукция фактора $[ABA^+]$, что вызвало прионоподобную агрегацию A_{β} -Sup35MCp и, как следствие, нонсенс-супрессорный фенотип. Фактор $[ABA^+]$ элиминируется под действием GuHCl, что блокирует возможность повторной индукции $[A_{\beta}^+]$. Возможно фактор $[ABA^+]$ лишь инициирует агрегацию A_{β} -Sup35MCp, а затем гибридный фактор терминирует трансляцию поддерживается в изоформе $[A_{\beta}^+]$ самостоятельно. Также нельзя исключить, что A_{β} -Sup35MCp способен агрегировать лишь в присутствии олигомеров, соответствующих фактору $[ABA^+]$.

Надо отметить, что прион-прионные взаимодействия уже описаны в дрожжевой системе. Так, сверхпродукция полноразмерного белка Sup35 приводит к индукции фактора $[PSI^+]$ лишь при наличии в клетке прионной изоформы белка Rnq1/ $[PIN^+]$ [10]. В дальнейшем фактор $[PSI^+]$ стабильно наследуется даже в случае делеции гена, кодирующего белок Rnq1 [10]. Таким образом, прионизация Rnq1 необходима только для индукции прионизации Sup35p. Возможно, в нашем случае имеет место аналогичное взаимодействие фактора $[ABA^+]$ и белка A_{β} -Sup35MC.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что A_{β} -пептид, не обладающий свойствами приона в организме млекопитающих, является прионформирующим доменом в дрожжах *Saccharomyces cerevisiae*. Нонсенс-супрессия, наблюдаемая в нашей системе, элиминируется в результате инактивации Hsp104p. Исходя из этих результатов, можно предположить, что Hsp104p является кофактором, расщепляющим прионные агрегаты A_{β} -Sup35MCp на олигомерные «инфекционные зерна». Отсутствие инфекционных свойств A_{β} -пептида в организме млекопитающих может объясняться тем, что дрожжевой шаперон Hsp104 не имеет гомолога у высших эукариот. Однако следует учитывать, что на данном этапе исследования можно говорить лишь о прионных характеристиках полипептидной последовательности A_{β} в составе гибридного белка A_{β} -Sup35MCp, а не самого по себе A_{β} -пептида. Взаимодействие Hsp104p с A_{β} -Sup35MCp может определяться наличием до-

мена M Sup35p в составе гибридного белка. Как уже упоминалось, домен M, по всей вероятности, играет важную роль в связывании шаперона Hsp104 с прионной изоформой Sup35p [14]. С другой стороны можно допустить, что Hsp104p взаимодействует с прионом [АВА⁺], а инактивация этого шаперона приводит к потере фактора [АВА⁺], который необходим для поддержания прионной изоформы A_β-Sup35Mcp.

На следующем этапе работы необходимо выявить наличие или отсутствие прионоподобных агрегатов A_β-Sup35Mcp в разработанной нами системе с помощью биохимических методов. Кроме того, планируется исследовать характер наследования нонсенс-супрессорного фенотипа в мейотических делениях и возможность передачи фактора [A_β⁺] путем цитодукции. В настоящий момент утверждение о прионизации гибридного белка A_β-Sup35Mcp следует рассматривать как наиболее вероятную гипотезу, имеющую экспериментальные подтверждения.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают особую благодарность профессору кафедры генетики и селекции СПбГУ А.Ф. Смирнову за помощь в организации и проведении работы и профессору Ю.О. Чернову (Georgia Inst. of Technology, Atlanta, USA) за предоставленные плазмиды и участие в обсуждении экспериментов. Мы благодарны К.В. Волкову за предложения по выбору стратегии контрольных экспериментов, а также А.С. Борхсениусу, С.П. Задорскому, Ю.В. Соповой и Л.Н. Мироновой за критическое обсуждение результатов. Работа поддержана грантами CRDF — Министерства Образования № ST-012 и РФФИ № 04-04-49002-а, Министерства Образования А04-2.12-649, Научные школы № НШ-2214.2003.4 и Министерства образования «Ведущие научные школы».

Литература

- Захаров И.А., Кожин С.А., Кожина Т.Н., Федорова И.В. Сборник методик по генетике дрожжей-сахаромицетов. — Л.: Наука, 1984. — 143 с.
- Инге-Вечтомов С.Г. Идентификация некоторых групп сцепления у Петергофских генетических линий дрожжей // Генетика. — 1971. — Т. 7. — С. 113–124.
- Borchsenius A.S., Wegrzyn R.D., Newnam G.P., et al. Yeast prion protein derivative defective in aggregate shearing and production of new «seeds» // EMBO J. — 2001. — Vol. 20, N 23. — P. 6683–6691.
- Cai X.D., Golde T.E., Younkin S.G. Release of excess amyloid beta protein from a mutant amyloid beta protein precursor // Science. — 1993. — Vol. 259, N 5094. — P. 514–516.
- Citron M. Alzheimer's disease: treatments in discovery and development // Nat. Neurosci. — 2002. — Suppl. — P. 1055–1057.
- Chernoff Y.O., Derkatch I.L., Inge-Vechtomov S.G. Multicopy Sup35 gene induces de novo appearance of psi-like factors in yeast *Saccharomyces cerevisiae* // Curr. Genet. — 1993. — Vol. 24. — P. 268–270.
- Chernoff Y.O., Lindquist S.L., Ono B., Inge-Vechtomov S.G., Liebman S.W. Role of the chaperone HSP104 in propagation of the yeast prion-like factor [PSI⁺] // Science. — 1995. — Vol. 268. — P. 880–884.
- Chernoff Y.O., Galkin A.P., Lewitin E., Chernova T.A., Newnam G.P., Belenkiy S.M. Evolutionary conservation of prion-forming abilities of the yeast Sup35 protein // Mol. Microbiol. — 2000. — Vol. 35, N 4. — P. 865–876.
- Derkatch I.L., Bradley M.E., Zhou P., Chernoff Y.O., Liebman S.W. Genetic and environmental factors affecting the de novo appearance of the [PSI⁺] prion in *Saccharomyces cerevisiae* // Genetics. — 1997. — Vol. 147, N 2. — P. 507–519.
- Derkatch I.L., Bradley M.E., Hong J.Y., Liebman S.W. Prions affect the appearance of other prions: the story of [PIN⁺] // Cell. — 2001. — Vol. 106, N 2. — P. 171–182.
- Doel S.M., McCready S.J., Nierras C.R., Cox B.S. The dominant PNM2-mutation which eliminates the psi factor of *Saccharomyces cerevisiae* is the result of a missense mutation in the SUP35 gene // Genetics. — 1994. — Vol. 137, N 3. — P. 659–670.
- Hughes S.R., Goyal S., Sun J.E., Gonzalez-DeWhitt P., Fortes M.A., Riedel N.G., Sahasrabudhe S.R. Two-hybrid system as a model to study the interaction of beta-amyloid peptide monomers // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1996. — Vol. 93, N 5. — P. 2065–2070.
- Kryndushkin D.S., Smirnov V.N., Ter-Avanesyan M.D., Kushnirov V.V. Increased expression of Hsp40 chaperones, transcriptional factors, and ribosomal protein Rpp0 can cure yeast prions // J. Biol. Chem. — 2002. — Vol. 277, N 26. — P. 23702–23708.
- Liu J.J., Sondheimer N., Lindquist S.L. Changes in the middle region of Sup35 profoundly alter the nature of epigenetic inheritance for the yeast prion [PSI⁺] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2002. — Vol. 99. — P. 16446–16453.
- Maniatis T., Fritsch E.E., Sambrook J. Molecular cloning. A laboratory manual // Cold Spring Harbor Laboratory. — 1982. — 479 p.
- Moriyama H., Edskes H.K., Wickner R.B. [URE3] prion propagation in *Saccharomyces cerevisiae*: requirement for chaperone Hsp104 and curing by overexpressed chaperone Ydj1p // Mol. Cell Biol. — 2000. — Vol. 20, N 23. — P. 8916–22.
- Olsson A., Csajbok L., Ost M., Hoglund K., Nylen K., Rosengren L., Nellgard B., Blennow K. Marked increase of beta-amyloid(1-42) and amyloid precursor protein in ventricular cerebrospinal fluid after severe traumatic brain injury // J. Neurol. — 2004. — Vol. 251, N 7. — P. 870–876.
- Parsell D.A., Sanchez Y., Stitzel J. D., Lindquist S. Hsp104 is a highly conserved protein with two essential nucleotide-binding sites // Nature. — 1991. — Vol. 353. — P. 270–273.
- Price D.L. and Sisodia S.S. Mutant genes in familial Alzheimer's disease and transgenic models // Ann. Rev. Neurosci. — 1998. — Vol. 21. — P. 479–505.
- Prusiner S.B. Shattuck lecture — neurodegenerative diseases and prions // N. Eng. J. Med. — 2001. — Vol. 344, N 20. — P. 1516–1526.
- Rose M.D., Winstone F., Hieter P. Methods in yeast genetics. — CSHL Press, 1990. — 198 p.
- Sherman F., Fink G.R., Hinks J.B. Methods in Yeast Genetics // Cold Spring Harbor. — N.Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press, 1986.
- Suzuki N., Cheung T.T., Cai X.D., Odaka A. et al. An increased percentage of long amyloid beta protein secreted by familial amyloid beta protein precursor (beta APP717) mutants // Science. — 1994. — Vol. 264. — P. 1336–1340.
- Tamaoka A., Odaka A., Ishibashi Y., Usami M. et al. APP717 missense mutation affects the ratio of amyloid beta protein species

- (A beta 1-42/43 and a beta 1-40) in familial Alzheimer's disease brain // *J. Biol. Chem.* — 1994. — Vol. 269, N 52. — P. 32721–32724.
25. *Ter-Avanesyan M.D., Dagkesamanskaya A.R., Kushnirov V.V., Smirnov V.N.* The *Sup35* omnipotent suppressor gene is involved in the maintenance of the non-Mendelian determinant [*PSI*⁺] in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* // *Genetics.* — 1994. — Vol. 137. — P. 671–676.
26. *Tuite M.F., Mundy C.R., Cox B.S.* Agents that cause a high frequency of genetic change from [*psi*⁺] to [*psi*⁻] in *Saccharomyces cerevisiae* // *Genetics.* — 1981. — Vol. 98, N 4. — P. 691–711.
27. *Wegrzyn R.D., Barat K., Newman G.P., Zink A.D., Chernoff Y.O.* Mechanism of prion loss after Hsp104 inactivation in yeast // *Mol. Cell Biol.* — 2001. — Vol. 21. — P. 4656–4669.
28. *Wickner R.B.* [*URE3*] as an altered *URE2* protein: evidence for a prion analog in *Saccharomyces cerevisiae* // *Science.* — 1994. — Vol. 264, N 5158. — P. 566–569.
29. *Wisniewski T., Ghiso J., Frangione B.* Biology of A β amyloid in Alzheimer's disease // *Neurobiology of disease.* — 1997. — Vol. 4. — P. 313–328.
30. *Zhouravleva G., Frolova L., Le Goff X., Le Guellec R., Inge-Vechtomov S., Kisselev L., Philippe M.* Termination of translation in eukaryotes is governed by two interacting polypeptide chain release factors, eRF1 and eRF3 // *EMBO J.* — 1995. — Vol. 14. — P. 4065–4072.

Analysis of effects of A β -Sup35 hybrid protein production in yeast *Saccharomyces cerevisiae*

Tsaponina O.E., Lada A.G., Rubel A.A., Navolotskaya V.V., Petrova I.T., Inge-Vechtomov S.G., Galkin A.P.

✿ **SUMMARY:** A β -peptide is the main component of amyloid plaque that leads to neurodegeneration in case of Alzheimer disease. We have constructed yeast strain containing a chimeric A β -*SUP35MC* gene on the plasmid and deletion of the chromosomal copy of *SUP35*. Our data indicate that hybrid protein A β -Sup35MC is a yeast prion.

✿ **KEY WORDS:** Alzheimer's disease; A β -peptid; *SUP35*; yeast; test-system; nonsense-suppression; prion; translation termination.