

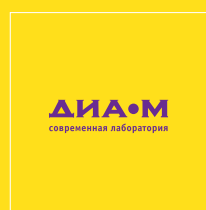
БАВИЛОВСКОЕ ОБЩЕСТВО ГЕНЕТИКОВ
И СЕЛЕКЦИОНЕРОВ (ВОГиС)



VI Съезд ВОГиС

и ассоциированные
генетические
симпозиумы

Ростов-на-Дону, 15.06 – 20.06.2014



Г Е Н Е Р А Л Ы Й С П О Н С О Р

ДНК. Также в докладе будет представлен анализ тканевой специфичности в распределении участков с повышенной долей дифференциально экспрессирующихся генов у мутанта *bra*. Помимо этого будут представлены результаты анализа тканевой специфичности разных субъединиц комплекса, проведенного на основе транскриптомной карты *Arabidopsis thaliana*. Работа поддержана грантом РФФИ № 12-04-01599-а.

С3-06. ГЛЮКАНОЗИЛТРАНСФЕРАЗА GAS1 – ПОТЕНЦИАЛЬНЫЙ КОНСТИТУТИВНЫЙ АМИЛОИД ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

*Рыжова Т.А.¹, Нижников А.А.^{1,2}, Галкин А.П.^{*1,2}*

¹Санкт-Петербургский государственный университет (Санкт-Петербург), Россия;

²Санкт-Петербургский филиал Института общей генетики РАН им. Н.И. Вавилова (Санкт-Петербург), Россия

*e-mail: apgalkin@mail.ru

Амилоиды представляют собой белковые полимеры, которые формируются за счет образования упорядоченных межмолекулярных бета-складчатых структур. Болезни, связанные с образованием патологических амилоидных агрегатов, принято называть «амилоидозами». К числу наиболее распространенных и, следовательно, социально значимых амилоидозов относятся болезни Хантингтона, Альцгеймера и Паркинсона, а также прионные заболевания. Вопросы о том, насколько широко представлены амилоиды у эукариот, и какова их биологическая значимость, по-прежнему, остаются открытыми. Работы последних лет свидетельствуют о том, что некоторые амилоиды могут выполнять жизненно-важные функции. Это относится, в частности, к амилоидам бактерий, формирующим биопленки, функциональному амилоиду млекопитающих PMEL и белку клеточной стенки дрожжей Bgl2. Есть основания полагать, что на сегодняшний день охарактеризована лишь небольшая доля от реально существующих патологических и конститутивных амилоидов. Мы разрабатывали и успешно апробировали универсальный метод протеомного скрининга и идентификации амилоидов, основанный на их необычно высокой устойчивости к ионным детергентам, что является универсальной характеристикой амилоидных полимеров. Метод заключается в выделении фракции детергент-устойчивых белковых полимеров, разделении флуоресцентно-меченых белков при помощи двумерного гель-электрофореза и их масс-спектрометрической идентификации. Помимо белков Sup35 и Rnq1, формирующих в дрожжевых клетках инфекционные амилоидные агрегаты (прионы), мы выделили и идентифицировали детергент-устойчивые полимеры, образованные белком Gas1. Белок Gas1 (1,3-глюканозилтрансфераза) участвует в образовании клеточной стенки и играет роль в регуляции транскрипционного сайленсинга. Интересно отметить, что Bgl2 (1,3-глюканаза) – другой основной белок клеточной стенки *S.cerevisiae* – способен формировать фибриллярные структуры амилоидного типа. Мы показали, что полимеры белка Gas1 устойчивы к обработке 3% саркозинатом натрия и 1% додецилсульфатом натрия. В этих условиях растворяются все другие белковые комплексы и полимеры, за исключением амилоидов. Химерный белок Gas1-GFP выявляется в дрожжевой клетке в виде флуоресцирующих агрегатов. В ходе дальнейшей работы предполагается проведение анализа локализации агрегатов Gas1-YFP со специфическим флуоресцентным зондом на амилоидные фибриллы “tioflavin-T” *in vivo*, и исследована динамика формирования фибрилл Gas1 *in vitro*. В целом, полученные нами предварительные данные свидетельствуют, что белок Gas1 является новым конститутивным амилоидом дрожжей *S. cerevisiae*.

С3-07. ПРИОНИЗАЦИЯ БЕЛКА SFP1 РЕГУЛИРУЕТ ЭКСПРЕССИЮ ГЕНА SUP45 У ДРОЖЖЕЙ

Дроздова П.Б., Лушаева П.В., Рогоза Т.М., Радченко Э.А., Миронова Л.Н.*

Санкт-Петербургский государственный университет (Санкт-Петербург), Россия

*e-mail: drozdovapb@gmail.com

У дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* известно не менее 10 прионов – белков, способных к конформационному переходу при участии другой молекулы того же белка, и последующей сборке в агрегаты. Одним из таких прионов является [ISP⁺]. Этот детерминант обнаружен при изучении мутантов по гену SUP35 (eRF3). Такие клетки способны супрессировать нонсенс-мутации, что фенотипически проявляется как рост на селективной среде. При появлении в штамме приона [ISP⁺] рост на селективной среде прекращается, что говорит о повышении эффективности терминации трансляции. [ISP⁺] формируется белком Sfp1, транскрипционным фактором, активирующим гены биогенеза рибосом и рибосомных белков, однако прионизация Sfp1p не изменяет экспрессию этих генов. Влияние белка Sfp1 на терминацию трансляции может быть опосредовано изменением активности факторов терминации Sup35 (eRF3) и Sup45 (eRF1). Ранее при секвенировании геномной копии SUP45 в штаммах, в которых прион [ISP⁺] спонтанно возникает и стабильно поддерживается, обнаружена миссенс-мутация *sup45-400*. Введение в клетки дополнительной копии SUP45 дикого типа, но не аллели *sup45-400*, приводило к супрессорному фенотипу, т. е. маскировке проявления [ISP⁺]. Количество белка Sup45 в штамме [ISP⁺] снижено по сравнению со штаммом [*isp⁻*]; делеция *SFP1* вызывает даже более значительное снижение уровня Sup45p. Sfp1p является транскрипционным фактором, что позволяет предположить прямую транскрипционную регуляцию гена SUP45. Компьютерный анализ показал, что промоторная область гена SUP45 содержит последовательность, схожую (92.6%) с предсказанным сайтом связывания Sfp1p. Для проверки гипотезы о транскрипционной регуляции гена SUP45 белком Sfp1 создана плазмидная конструкция, несущая SUP45 под контролем промотора, в котором предполагаемый сайт связывания Sfp1p заменен другой последовательностью. Замена SUP45 дикого типа на SUP45 под контролем мутагенизированного промотора в штаммах дикого типа, не несущих прион, не вызывает нонсенс-супрессии. При сверхэкспрессии гена SFP1 в этих штаммах изменения уровня Sup45 не зарегистрировано. Таким образом, наличие связи между белком Sfp1 и фактором терминации трансляции Sup45 очевидно, но не объясняется прямой транскрипционной регуляцией. Поиск других механизмов является задачей нашей текущей работы. Секвенирование плазмид осуществляли сотрудники Ресурсного центра «Развитие молекулярных и клеточных технологий». Работа поддержана грантами НШ-5345.2012.4, РФФИ 11-04-00146а, МК-165.2012.4, НИР из средств СПбГУ 0.37.696.2013.

С3-08. ВЛИЯНИЕ НОНСЕНС-МУТАЦИЙ В ГЕНЕ SUP35 НА СВОЙСТВА ПРИОНА [PSI⁺] ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Трубицина Н.П., Бондарев С.А., Журавлева Г.А.*

Санкт-Петербургский государственный университет (Санкт-Петербург), Россия

*e-mail: studentka_tnp@mail.ru

Факторы терминации трансляции eRF1 (Sup45p) и eRF3 (Sup35p) в клетках дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* кодируются жизненно-важными генами SUP45 и SUP35, соответственно. Прионизация Sup35p, то есть накопление его в клетке в виде

нерастворимых амилоидных агрегатов, приводит к возникновению фактора $[PSI^+]$. Эффективность процесса терминации трансляции при этом снижается, что способствует нонсенс-супрессии. Данная работа посвящена анализу эффекта нонсенс-мутаций в гене *SUP35* (*sup35-n*) на поддержание приона $[PSI^+]$ в диплоидных клетках дрожжей. Изучаемые мутации приводят к появлению укороченных фрагментов Sup35p наряду с полно-размерным и обладают носенс-супрессорным фенотипом. Поскольку ранее была показана синтетическая летальность нонсенс-мутаций в гене *SUP45* (*sup45-n*) при сочетании с прионом $[PSI^+]$, мы ожидали аналогичных эффектов и для *sup35-n*. Для подтверждения этой гипотезы мы провели серию скрещиваний между $[PSI^+]$ штаммами с геном *SUP35* дикого типа и $[psi^-]$ штаммами с мутантными аллелями *sup35-21*, *sup35-74*, *sup35-218*, *sup35-240*. Во всех случаях были получены жизнеспособные диплоидные клетки. Поскольку отсутствие синтетической летальности могло быть связано с сохранением аллели *SUP35*, мы проанализировали частоты неселективной потери плазмид у диплоидов. Для штаммов с аллелями *sup35-74*, *sup35-240* мы показали статистически достоверное увеличение частоты потери плазмиды с *sup35-n*, что позволило нам предположить наличие синтетической летальности. Для оценки размера агрегатов в присутствии мутантных аллелей мы проводили полуденатурирующий электрофорез агрегатов Sup35p в агарозном геле. В случае *sup35-240* агрегаты Sup35p отсутствовали, что говорит о потере приона $[PSI^+]$. При *sup35-74*, *sup35-218* размер агрегатов был увеличен, а при *sup35-21* не отличался от дикого типа. Для проверки потери приона, мы заменили мутантные аллели на ген *SUP35* у диплоидов. В штамме с *sup35-240*, как и ожидалось, прион $[PSI^+]$ отсутствовал. В случае *sup35-74*, *sup35-218* нонсенс-супрессорный фенотип слабо проявлялся, что говорит о сохранении приона. Таким образом, мы пришли к выводу, что присутствие аллели *sup35-240* ведет к потере фактора $[PSI^+]$, а аллели *sup35-74* и *sup35-218* способствуют формированию более слабого варианта приона.

Работа получила финансовую поддержку Российского фонда фундаментальных исследований (13-04-0064) и программы Президиума Российской академии наук "Происхождение и эволюция гео-биологических систем", НИР СПбГУ (0.37.696.2013, 1.37.113.2011, 1.50.2218.2013), а также ресурсного центра «Развития молекулярных и клеточных технологий» СПбГУ.

С3-09. АЛЬТЕРНАТИВНЫЕ ВАРИАНТЫ ЭКСПРЕССИИ ЖИЗНЕННО ВАЖНОГО ГЕНА *SUP35* ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Борхсениус А.С.^{* 1}, **Рябинкова Н.А.**¹, **Шумегга А.Р.**¹, **Сопова Ю.В.**^{1,2}, **Инге-Веттомов С.Г.**^{1,2}

¹ Санкт-Петербургский государственный университет (Санкт-Петербург), Россия;

² СПб филиал ФГБВН Института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН (Санкт-Петербург), Россия

*e-mail: aborchsenius@yahoo.com

Жизненно важный ген *SUP35* дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* кодирует фактор терминации трансляции eRF3. Открытая рамка считывания этого гена содержит три кодона АТГ (АТГ₁, АТГ₁₂₄ и АТГ₂₅₄). Ранее было выявлено два транскрипта *SUP35*: основной, соответствующий полноразмерной рамке считывания, и минорный, соответствующий необходимому и достаточному для жизнеспособности 3'-концевому участку *SUP35*, начинающемуся с третьего кодона АТГ (АТГ₂₅₄). Однако функциональная роль минорного транскрипта *SUP35*, так же как и существование укороченных вариантов белка Sup35, синтезируемых с кодонов АУГ₁₂₄ или АУГ₂₅₄ к настоящему времени не были показаны. Подходом к решению вопроса, происходит ли

альтернативная трансляция мРНК *SUP35* с кодонов АУГ₁₂₄ или АУГ₂₅₄, может быть оценка жизнеспособности клеток дрожжей при инактивации стартового кодона АТГ₁ гена *SUP35*. В ходе работы мы использовали неизогенные гаплоидные штаммы дрожжей 19А-Д780, 8-7А-Д832 и а1-GT403, содержащие дизрупцию *SUP35* в хромосоме и аллель гена *SUP35* дикого типа на плазмиде pRS316-SUP35 ($[CEN SUP35^+ URA3]$). Влияние инактивации кодона АТГ₁ на жизнеспособность клеток дрожжей оценивали по способности замещать в этих штаммах плазмиду pRS316-SUP35 на плазмиду, несущую мутантную аллель *SUP35* с делецией АТГ₁ - *sup35-ATG₁Δ*. В штамме а1-GT403 замещение *SUP35^+* на *sup35-ATG₁Δ* было летальным. В штамме 19А-Д780 клетки, несущие *sup35-ATG₁Δ*, были также нежизнеспособны при выращивании на среде, содержащей глюкозу в качестве источника углерода, но росли на средах, содержащих вместо глюкозы галактозу или этанол. В штамме 8-7А-Д832 клетки, несущие *sup35-ATG₁Δ*, росли при любых исследованных условиях. В результате тетрадного анализа гибрида 19А-Д780 x 8-7А-Д832 мы показали, что способность мутантов *sup35-ATG₁Δ* к росту на глюкозе контролируется моногенно. Жизнеспособность мутантов *sup35-ATG₁Δ* может объясняться альтернативными вариантами трансляции мРНК *SUP35* с триплетов АУГ₁₂₄ или АУГ₂₅₄. Мы не выявили различий в жизнеспособности у мутантов *sup35-ATG₁Δ*, *TGG₂₅₄* по сравнению с таковой у мутантов *sup35-ATG₁Δ*. Замещение *SUP35^+* на *sup35-ATG₁Δ*, *AGG₁₂₄* приводило к летальности клеток дрожжей, следовательно, при инактивации стартового кодона АТГ₁ для инициации синтеза белка с матричной РНК гена *SUP35* необходим кодон АУГ₁₂₄. Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант 10-04-01054).

С3-10. ВЛИЯНИЕ АНЕУПОИДИИ НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ НОНСЕНС-СУПРЕССИИ ПРИ ЧАСТИЧНОЙ ИНАКТИВАЦИИ ТЕРМИНАЦИИ ТРАНСЛЯЦИИ У *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Задорский С.П.^{* 1,2}, **Андрейчук Д.Ю.**¹, **Сопова Ю.В.**^{1,2}

¹ ФГБОУ ВПО Санкт-Петербургский государственный университет (Санкт-Петербург), Россия;

² Санкт-Петербургский филиал ФГБВН Института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН (Санкт-Петербург), Россия

*e-mail: zadorsky@mail.ru

Жизненно важный ген *SUP35* дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* кодирует фактор терминации трансляции eRF3. Мутации в гене *SUP35* приводят к снижению эффективности терминации трансляции, что проявляется фенотипически как супрессия нонсенс-мутаций. На фоне мутаций *sup35* часто возникают вторичные генетические изменения, частично компенсирующие негативное влияние мутаций *sup35* на жизнеспособность. Ранее нами были получены трансгенные штаммы *S.cerevisiae* с замещением собственного гена *SUP35* гомологичным геном *Pichia methanolica*, обладавшие нонсенс-супрессорным фенотипом. Для одного из таких трансгенных штаммов, полученных на основе штамма 33Г-Д373, была характерна сниженная эффективность супрессии нонсенс-мутаций *ade1-14* (UGA), *his7-1* (UAA) и *lys9-A21* (UAA) по сравнению с изогенными трансгенными штаммами. Генетический детерминант, обуславливающий антисупрессорный эффект, был обозначен нами как *ASP⁺* (Δ ntisuppression to *SUP35* of *Pichia*). Были выявлены плеiotропные проявления *ASP⁺*, основным из которых является повышенная устойчивость к солям меди. Генетический анализ показал доминантное проявление *ASP⁺* и совместное наследование антисупрессорного фенотипа и устойчивости к меди. Детерминант *ASP⁺* метастабилен. Для него характерна потеря с небольшой час-