

© А. А. Нижников^{1,2},
З. М. Магомедова¹,
А. Ф. Сайфитдинова¹,
С. Г. Инге-Вечтомов^{1,2},
А. П. Галкин^{1,2}

¹Санкт-Петербургский государственный университет, кафедра генетики и селекции

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

✿ Ранее мы показали, что делеция последовательности, кодирующей N-терминальный домен гена *SUP35*, создает генетический фон, позволяющий выявлять новые гены и эпигенетические детерминанты, контролирующие нонсенс-супрессию. В данном исследовании при помощи геномного скрининга мы выявили три гена, кодирующих потенциально амилоидогенные белки, сверхэкспрессия которых влияет на супрессорный фенотип в штамме, продуцирующем химерный белок Аβ-Sup35MC на фоне делеции хромосомной копии гена *SUP35*, кодирующего фактор терминации трансляции eRF3. Нами установлено, что гены *NAB2*, *NAB3* и *VTS1* участвуют в регуляции нонсенс-супрессии у дрожжей *S. cerevisiae*.

✿ **Ключевые слова:** прион; амилоид; дрожжи; *NAB2*; *NAB3*; *VTS1*; Sup35; [*NSI*⁺]; нонсенс-супрессия.

ВЫЯВЛЕНИЕ ГЕНОВ, КОДИРУЮЩИХ ПОТЕНЦИАЛЬНО АМИЛОИДОГЕННЫЕ БЕЛКИ, УЧАСТВУЮЩИХ В РЕГУЛЯЦИИ НОНСЕНС-СУПРЕССИИ У ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

ВВЕДЕНИЕ

Нонсенс-супрессией называется процесс прочтения стоп-кодонов в качестве значащих, чему способствует, в частности, снижение эффективности терминации трансляции или деградации некоторых мРНК. Нонсенс-супрессия достаточно хорошо изучена у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, для которых в настоящее время известен ряд генов-супрессоров, контролирующих данный признак. Среди них гены различных тРНК (Weiss et al., 1987; Ong et al., 1997), гены *SUP35* и *SUP45* (Инге-Вечтомов, 1964), *HAL3*, *PPZ1* и *PPZ2* (Ivanov et al., 2010), *UPF1*, *UPF2* и *UPF3* (Ono et al., 2005).

Необходимо отметить, что у дрожжей изучен не только генетический, но и эпигенетический контроль нонсенс-супрессии. Показано, что в регуляции этого признака участвует ряд дрожжевых прионов. Прионами называют белки, способные существовать в двух структурно и функционально отличающихся конформациях, одна из которых обладает инфекционными свойствами. Прионизация обычно сопровождается формированием упорядоченных обогащенных бета-слоями агрегатов, называемых амилоидами. В настоящее время известны семь дрожжевых белков, способных к прионизации: Sup35, Rnq1, Ure2, Swi1, Cys8, Mot3 и Sfp1 (Wickner, 1994; Derkatch et al., 1997; Du et al., 2008; Patel et al., 2009; Alberti et al., 2009; Rogoza et al., 2010). Прионные свойства продемонстрированы также для аспарагин-глутамин обогащенного домена белка New1 (Osherochich and Weissman, 2001). Кроме этого, выявлены два прионоподобных фактора ([β] и [*GAR*⁺]), не связанных с амилоидогенезом (Roberts and Wickner, 2003; Brown and Lindquist, 2009). Общим свойством амилоидных дрожжевых прионов, в отличие от прионного белка млекопитающих PrP, является обогащенность их структурных белков аспарагином (N) и глутамином (Q) (Yang et al., 2006; Serio et al., 2000). Показано участие в контроле нонсенс-супрессии как минимум трех прионных детерминантов: [*PSI*⁺], [*PIN*⁺] и [*ISP*⁺]. Детерминант [*PSI*⁺] является прионной изоформой Sup35, выполняющего функцию фактора терминации трансляции (Zhougavleva et al., 1995), и обладает свойствами доминантного omnipotentного супрессора (Wickner, 1994). Детерминант [*PIN*⁺], прионная изоформа Rnq1, непосредственно не регулирует нонсенс-супрессию, однако оказывает опосредованное влияние на этот процесс, вызывая спонтанное возникновение [*PSI*⁺] (Derkatch et al., 1997). Детерминант [*ISP*⁺], возникающий вследствие прионизации Sfp1, является антисупрессором на фоне комбинации специфических мутантных аллелей *SUP35* и *SUP45* (Rogoza et al., 2010). Недавно мы выявили новый супрессорный прионоподобный детерминант [*NSI*⁺] (Nonsense Suppression Inducer), который имеет особенности, характерные для дрожжевых прионов: он обладает способностью к обратимому изгнанию под действием антиприонного агента хлорида гуанидина, а также на фоне делеции или инактивации шаперона Hsp104, характеризуется доминантным менделевским типом наследования 4:0 в мейозе и цитоплазматической инфекционностью. Таким образом, [*NSI*⁺] является новым дрожжевым прионом с неизвестным геном-детерминантом (Saifitdinova et al., 2010). Этот детерминант вызывает omnipotentную нонсенс-супрессию на фоне делеции последовательности, кодирующей N-терминальный домен Sup35, однако не имеет проявления на фоне продукции полноразмерного Sup35 (Saifitdinova et al., 2010). Следовательно, можно констатировать, что делеция *SUP35N* создает

Поступила в редакцию 12.05.2011
Принята к публикации 02.09.2011

Таблица 1

Использованные в работе штаммы *S. cerevisiae*

Штамм	Генотип	Источник
1-1-Д931	<i>MATa sup35Δ::HIS3* ade1-14** his3 leu2 lys2 ura3 trp1-289**</i> [pU- <i>Aβ</i> -Sup35MC][<i>NSI</i> ⁺][<i>PIN</i> ⁺] ^{***}	Цапонина и др., 2005
4-1-1-Д931	Дериват штамма 1-1-Д931, несущий плазмиду pL- <i>Aβ</i> -Sup35MC вместо плазмиды pU- <i>Aβ</i> -Sup35MC	Saifitdinova et al., 2010
2-4-1-1-Д931	<i>MATa sup35Δ::HIS3 ade1-14 his3 leu2 lys2 ura3 trp1-289</i> [pL- <i>Aβ</i> -Sup35MC][<i>nsi</i> ⁻][<i>PIN</i> ⁺]	Saifitdinova et al., 2010
1-Д933	<i>MATa sup35Δ::HIS3 ade1-14 his3 leu2 lys2 ura3 trp1-289</i> [pU- <i>Aβ</i> -Sup35MC][<i>nsi</i> ⁻][<i>PIN</i> ⁺]	Saifitdinova et al., 2010

* — *sup35Δ::HIS3* — последовательность гена *SUP35* замещена на последовательность гена *HIS3*.
 ** — Аллель *ade1-14* содержит нонсенс-мутацию UGA; *trp1-289* — нонсенс-мутацию UAG.
 *** — [*NSI*⁺] и [*PIN*⁺] — стандартные обозначения дрожжевых прионных детерминантов.

своеобразный «провокационный» генетический фон, позволяющий выявлять новые гены и эпигенетические детерминанты, участвующие в регуляции нонсенс-супрессии.

В данном исследовании проведен геномный скрининг для выявления генов, контролируемых супрессию нонсенс-мутаций на фоне делеции *SUP35N*. Предложенный подход позволил выявить ряд последовательностей, контролируемых проявление нонсенс-мутаций. В частности, идентифицированы гены, кодирующие потенциально амилоидогенные белки, сверхэкспрессия которых индуцирует супрессорный фенотип.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Штаммы, среды и условия культивирования микроорганизмов

В работе применяли стандартные методы дрожжевой генетики (Kaiser et al., 1994). Генотипы штаммов дрожжей приведены в таблице 1. Для амплификации плазмидной ДНК использовали штамм *Escherichia coli* DH5α (Hanahan, 1985). При культивировании *E. coli* использовали жидкую и твердую среду LB (Sambrook et al., 1989). Дрожжи культивировали при 30 °C на твердой и жидкой среде YAPD, а также на синтетических средах, содержащих необходимые витамины, микроэлементы и аминокислоты (Захаров и др., 1984; Sherman et al., 1986). Для экспрессии генов под контролем регулируемого промотора *CUP1* в среды добавляли 150 мкМ CuSO_4 . Нонсенс-супрессию оценивали по росту штамма на селективной среде без аденина на четвертый день инкубации (Saifitdinova et al., 2010). Для селекции клонов, потерявших плазмиды, несущие ген *URA3*, использовали минимальную селективную среду с добавлением 1 г/л фтороротовой кислоты (ФОК) (Kaiser et al., 1994).

Плазмиды

Все использованные в работе плазмиды содержат дрожжевой и бактериальный ориджины репликации. Многокопийные плазмиды PCUP1-GFP (*URA3*) и pL-

Aβ-Sup35MC, несущие гены *GFP* и *Aβ-SUP35MC* соответственно под контролем промотора *CUP1*, получены нами ранее (Рубель и др., 2008; Saifitdinova et al., 2010). Многокопийные плазмиды серии pU-CUP1 (pU-DEF1, pU-NAB2, pU-NAB3, pU-NRP1, pU-PIN3 и pU-VTS1) предназначены для сверхэкспрессии генов *DEF1*, *NAB2*, *NAB3*, *NRP1*, *PIN3* и *VTS1*. Плазмиды получены путем инсерции ПЦР-фрагментов соответствующих генов (условия ПЦР, матрицы и праймеры описаны в разделе «Молекулярно-биологические методы») в плазмиду P_{CUP1}-GFP (*URA3*). Инсерция фрагмента производилась по сайтам *Bam*HI и *Sac*II (pU-CUP1-DEF1, pU-CUP1-VTS1 и pU-CUP1-NRP1), *Bam*HI и *Sac*I (pU-CUP1-NAB2 и pU-CUP1-NAB3) или *Bam*HI и *Not*I (pU-CUP1-PIN3). Плазмиды содержат перечисленные гены под контролем индуцибельного промотора *CUP1*, а также гены *AmpR* и *URA3*. Наличие вставок требуемых генов подтверждали при помощи секвенирования с использованием праймера CUP1-End.

Для проведения скрининга использована адресная дрожжевая геномная библиотека YSC4613 (“Open Biosystems”, EU). Библиотека включает 1588 клонов *E. coli*, несущих челночный многокопийный вектор pGP564 с уникальными фрагментами генома *S. cerevisiae*, средним размером 10,8 тысяч пар нуклеотидов и содержащими до 20 открытых рамок считывания. Таким образом, каждый клон адресной библиотеки содержит одну плазмиду с несколькими генами *S. cerevisiae* с известной нуклеотидной последовательностью. Вектор pGP564 маркирован геном устойчивости к антибиотику канамицину для селекции в бактериях и геном *LEU2*, обеспечивающим прототрофность дрожжевых штаммов, содержащих мутацию *leu2* на среде без лейцина.

Молекулярно-биологические методы

Использованные для конструирования плазмид серии pU-CUP1 последовательности генов *DEF1*, *NAB2*, *NAB3*, *NRP1*, *PIN3* и *VTS1* были получены клонированием при помощи ПЦР с геномной ДНК штамма 1-Д933.

Таблица 2

Использованные в работе праймеры

Название	Последовательность 5'-3'
FChPUF4	CCTCGAAGGAGGATTTGAT
RChPUF4	GAGAATATCCAACCTGCTTTTG
FVTS1BAMH1	GAGCGGATCCATGAAACATCCGTATGAGGAATTCC
RVTS1SAC2	CATCCCCGCGGTGCAACGTCAAGACAATCAAC
FPIN3BGL2	GAATCCAGATCTTATATGTCTGCTTCATTGATTAA
RPIN3NOT1	GATTAAGCGGCCGAGAACTTCGTTCAATTTATG
FDEF1BAMH1	TGACGGATCCATGTCTACACAATTTAGG
RDEF1SAC2	ATAAGCCGCGGTGGGAGGTTCTACTTCTC
FNRP1BAMH1	CGTCGGATCCATGCACTATGTGGTACTAGAGC
RNRP1SAC2	CATACCGCGGGCGCACAAATACGTCTTTCAG
FNAB3BAMH1	CAGCGGATCCATGTCTAGATGAAAACCATAACAG
RNAB3SAC1	CTACGAGCTCACCGCTATGTCTGAATTTATGC
FNAB2BAMH1	ACACGGATCCTATATGTCTCAAGAACAGTACAC
RNAB2SAC1	GCTTCCGAGCTCTCAGTTCATTTCCGTATCTT
RVTS1BAM1	GAATTTGGATCCGCAACGTCAAGACAATCAAC
CUP1-End	TCCGCTGAACCGTTCCAG

Последовательности праймеров для ПЦР приведены в таблице 2.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Выявление фрагментов дрожжевого генома, многокопийная экспрессия которых вызывает нонсенс-супрессию в штамме [*nsi-/[PIN+]*] 1-Д933

В данном исследовании нами был проведен геномный скрининг для выявления генов, сверхэкспрессия которых вызывает нонсенс-супрессию на фоне делеции последовательности, кодирующей N-терминальный домен белка Sup35. Использование библиотеки YSC4613 позволило проанализировать эффекты сверхэкспрессии более 97 % ядерных генов *S. cerevisiae* и выявить фрагменты дрожжевого генома, повышение числа копий которых приводит к индукции нонсенс-супрессии в штамме 1-Д933.

В ходе геномного скрининга мы провели 1588 трансформаций плазмидами библиотеки YSC4613 штамма 1-Д933, который в норме не демонстрирует нонсенс-супрессию на селективных средах без аденина и триптофана. По восемь трансформантов каждой плазмидой отбирали на селективную среду без лейцина, инкубировали в течение трех суток и переносили методом отпечатков на селективную среду без лейцина и аденина со 150 мкМ CuSO_4 для анализа супрессии нонсенс-мутации *ade1-14*. Всего в скрининге было проанализировано более 12700 трансформантов. В результате эксперимента нами было выявлено 26 плазмид, трансформация которыми вызывала нонсенс-супрессию в штамме 1-Д933. При повторной трансформации эффект воспроизвелся

для 22 плазмид. Данные о 163 генах, содержащихся в составе этих 22 плазмид, приведены в таблице 3. Следует отметить, что последовательности геномных фрагментов, клонированных в плазмидах библиотеки, в некоторых случаях перекрываются. Поэтому дальнейшему анализу подлежат только те гены, которые представлены в составе выявленных 22 плазмид, однако отсутствуют в плазмидах, трансформация которыми не приводит к супрессии. В результате, с учетом перекрывания, можно исключить 72 из 163 генов. Оставшиеся гены-кандидаты в таблице 3 выделены жирным шрифтом. Мы предположили, что каждая из выявленных 22 последовательностей содержит как минимум один ген, контролирующей супрессорный фенотип.

Анализ эффектов сверхэкспрессии генов, кодирующих потенциально амилоидогенные белки, выявленных в ходе скрининга

В результате геномного скрининга нами выявлена серия фрагментов дрожжевого генома, увеличение числа копий которых вызывает нонсенс-супрессию в штамме 1-Д933. В данном исследовании был проведен анализ эффектов сверхэкспрессии выявленных в ходе скрининга генов, кодирующих потенциально амилоидогенные белки из списка П. Гаррисон и М. Герштейн (Harrison and Gerstein, 2003): *DEF1*, *NAB2*, *NAB3*, *NRP1*, *PIN3* и *VTS1* (в таблице 3 выделены подчеркиванием). Для сверхэкспрессии этих генов под контролем промотора *CUP1* нами была получена серия многокопийных плазмид *pU-CUP1*, маркированных *URA3*. Полученными плазмидами трансформировали штамм

Таблица 3

Плазмиды библиотеки YSC4613, трансформация которыми вызывает нонсенс-супрессию в штамме 1-Д933

Название	Гены в составе плазмиды
GPM10p05	CHD1¹ , PAB1 , YER165C-A , DNF1[*]
GPM11n12	SAC3 ^{**} , SSY1 , YDR161W , NBP2 , CWC15 , SEC1^{**}
GPM11p20	CHD1^{**} , PAB1 , YER165C-A , DNF1[*]
GPM14f05	LCD1^{**} , RPL37B , PLM5 , SAM2 , LPP1 , SPG3 , PSP1 , YDR506C^{**}
GPM14k18	YPR150W^{***} , SUE1 , YPR152C , YPR153W , PIN3² , NCA2 , TPO3 , YPR157W[*]
GPM14l17	ABC1^{***} , τPHK^{Trp}_{CCA} , YGL118C , YGL117W , CDC20 , SNF4 , YGL114W , SLD3[*]
GPM15k07	YHR054C^{***} , RUF5-2 , YHR054W-A , CUP1-2 , RSC30 , YHR056W-A , CPR2^{**}
GPM17i23	RSM23[*] , CWC23 , SOH1 , SCS3 , MET13 , MON1 , RPS2 , YGL123C-A , NAB2 , GPG1 , PRP43^{***}
GPM17m07	YAR009C[*] , YAR010C , τPHK^{Ala}_{UGC} , BUD14 , ADE1 , KIN3 , CDC15^{**}
GPM1102	PSF1^{***} , RAD61 , YDR015C , DAD1 , KCS1^{***}
GPM21c11	τPHK^{Trp}_{CCA} , YKL071W , YKL070W , YKL069W , τPHK^{Val}_{AAC} , YKL068W-A , NUP100[*]
GPM21j14	мяPHK19[*] , POP1 , ADE12 , ALG9 , MGS1 , YNL217W , RAP1[*]
GPM23o10	DNF2^{**} , YDR094W , YDR095C , GIS1 , MSH6 , GRX3 , τPHK^{Gln}_{UUG}
GPM25i04	NUP120^{***} , YKL056C , OAR1 , DEF1 , MDM35 , YKL053W , ASK1^{***}
GPM28b10	DDC1^{**} , RSR1 , PRM3 , YPL191C , NAB3 , YPL189C-A , GUP2 , POS5
GPM29j24	SMF2^{**} , YHR050W-A , COX6 , CIC1 , RUF5-1 , YHR052W-A , CUP1-1 , YHR054C , RUF5-2^{***} , YHR054W-A , CUP1-2^{***}
GPM2i04	YOR356W^{***} , GRD19 , HAP5 , VTS1 , PDE2 , PRT1 , PRE10 , PIP2 , YOR364W , YOR365C^{***} , YOR366W
GPM31d16	ABC1^{***} , τPHK^{Trp}_{CCA} , YGL118C , YGL117W , CDC20 , SNF4 , YGL114W[*]
GPM4g14	BUD14[*] , ADE1 , KIN3 , CDC15 , YAR019W-A , PAU7 , YAR023C^{***}
GPM4p01	SMY1^{**} , DHR2 , YKL077W , PSY1 , YKL075C , MUD2 , LHS1 , STB6 , τPHK^{Trp}_{CCA}
GPM7c22	SAC3 ^{**} , SSY1[*] , YDR161W , NBP2 , CWC15 , SEC1 , TRM82[*]
GPM7i21	GLT1[*] , UGA3 , UGX2 , SFA1 , NRPL , FAP7 , CDC36[*]

* У гена отсутствует 3' последовательность.
** У гена отсутствует 5' последовательность.
*** Ген интактен, но отсутствуют некоторые регуляторные элементы.
¹ Жирным шрифтом выделены гены, которые потенциально могут вызывать нонсенс-супрессию при сверхэкспрессии.
² Подчеркиванием выделены гены, кодирующие потенциально амилоидогенные белки.

2-4-1-1-Д931, который в отличие от штамма 1-Д933 не растет на среде без урацила, так как не содержит плазмид с маркерным геном *URA3*. На следующем этапе отбирали по 100 трансформантов каждой плазмидой на селективной среде и трехкратно пассировали на среде с добавлением 150 μM CuSO₄ для активации промотора *CUP1*. Активация промотора обеспечивает сверхэкспрессию исследуемых генов. Затем трансформанты методом отпечатков переносили на селективные среды без аденина и урацила, а также без триптофана и урацила с добавлением 150 мкM CuSO₄. Проведенный анализ показал, что трансформация плазмидами, содержащими гены *DEF1*, *NRP1* и *PIN3*, не влияет на нонсенс-супрессию в штамме 2-4-1-1-Д931 (рис. 1, А). Трансформация плазмидами, несущими гены *NAB2*, *NAB3* и *VTS1*, вызывает нонсенс-супрессию на селективной среде без аденина, однако омни-

потентную нонсенс-супрессию, то есть рост на селективных средах без аденина и триптофана, вызывает только сверхэкспрессия *VTS1*. Ранее было показано, что *Nab2*, *Nab3* и *Vts1*, слитые с белком GFP, при сверхпродукции образуют флуоресцентные агрегаты (Alberti et al., 2009). В связи с этим особенный интерес представляет анализ фенотипа трансформантов после потери плазмид для сверхэкспрессии данных генов. В случае если образуемые белками *Nab2*, *Nab3* и *Vts1* агрегаты обладают инфекционными свойствами и нонсенс-супрессия вызвана именно инактивацией белка в агрегатах, следовало бы ожидать сохранения нонсенс-супрессорного фенотипа у части клонов после потери плазмид для сверхэкспрессии. Если агрегаты являются неинфекционными, потеря плазмид для сверхэкспрессии будет закономерно приводить к элиминации нонсенс-супрессии во всех клонах. Проведенные эк-

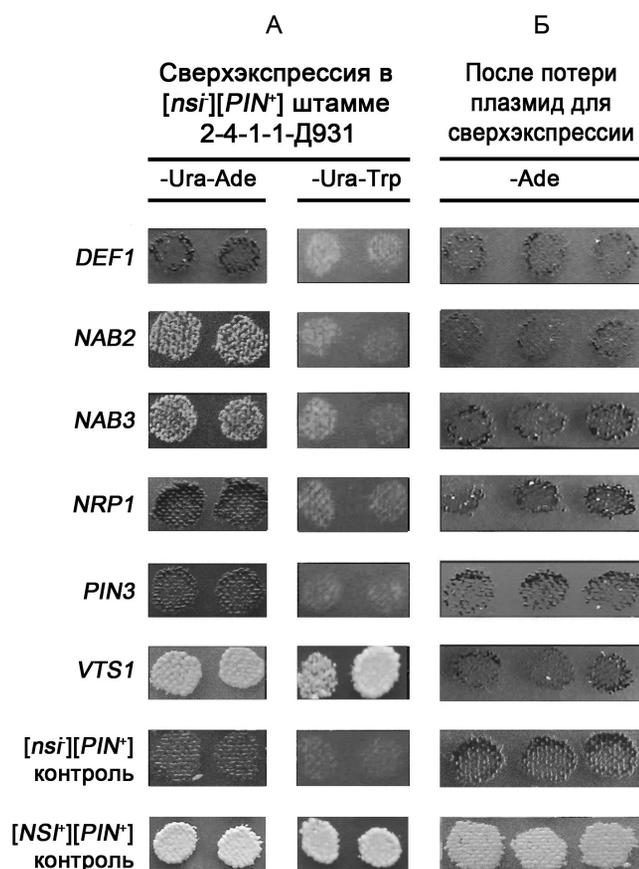


Рис. 1. Эффекты сверхэкспрессии выявленных в ходе скрининга генов, кодирующих NQ-обогащенные белки.

А. Анализ нонсенс-супрессии на средах $-Ura-Ade$ и $-Ura-Trp$ с добавлением $150 \mu M CuSO_4$ на фоне сверхэкспрессии генов *DEF1*, *NAB2*, *NAB3*, *NRP1*, *PIN3* и *VTS1* в штамме 2-4-1-1-Д931 [*nsi*⁻][*PIN*⁺].

Б. Анализ нонсенс-супрессии на селективной среде без аденина со $150 \mu M CuSO_4$ после потери плазмид для сверхэкспрессии исследуемых генов. Фотография сделана через четыре дня инкубации на селективной среде

сперименты показали, что после потери плазмид для сверхэкспрессии генов *NAB2*, *NAB3* и *VTS1* дрожжи утрачивают супрессорный фенотип (рис. 1, Б).

Таким образом, гены *NAB2*, *NAB3* и *VTS1* опосредуют нонсенс-супрессию на генетическом фоне штамма 2-4-1-1-Д931.

ОБСУЖДЕНИЕ

Недавно обнаруженный нами прионоподобный детерминант [*NSI*⁺] вызывает нонсенс-супрессию только на фоне делеции *SUP35N*. На основании этого мы предположили, что делеция N-терминального домена белка Sup35 создает своеобразный провокационный генетический фон, который дает возможность для поиска новых генов и эпигенетических факторов, участвующих в

контроле нонсенс-супрессии. Мы использовали штамм, продуцирующий химерный белок A β -Sup35MC, как модельную систему для выявления генов, эффекты которых на нонсенс-супрессию не могут быть выявлены в штаммах, продуцирующих немодифицированный фактор терминации трансляции eRF3. В ходе скрининга было выявлено 22 фрагмента дрожжевого генома, содержащие суммарно 91 ген, увеличение числа копий которых вызывает нонсенс-супрессию. Для генов tPHK^{Trp}_{CCA}, содержащихся в клонах GPM14I17, GPM21c11, GPM31d16 и GPM4p01 супрессорная активность по отношению к кодону UGA была показана ранее (Ong et al., 1997). Введение гена *ADE1*, находящегося в составе клонов GPM17m07 и GPM4g14, также закономерно должно приводить к комплементации мутации *ade1-14*. Данных о супрессорной активности остальных выявленных нами генов ранее получено не было. В настоящей работе мы сосредоточили внимание на анализе эффектов сверхэкспрессии генов, кодирующих NQ-обогащенные белки, которые могут быть вовлечены как в генетический, так и в эпигенетический контроль супрессии. Проведенные исследования показывают, что нонсенс-супрессию на селективной среде без аденина вызывает сверхэкспрессия трех генов: *NAB2*, *NAB3* и *VTS1*.

Ген *VTS1* кодирует белок, вовлеченный в посттранскрипционную регуляцию мРНК, содержащих специфическую шпильку SRE (SMAUG Recognition Element), путем деградации (Aviv et al., 2003). Первоначально этот ген был идентифицирован как многокопийный супрессор мутаций *vti1-2*, которые приводили к дефектам и нарушению вакуолярного транспорта (Dilcher et al., 2001). Позднее было установлено, что Vts1 индуцирует деградацию SRE-содержащих РНК, путем деаденилирования, опосредованного комплексом Ccr4p-Pop2p-Not (Rendl et al., 2008). Эта система, получившая у *S. cerevisiae* название Vts1-mediated decay, является консервативной и представлена, например, у *Drosophila melanogaster* гомологом Vts1 белком Smaug (Aviv et al., 2003). Следует отметить, что компоненты систем деградации мРНК ранее уже выявлялись в качестве супрессоров нонсенс-аллелей. Например, мутантные аллели генов *UPF1*, *UPF2* и *UPF3*, участвующие в системе деградации мРНК, опосредованной преждевременными стоп-кодонами, были идентифицированы в качестве слабых рецессивных омнипотентных аллосупрессоров мутаций в гене tPHK лейцина (Ono et al., 2005).

Следует остановиться на возможных механизмах влияния Vts1 на нонсенс-супрессию. Потенциально она может быть связана с различными процессами, однако, учитывая омнипотентность, наиболее логичным представляется связать эту супрессию либо с нарушениями трансляционного аппарата, либо с нонсенс-опосредованной деградацией мРНК. По данным "Saccharomyces Genome Database" (<http://www.yeastgenome.org/>), Vts1 взаимодействует с продуктами 22-х генов. Сре-

ди всех генов, для которых показано взаимодействие с *VTS1*, ни один не кодирует компонент системы нонсенс-опосредованной деградации мРНК. Вместе с тем показано, что *Vts1* взаимодействует с белком *Stm1* (Krogan et al., 2006), который опосредует взаимодействие фактора элонгации трансляции eEF3 с рибосомой (Van Dyke et al., 2009). Изменение уровня экспрессии *STM1* приводит к нарушениям трансляции, повышенной чувствительности штаммов к трансляционному ингибитору анизомицину, снижению афинности eEF3 к рибосоме (Van Dyke et al., 2009). На основании этих данных представляется возможным предположить, что нонсенс-супрессия, опосредованная *VTS1*, может быть вызвана частичным нарушением процесса трансляции, связанным с взаимодействием между *Vts1* и продуктом гена *STM1*.

Белок *Nab2* является компонентом системы экспорта мРНК из ядра и участвует в контроле полиаденилирования. Этот белок опосредует ядерный экспорт более 2000 мРНК (Fasken et al., 2008). Белок *Nab3* также является РНК-связывающим, участвуя в терминеции транскрипции с промоторов РНК-полимеразы II (Conrad et al., 2000).

Сложно выдвинуть гипотезу относительно молекулярной природы нонсенс-супрессии, наблюдаемой при сверхэкспрессии *NAB2* и *NAB3*, так как эти гены участвуют в регуляции целого ряда клеточных процессов. Вместе с тем следует обратить внимание на то, что эти гены никогда ранее не выявлялись в качестве супрессоров нонсенс-мутаций в штаммах, продуцирующих немодифицированный белок *Sup35*. Этот факт заставляет задуматься о возможной функциональной роли N-терминального домена *Sup35*. Показано, что делеция *SUP35N* не вызывает снижения эффективности терминеции трансляции (Ugakov et al., 2006), однако может влиять на ряд других клеточных процессов, в том числе деградацию матричных РНК (Hosoda et al., 2003). В связи с этим можно предположить, что на фоне делеции *SUP35N* происходит изменение количества определенных мРНК в клетке. Этот эффект не имеет сам по себе фенотипического проявления, но служит фоном, на котором *NAB2*, *NAB3*, *VTS1* и *[NSI+]* вызывают нонсенс-супрессию. Таким образом, делеция *SUP35N* может быть рассмотрена в качестве криптического супрессора, а *NAB2*, *NAB3*, *VTS1* и *[NSI+]* — в качестве аллосупрессоров, которые сами по себе также не вызывают нонсенс-супрессию. Данный пример является иллюстрацией того, как изменения генетического фона вызывают проявления взаимодействий генов, не детектируемые в норме. Аналогичная ситуация наблюдается в случае детерминанта *[ISP+]*, который является антисупрессором на фоне комбинации супрессорной мутации *sup35-25* и криптической мутации *sup45-400* (Rogoza et al., 2010).

Детерминант *[NSI+]* вызывает omnipotentную нонсенс-супрессию в штаммах с делецией *SUP35N* (Saifitdinova et al., 2010). В связи с этим следовало бы ожидать, что при сверхэкспрессии структурного гена

[NSI+] в штамме 1-Д933 будет с повышенной частотой происходить индукция этого детерминанта, которая будет иметь фенотипическое проявление. Выявленные в ходе настоящего исследования гены *NAB2*, *NAB3* и *VTS1* кодируют потенциально амилоидогенные белки (Alberti et al., 2009), которые могут быть рассмотрены в качестве кандидатов на роль новых дрожжевых прионов. Проведенный нами анализ показывает, что нонсенс-супрессия, наблюдаемая при сверхэкспрессии выявленных генов, не сохраняется после потери плазмид для сверхэкспрессии. Это свидетельствует в пользу того, что либо белковые агрегаты, образующиеся при сверхпродукции *Nab2*, *Nab3* и *Vts1*, не обладают инфекционными свойствами, либо наблюдаемая нонсенс-супрессия не связана с агрегацией этих белков. Проведенные эксперименты показывают, что ни один из данных генов не является детерминантом *[NSI+]*. Нельзя исключать, что детерминант *[NSI+]* может находиться в составе других последовательностей, выявленных в ходе скрининга.

В настоящем исследовании в масштабах всего генома охарактеризован комплекс генов, сверхэкспрессия которых опосредует нонсенс-супрессию на фоне делеции последовательности, кодирующей N-терминальный домен белка *Sup35*. Впервые показано, что гены *NAB2*, *NAB3* и *VTS1*, кодирующие NQ-обогащенные белки, участвуют в контроле нонсенс-супрессии у дрожжей *S. cerevisiae*.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят В. В. Игнатову, А. А. Рубеля и В. И. Коржову за техническую помощь в проведении экспериментов. Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ 10-04-00395-а, программы Президиума РАН «Фундаментальные науки — медицине» 08-12, ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009—2013 годы (Госконтракт № П1354) и тематического плана НИР СПбГУ № 1.37.115.2011. Работа поддержана грантом Правительства Санкт-Петербурга для студентов, аспирантов вузов и академических институтов, расположенных на территории Санкт-Петербурга № 2.6/16-05/291-А.

Литература

1. Захаров И. А., Кожин С. А., Кожина Т. Н., Фёдорова И. В., 1984. Сборник методик по генетике дрожжей-сахаромицетов // Л.: Наука., 143 с.
2. Инге-Вечтомов С. Г., 1964. Реверсии к прототрофности у дрожжей, нуждающихся в аденине // Вестник ЛГУ. Сер. 2. Вып 9. С. 112—117.
3. Рубель А. А., Сайфитдинова А. Ф., Лада А. Г. и др., 2008. Дрожжевой шаперон Hsp104 регулирует экспрессию генов на посттранскрипционном уровне // Мол. биол. Т. 42. № 1. С. 123—130.

4. Alberti S., Halfmann R., King O. et al., 2009. A systematic survey identifies prions and illuminates sequence features of prionogenic proteins // *Cell*. Vol. 137. P. 146–158.
5. Aviv T., Lin Z., Lau S. et al., 2003. The RNA-binding SAM domain of Smaug defines a new family of post-transcriptional regulators // *Nat. Struct. Biol.* Vol. 10. P. 614–621.
6. Brown J. C., Lindquist S., 2009. A heritable switch in carbon source utilization driven by an unusual yeast prion // *Genes. Dev.* Vol. 23. P. 2320–2332.
7. Conrad N. K., Wilson S. M., Steinmetz E. J., 2000. A yeast heterogeneous nuclear ribonucleoprotein complex associated with RNA polymerase II // *Genetics*. Vol. 154. P. 557–571.
8. Derkatch I. L., Bradley M. E., Zhou P. et al., 1997. Genetic and environmental factors affecting the de novo appearance of the [PSI⁺] prion in *Saccharomyces cerevisiae* // *Genetics*. Vol. 147. P. 507–519.
9. Dilcher M., Kohler B., von Mollard G. F., 2001. Genetic interactions with the yeast Q-SNARE VTI1 reveal novel functions for the R-SNARE YKT6 // *J. Biol. Chem.* Vol. 276. P. 34537–34544.
10. Du Z., Park K. W., Yu H. et al., 2008. Newly identified prion linked to the chromatin-remodeling factor Swi1 in *Saccharomyces cerevisiae* // *Nat. Genet.* Vol. 40. P. 460–465.
11. Fasken M. B., Stewart M., Corbett A. H., 2008. Functional significance of the interaction between the mRNA-binding protein, Nab2, and the nuclear pore-associated protein, Mlp1, in mRNA export // *J. Biol. Chem.* Vol. 283. P. 27130–27143.
12. Hanahan D., 1985. DNA Cloning: A Practical Approach // IRL Press, 109 p.
13. Harrison P. M., Gerstein M., 2003. A method to assess compositional bias in biological sequences and its application to prion-like glutamine/asparagine-rich domains in eukaryotic proteomes // *Genome Biology*. Vol. 4. E. 40.
14. Hosoda N., Kobayashi T., Uchida N. et al., 2003. Translation termination factor eRF3 mediates mRNA decay through the regulation of deadenylation // *J. Biol. Chem.* Vol. 278. P. 38287–38291.
15. Ivanov M. S., Ratchenko E. A., Mironova L. N., 2010. The protein complex Ppz1p/Hal3p and nonsense suppression efficiency in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* // *Mol. Biol. (Mosk.)* Vol. 44. P. 1018–1026.
16. Kaiser C., Michaelis S., Mitchell A., 1994. Methods in yeast genetics // NY: Cold Spring Harbor Lab. Press, 364 p.
17. Krogan N. J., Cagney G., Yu H. et al., 2006. Global landscape of protein complexes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* // *Nature*. Vol. 440. P. 637–643.
18. Ong W., Ibrahim M., Town M., Johnson J., 1997. Functional differences among the six *Saccharomyces cerevisiae* tRNATrp genes // *Yeast*. Vol. 13. P. 1357–1362.
19. Ono B., Yoshida R., Kamiya K., Sugimoto T., 2005. Suppression of termination mutations caused by defects of the NMD machinery in *Saccharomyces cerevisiae* // *Genes Genet. Syst.* Vol. 80. P. 311–316.
20. Osheroovich L. Z., Weissman J. S., 2001. Multiple Gln/Asn-rich prion domains confer susceptibility to induction of the yeast [PSI⁺] prion // *Cell*. Vol. 106. P. 183–194.
21. Patel B. K., Gavin-Smyth J., Liebman S. W., 2009. The yeast global transcriptional co-repressor protein Cyc8 can propagate as a prion // *Nat. Cell. Biol.* Vol. 11. P. 344–349.
22. Rendl L., Bieman M., Smibert C., 2008. *S. cerevisiae* Vts1p induces deadenylation-dependent transcript degradation and interacts with the Ccr4p-Pop2p-Not deadenylase complex // *RNA*. Vol. 14. P. 1328–1336.
23. Roberts B. T., Wickner R. B., 2003. Heritable activity: a prion that propagates by covalent autoactivation // *Genes. Dev.* Vol. 17. P. 2083–2087.
24. Rogoza T., Goginashvili A., Rodionova S. et al., 2010. Non-Mendelian determinant [ISP⁺] in yeast is a nuclear-residing prion form of the global transcriptional regulator Sfp1 // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* Vol. 107. P. 10573–10577.
25. Saifitdinova A. F., Nizhnikov A. A., Lada A. G. et al., 2010. [NSI⁺]: a novel non-Mendelian suppressor determinant in *Saccharomyces cerevisiae* // *Curr. Genet.* Vol. 56. P. 467–478.
26. Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T., 1989. Molecular cloning. A laboratory manual // N. Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press., 1626 p.
27. Serio T. R., Cashikar A. G., Kowal A. et al., 2000. Nucleated conformational conversion and the replication of conformational information by a prion determinant // *Science*. Vol. 289. P. 1317–1321.
28. Sherman F., Fink G. R., Hancks J. B., 1986. Methods in yeast genetics // N. Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press., 367 p.
29. Urakov V. N., Valouev I. A., Kochneva-Peroukhova N. V. et al., 2006. N-terminal region of *Saccharomyces cerevisiae* eRF3 is essential for the functioning of the eRF1/eRF3 complex beyond translation termination // *BMC. Mol. Biol.* Vol. 7. E. 34.
30. Van Dyke N., Pickering Brian F., Van Dyke M. W., 2009. Stm1p alters the ribosome association of eukaryotic elongation factor 3 and affects translation elongation // *Nucl. Acids Res.* Vol. 37. P. 6116–6125.
31. Weiss W. A., Edelman I., Culbertson M. R., Friedberg E. C., 1987. Physiological levels of normal tRNA(CAGGln) can effect partial suppression of amber mutations in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol. 84. P. 8031–8034.
32. Wickner R. B., 1994. [URE3] as an altered Ure2 protein: evidence for a prion analog in *Saccharomyces cerevisiae* // *Science*. Vol. 264. P. 566–569.

33. Yang W., Yang H., Tien P., 2006. In vitro self-propagation of recombinant PrP^{Sc}-like conformation generated in the yeast cytoplasm // FEBS Lett. Vol. 580. P. 4231–4235.
34. Zhouravleva G., Frolova L., Le Goff X. et al., 1995. Termination of translation in eukaryotes is governed by two interacting polypeptide chain release factors, eRF1 and eRF3 // EMBO J. Vol. 14. P. 4065–4072.

**SEARCH FOR GENES ENCODING POTENTIALLY
AMYLOIDOGENIC PROTEINS INVOLVED
IN REGULATION OF NONSENSE-SUPPRESSION
IN *SACCHAROMYCES CEREVISIAE***

Nizhnikov A. A., Magomedova Z. M., Inge-Vechtomov S. G.
Saifitdinova A. F., Galkin A. P.

✿ **SUMMARY:** Previously, the deletion of *SUP35N* has been shown to create the genetic background for identification of the novel genes and epigenetic determinants controlling the nonsense-suppression. Here, using a genomic overexpression screen, we have found several genes encoding potentially amyloidogenic proteins, whose overexpression affects the suppressor phenotype in the strain producing the chimeric protein A β -Sup35MC on the background of the deletion of *SUP35* gene encoding releasing factor eRF3. It has been demonstrated the *NAB2*, *NAB3* and *VTS1* genes participate in the regulation of nonsense-suppression in *S. cerevisiae*.

✿ **KEY WORDS:** prion; amyloid; yeast; *NAB2*; *NAB3*; *VTS1*; Sup35; [*NSI*+]; nonsense-suppression.

✿ Информация об авторах

Нижников Антон Александрович — м. н. с. СПбФ ИОГен РАН и СПбГУ, аспирант СПбГУ.199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7/9. E-mail: ant.nizhnikov@gmail.com.

Магомедова Залина Магомедовна — м. н. с. СПбГУ. 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7/9. E-mail: zalina.mag@gmail.com.

Сайфитдинова Алсу Фаритовна — к. б. н., с. н. с. СПбГУ. 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7/9. E-mail: saifitdinova@mail.ru.

Инге-Вечтомов Сергей Георгиевич — акад. РАН, проф., д. б. н., зав. кафедрой генетики и селекции СПбГУ, директор СПбФ ИОГен РАН. 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7/9. E-mail: ingevectomov@gmail.com.

Галкин Алексей Петрович — к. б. н., зам. директора СПбФ ИОГен РАН, старший преподаватель СПбГУ. 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7/9. E-mail: apgalkin@mail.ru.

Nizhnikov Anton Aleksandrovich — researcher, Ph.D. student. Saint Petersburg state university. 7-9, Universitetskaya nab., St.Petersburg, 199034, Russia. E-mail: ant.nizhnikov@gmail.com.

Magomedova Zalina Magomedovna — researcher. Saint Petersburg state university. 7-9, Universitetskaya nab., St.Petersburg, 199034, Russia. E-mail: zalina.mag@gmail.com.

Saifitdinova Alsu Faritovna — Ph.D., senior researcher. Saint Petersburg state university. 7-9, Universitetskaya nab., St.Petersburg, 199034, Russia. E-mail: saifitdinova@mail.ru.

Inge-Vechtomov Sergey Georgievich — Academician of the RAS, D.Sc., Prof., Head of the Dep. of Genetics and Breeding Saint Petersburg state university. 7-9, Universitetskaya nab., St.Petersburg, 199034, Russia. Director of St. Petersburg Branch of N.I. Vavilov Institute of General Genetics of the RAS. 7-9, Universitetskaya nab., St.Petersburg, 199034, Russia. E-mail: ingevectomov@gmail.com.

Galkin Alexey Petrovich — Ph.D., associate professor of St. Petersburg State University deputy chief of St. Petersburg Branch of N. I. Vavilov Institute of General Genetics of the RAS. 7-9, Universitetskaya nab., St.Petersburg, 199034, Russia. E-mail: apgalkin@mail.ru.