

На правах рукописи

АНДРЕЙЧУК ЮЛИЯ ВЯЧЕСЛАВОВНА

**ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ АМИЛОИДИЗАЦИИ БЕЛКОВ НА
СТАБИЛЬНОСТЬ ГЕНЕТИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА У ДРОЖЖЕЙ
*SACCHAROMYCES CEREVISIAE***

Научная специальность: 1.5.7 – генетика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание
ученой степени кандидата биологических наук

Москва, 2023 г.

Работа выполнена в лаборатории мутагенеза и генетической токсикологии Санкт-Петербургского филиала Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт общей генетики им. Н. И. Вавилова Российской академии наук.

Научный руководитель:

д. б. н., профессор, академик РАН
Инге-Вечтомов Сергей Георгиевич,
научный руководитель Санкт-Петербургского филиала Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт общей генетики им. Н. И. Вавилова Российской академии наук

Официальные оппоненты:

д.б.н., профессор,
Ким Александр Иннокентьевич,
профессор кафедры генетики биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова», г. Москва

д.б.н., Колтовая Наталия Алексеевна,
ведущий научный сотрудник лаборатории радиационной биологии Международной межправительственной организации Объединенный институт ядерных исследований, г. Дубна

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии Российской академии наук, г. Санкт-Петербург

Защита состоится «__» _____ 20__ г. в ____ часов на заседании диссертационного совета 24.1.088.01 в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт общей генетики им. Н. И. Вавилова Российской академии наук по адресу: 119991, Москва, ул. Губкина, 3.

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Института www.vigg.ru, тел. 8-499-135-14-31.

Автореферат разослан «__» _____ 20__ года.

Ученый секретарь диссертационного совета,

доктор биологических наук

Горячева Ирина Игоревна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Передача и реализация генетической информации в живых организмах осуществляется благодаря матричным процессам (репликация, транскрипция, трансляция) (Crick, 1958; 1970), однако в клетках параллельно протекают матричные процессы II рода, в ходе которых происходит передача информации о пространственной структуре белковой молекулы (амилоидогенез и прионогенез). При переходе в амилоидное состояние молекула белка меняет пространственную структуру (становится более обогащенной β -слоями и менее обогащенной α -спиралями) и приобретает способность передавать приобретенную конформацию другим молекулам белка с идентичной аминокислотной последовательностью. В амилоидной форме за счёт формирования межмолекулярных водородных связей белки образуют нерастворимые полимеры с особой упорядоченной структурой – амилоидные агрегаты. Прионы и амилоиды вызывают ряд неизлечимых заболеваний у человека и животных (см. Wickner et al., 2010).

Матричные процессы I и II рода протекают в клетках параллельно, а значит, неизбежно должны взаимодействовать между собой. О существовании такой взаимосвязи свидетельствует ряд данных. Многие прионы дрожжей являются факторами транскрипции или трансляции. Кроме того, к настоящему времени в литературе накопилось достаточно данных, указывающих на то, что амилоиды прямо или косвенно способны оказывать влияние на процессы, участвующие в поддержании стабильности генома (Андрейчук и др., 2020).

Из литературы известно, что при некоторых амилоидных заболеваниях в клетках пациентов возрастает частота различных типов изменений ДНК. Например, в мозге людей, страдавших при жизни болезнью Альцгеймера, обнаружены окислительные повреждения ДНК, одно- и двунитевые разрывы ДНК, повышена частота клеток с анеуплоидным и полиплоидным набором хромосом, повышена частота клеток с признаками нарушения клеточного цикла. Известно, что некоторые амилоидные белки могут связываться с компонентами цитоскелета, что, вероятно, может приводить к нарушению расхождения хромосом в митозе. Существуют данные, указывающие на связь амилоидогенеза с развитием раковых опухолей. Так, некоторые мутации в гене, кодирующем белок p53, приводят к появлению мутантных белков с амилоидными свойствами, что приводит к образованию рака у носителей такой мутации (Navalkar et al., 2021). Амилоидные свойства также показаны для белка Rad51, одного из ключевых ферментов, участвующих гомологичной рекомбинации и устранении двунитевых разрывов ДНК (Kachkin et al., 2022). Эти факты указывают на несомненную связь между механизмами поддержания стабильности генома и протеома.

Степень разработанности темы исследования. Несмотря на то, что сам факт взаимного влияния процессов мутагенеза и амилоидогенеза к настоящему времени получил экспериментальное подтверждение, механизмы, посредством которых может осуществляться влияние этих процессов друг на друга, а также их совместный вклад в контроль стабильности генома остаются невыясненными. Успешному решению этой задачи может способствовать тот

факт, что в отдельности механизмы мутагенеза и амилоидогенеза разработаны довольно глубоко, особенно на модели дрожжей *S. cerevisiae*. С использованием дрожжей-сахаромицетов были детально изучены пути репарации, репликации и рекомбинации ДНК, нарушения работы которых приводят к возникновению наследуемых генных, хромосомных и геномных мутаций, а также исследованы молекулярные механизмы мутагенного действия экзогенных химических и физических факторов. Благодаря обнаружению прионов у *S. cerevisiae*, представляющих собой цитоплазматические наследственные факторы белковой природы, были подробно исследованы молекулярные механизмы амилоидогенеза, выявлены генетические факторы, влияющие на эффективность прионизации, а также подробно изучена структура амилоидных агрегатов. Дрожжи используют в качестве модели для изучения амилоидов млекопитающих, а также для поиска потенциальных амилоидов у других организмов и антиамилоидных препаратов. Таким образом, дрожжи-сахаромицеты представляют собой удобный эукариотический модельный объект, позволяющий быстро и эффективно изучить принципиальные механизмы взаимного влияния клеточных систем, контролирующих стабильность генома и амилоидогенез.

Имеющийся сегодня методический и теоретический задел позволяет приступить к экспериментальному изучению взаимодействия амилоидогенеза и процессов, участвующих в поддержании стабильности генома.

Цель и задачи. Целью работы является изучение взаимодействия амилоидогенеза белка Sup35 и механизмов, участвующих в поддержании стабильности генетического материала у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*.

В соответствии с данной целью сформулированы следующие задачи:

1. Исследовать влияние прионов [*PSI*⁺] и [*PIN*⁺] на частоту возникновения генетических нарушений разных типов: генных, хромосомных и геномных мутаций.
2. Идентифицировать генетические изменения в штаммах с прионом [*PSI*⁺] и измененными параметрами мутагенеза.
3. Изучить влияние нарушений механизмов поддержания стабильности генома, индуцированных гидроксимочевинной, ингибитором синтеза предшественников ДНК, или делецией гена рекомбинационной репарации *RAD52* на частоту прионизации Sup35 в клетках *S. cerevisiae*.
4. Оценить частоту совместного возникновения приона [*PSI*⁺] и мутаций в гене *CAN1*.
5. Определить частоту возникновения штаммов с измененным уровнем мутагенеза среди клонов [*PSI*⁺], полученных *de novo*.

Научная новизна. Изучение взаимодействия процессов амилоидогенеза и процессов, участвующих в поддержании стабильности генома, находится на стадии накопления данных и формирования гипотез о возможных механизмах связи между нарушениями гомеостаза протеома и дестабилизации генома. Существует ряд работ, посвященных исследованию отдельных аспектов такого взаимодействия. Примеры таких работ приведены

в обзорах (Андрейчук и др., 2020 и Ainslie et al., 2021). Данная диссертационная работа направлена на исследование тех аспектов взаимодействия амилоидогенеза и мутагенеза, которые еще не были изучены, а также установления причинно-следственной связи между возникновением приона и генетических изменений в геноме дрожжей *S. cerevisiae*. В частности, неизвестно, каким образом прионы влияют на частоту различных генетических изменений и как нарушение работы систем, участвующих в поддержании стабильности генома, влияет на частоту возникновения приона.

Научно-практическая значимость. Результаты, полученные в данной работе, имеют значение как для фундаментальной науки, так и для практических исследований в области медицины. Изучение механизмов взаимодействия МП I и II рода необходимы в виду важности этой проблемы для глубокого понимания механизмов наследственной и модификационной изменчивости, а также механизмов развития целого ряда социально-значимых заболеваний. К числу наиболее актуальных проблем относится вопрос о механизмах взаимовлияния мутагенеза, изменений кариотипа (анеуплоидии) и амилоидогенеза в раковых клетках, и о совместном вкладе этих процессов в “эволюцию” раковых опухолей. Во всестороннем изучении нуждаются факторы, влияющие на дестабилизацию генома на фоне амилоидогенеза белков у пациентов с болезнью Альгеймера.

Методология и методы исследования. В представленной работе использовали подход, позволяющий выявить закономерности возникновения приона и генетических изменений в клетке дрожжей, для этого были применены методы, используемые для изучения прионогенеза (индукция прионогенеза, изгнание приона, флуоресцентная микроскопия, белковая трансформация клеток дрожжей), методы по учёту частоты возникновения приона и комбинация методов учёта частоты возникновения различных генетических изменений (альфа-тест в вариации «незаконной» гибридизации, учет частоты прямых мутаций в гене *CANI*, а также разработанный в рамках представленной работы метод учета частоты появления полиплоидов). Для идентификации генетических изменений в геноме применили следующие методы: тетрадный анализ, проточная цитометрия и полногеномное секвенирование. Для оценки достоверности результатов использовали стандартные статистические методы.

Положения, выносимые на защиту:

1. Частота одновременного возникновения приона [PSI^+] и генетических изменений в клетке дрожжей *S. cerevisiae* превышает теоретически ожидаемую частоту в случае их независимого появления.
2. Генетические изменения, возникающие в клетке дрожжей *S. cerevisiae* одновременно с прионом [PSI^+], представляют собой мутации разных типов: генные, хромосомные и геномные мутации.
3. Наличие в клетке дрожжей *S. cerevisiae* стабильных вариантов приона [PSI^+], наследуемых в ходе митотических делений, не влияет на стабильность генома.

4. Дестабилизация генома, вызванная нарушением рекомбинационной репарации посредством инактивации гена *RAD52* или воздействием на клетки гидроксимочевинной, не приводит к возрастанию частоты прионизации Sup35.
5. Совместное появление приона [*PSI⁺*] и изменений генома в клетке, вероятно, опосредовано действием неизвестного фактора (предположительно окислительного стресса), оказывающего влияние одновременно на геном и протеом клетки и стимулирующего таким образом мутагенез и амилоидогенез.

Личный вклад автора. Автор принимал непосредственное участие во всех основных этапах выполнения работы, включая планирование и выполнение экспериментов, обработку и интерпретацию результатов, написание тезисов докладов и статей. Полногеномное секвенирование геномов дрожжей было выполнено в ресурсном центре СПбГУ «Развитие молекулярных и клеточных технологий», биоинформатический анализ данных секвенирования следующего поколения осуществила Анна Сергеевна Жук. Работа была выполнена при участии сотрудников и студентов лаборатории мутагенеза и генетической токсикологии СПб филиала ИОГен РАН: Степченковой Елены Игоревны, Задорского Сергея Павловича, Жук Анны Сергеевны, Тараховской Елены Роллановны и Богдановой Дарьи Николаевны. Работа была поддержана грантами РФФИ 20-04-00663-а и РФФИ 20-34-90040-Аспиранты.

Степень достоверности и апробация результатов. Результаты, полученные в ходе выполнения диссертационной работы, были представлены на 5 всероссийских и международных конференциях: Международный конгресс «VII съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров, посвященный 100-летию кафедры генетики СПбГУ, и ассоциированные симпозиумы», 18-22 июня 2019 г., г. Санкт-Петербург; VIII Всероссийский молодежный научный форум «Open Science 2021», 17-19 ноября 2021 г., г. Гатчина; Всероссийская конференция по естественным и гуманитарным наукам с международным участием «Наука СПбГУ – 2021», 28 декабря 2021 г., г. Санкт-Петербург; Всероссийская конференция по естественным и гуманитарным наукам с международным участием «Наука СПбГУ – 2022», 21 ноября 2022 г., г. Санкт-Петербург; 31st International conference on yeast genetics and molecular biology (ICYGMB31), 20-25 августа 2023 г., г. Флоренция, Италия.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 9 печатных работ, из них статей, опубликованных в рецензируемых изданиях, отвечающих требованиям ВАК – 4, в иностранных изданиях – 1, тезисов докладов и материалов конференций – 4.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 113 страницах и включает следующие разделы: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты», «Обсуждение», «Заключение», «Выводы», «Список литературы». В тексте представлено 17 таблиц и 15 рисунков. Список литературы содержит 261 источника.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.

Глава «ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ» содержит 9 разделов: «Матричный принцип в биологии. Матрицы I и II рода (линейные и пространственные матрицы)», «Амилоиды и прионы», «Функциональные амилоиды», «Объекты и модели изучения взаимодействия амилоидогенеза и процессов, участвующих в контроле стабильности генома», «Амилоиды и эффективность репарации», «Амилоиды и геномные мутации», «Роль амилоидогенеза в канцерогенезе», «Подходы, применяемые для решения задачи исследования».

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Штаммы *S. cerevisiae*, использованные в работе. В данной работе были использованы изогенные штаммы [*PIN*⁺] [*PSI*⁺] и [*PIN*⁺] [*psi*⁻], полученные на основе базового штамма K5-35B-D924-*ade1-14* (*MATa ura3Δ leu2Δ met15Δ lys5::kanMX adel-14 [pin⁻] [psi⁻]*). На первом этапе на основе штамма [*pin*⁻] [*psi*⁻] с помощью белковой трансформации были получены 2 клона [*PIN*⁺] [*psi*⁻], далее в этих клонах индуцировали образование приона [*PSI*⁺] (штамм [*PIN*⁺] [*PSI*⁺] - 2-3 в процессе хранения изменил тип спаривания $\alpha \rightarrow n/m$ и стал нескрещивающимся). Все штаммы [*PIN*⁺] [*PSI*⁺], использованные в данной работе, были получены на основе клона 2 [*PIN*⁺] [*psi*⁻]. Также в работе был использован штамм 33Г-Д373 (*MATa pheA10 ade2-144,717 his7-1 lys9-A21 trp1-289 ura3-52 [PIN⁺] [psi⁻]*) и изогенные ему штаммы [*PIN*⁺] [*PSI*⁺]: 33Г-Д373-61, 33Г-Д373-72 и 33Г-Д373-74. В работе были использованы следующие штаммы [*PSI*⁺], любезно предоставленные сотрудником кафедры генетики и биотехнологии СПбГУ Бондаревым С. А.: 22D168-2, 311, W33, WWC, 3W1, 312, 13D, полученные на основе штамма 74-D694 (*MATa ade1-14(UGA) trp1-289 his3-Δ200 ura3-52 leu2-3,112 [PIN⁺] [psi⁻]*). Перечисленные штаммы были использованы в качестве доноров приона при белковой трансформации. В качестве партнера для «незаконной» гибридизации был использован автодиплоидный штамм Д926 (*MATa // MATa leu2Δ // leu2Δ lys2Δ // lys2Δ ura3Δ // ura3Δ his4Δ // his4Δ thr4Δ // thr4Δ*). Штамм PLY122 *MATa leu2-3,112 lys2-Δ201 ura3-52* использовали в качестве партнера а-типа спаривания для получения гибридов при проведении тетрадного анализа. Для определения типа спаривания были использованы штаммы-тестеры 2Г-П2345 (*MATa his5*) и 78А-П2345 (*MATa his5*). Штамм с дефектом системы рекомбинационной репарации был получен с помощью дизрупции гена *rad52::LEU2*, для этого штамм K5-35B-D924-*ade1-14 [PIN⁺] [psi⁻]* был трансформирован плазмидой рJH181, содержащей ген *LEU2*, фланкированный с обеих сторон гомологичными последовательностями к гену *RAD52*. Плазмиду рJH181, любезно предоставленную проф. Ю.И. Павловым (Университет штата Небраска, США) перед трансформацией гидролизировали эндонуклеазой рестрикции BamH1, трансформантов отбирали по способности расти на среде без лейцина.

Среды и условия культивирования. Дрожжи выращивали на полных средах: жидкой и твердой среде YEPD (Захаров и др., 1984; Sherman et al., 1986), минимальной среде MD (минимальная дрожжевая среда по рецепту

Yeast Nitrogen Base), содержащей необходимые аминокислоты, азотистые основания, витамины и микроэлементы (Захаров и др., 1984). Среду для отбора гибридов готовили на основе MD с добавлением аминокислот и азотистых оснований, необходимых для роста гибридов. Среду для учета частоты мутирования в гене *CANI*, готовили на основе MD с добавлением сульфата L-канаванина фирмы «Sigma» в концентрации 40 мг/л. Среда для индукции прионизации Sup35 была приготовлена на основе MD, содержащей необходимые аминокислоты, азотистые основания и 2% галактозы в качестве источника углерода. Среда для изгнания приона была приготовлена на основе твердой YEPD с добавлением гидроксигуанидингидрохлорида (ГГХ) в концентрации 0,5 г/л. Для исследования влияния дисбаланса пула дНТФ на частоту прионизации Sup35 в среду для индукции прионизации добавляли гидроксимочевину (ГМ) фирмы «Sigma» в концентрации 100 mM. Для приготовления твердых сред использовали агар фирм «Sigma» или «Difco» в концентрации 20 г/л. Дрожжи выращивали при температуре 30°C.

Плазмиды. Все плазмиды, использованные в данной работе, за исключением плазмиды pJH181 и pEMBL-ΔBal2, были получены на основе вектора pRS316. Индукцию прионизации белка Sup35 проводили с помощью плазмиды pGAL1-SUP35 (Derkatch et al., 1996), индукцию прионизации Sup35 в штамме [*pin*⁻] - с помощью плазмиды pEMBL-ΔBal2 (Derkatch et al., 2000), изгнание приона [*PSI*⁺] - с помощью плазмиды pGAL1-HSP104 (Lindquist and Kim, 1996), для визуализации агрегатов приона [*PSI*⁺] использовали плазмиду pCUP1-SUP35NM-YFP (Derkatch et al., 2004). Плазмиду pJH181 использовали для получения штамма с дизрупцией гена *RAD52* (Zhuk et al., 2023).

Индукция прионизации Sup35. Штамм [*PIN*⁺] [*psi*⁻] трансформировали плазмидой pGAL1-SUP35, полученных трансформантов выращивали на твердой селективной среде, содержащей 2% галактозы для индукции сверхэкспрессии гена *SUP35*, затем клетки перепечатывали на среду без аденина. Через 5-7 дней отбирали выросшие на отпечатке колонии. Колонии, несущие прион [*PSI*⁺], отбирали по признаку неспособности расти на среде без аденина после инкубации на среде с ГГХ.

Трансформация клеток дрожжей. Трансформацию клеток дрожжей плазмидной ДНК проводили по стандартной методике (Rose et al., 1990), Получение лизата из клеток дрожжей, содержащих прион [*PSI*⁺], и последующую трансформацию клеток дрожжей полученным лизатом (белковая трансформация) проводили описанным методом (Tanaka, 2010).

Метод учета частоты прионизации Sup35. Индукцию прионизации проводили в штаммах [*PIN*⁺] [*psi*⁻], несущих плазмиду pGAL1-SUP35. Штаммы инкубировали 2 суток в минимальной жидкой среде, содержащей 2% галактозы и все необходимые для роста ауксотрофного штамма добавки, за исключением урацила. После 2 дней выращивания суспензию клеток высевали на среду без аденина для отбора колоний, в которых произошла прионизация Sup35. Частоту прионизации определяли как описано (Tyedmers et al., 2008).

Альфа-тест. При проведении альфа-теста два штамма одинакового типа спаривания α (тестируемый штамм и штамм-партнер для гибридизации D926)

высевают на селективную среду для отбора гибридов, такие гибриды называют «незаконными», поскольку в норме скрещиваются только клетки противоположных типов спаривания α и α , «незаконные» гибриды возникают, когда одна из родительских клеток переключает тип спаривания $\alpha \rightarrow a$ (Степченкова и др., 2009; Жук и др., 2013; Zhuk et al., 2023). Переключение типа спаривания $\alpha \rightarrow a$ происходит в результате генетических изменений, затрагивающих локус типа спаривания *MAT α* , находящийся в правом плече хромосомы III. III хромосома также содержит маркеры *HIS4* (левое плечо) и *THR4* (правое плечо). Благодаря использованию штаммов дрожжей с маркированной хромосомой III, альфа-тест позволяет отдельно учитывать частоту различных генетических событий, приводящих к переключению типа спаривания $\alpha \rightarrow a$. Генетические события, учитываемые в альфа-тесте, а также фенотип «незаконных» гибридов, образовавшихся в результате этих событий, перечислены в таблице 1.

Таблица 1 – События, учитываемые в α -тесте, и фенотип «незаконных» гибридов

Генетическое событие	Фенотип «незаконного» гибрида
Конверсия кассеты <i>HMRa</i> в локус <i>MATα</i>	n/m His ⁺ Thr ⁺
Реципрокная рекомбинация между локусом <i>MATα</i> и кассетой <i>HMRa</i>	n/m His ⁺ thr ⁻
Потеря правого плеча III хромосомы	α His ⁺ thr ⁻
Потеря хромосомы III	α his ⁻ thr ⁻
Мутация в <i>MATα</i> (в <i>MATα1</i> или <i>MATα2</i>)	α His ⁺ Thr ⁺
Мутации в <i>MATα</i> (одновременно в <i>MATα1</i> или <i>MATα2</i> или в двустороннем промоторе, делеция <i>MATα</i>)	
Временные (первичные) повреждения в локусе <i>MATα</i> (одновременно в <i>MATα1</i> или <i>MATα2</i> , или в двустороннем промоторе), устраняемые репарацией безошибочно после скрещивания	

Примечание: Фенотип гибридов указан для случая скрещивания двух штаммов одинакового типа спаривания (α): тестерного штамма (*MAT α HIS4 THR4*) и партнера для скрещивания (*MAT α his4 thr4*). Маркер *his4* находится в левом, а маркер *thr4* в правом плечах хромосомы III.

Для определения частоты «незаконной» гибридизации клетки штамма-тестера и штамма-партнера для спаривания растили в жидкой среде YEPD. Суспензию клеток высевали на среду для отбора гибридов по 100 мкл штамма-тестера и 100 мкл штамма-партнера для гибридизации Д926, предварительно сконцентрированного в 10 раз. Одновременно высевали подходящие разведения клеток штаммов-тестеров на полную среду YEPD для оценки выживаемости. Частоту гибридизации определяли как отношение количества выросших гибридов к общему числу высеянных клеток. Все эксперименты

проводили не менее трех раз, при этом для каждого из исследуемых штаммов использовали 12 независимых культур в каждом эксперименте.

Учет прямых мутаций в гене *CANI*. Для определения частоты прямых мутаций *can^r* культуру клеток тестируемых штаммов высевали на среду с канаванином, через 5 дней инкубации производили подсчет колоний. Частоту мутирования в каждой культуре определяли как соотношение количества колоний *can^r* к общему числу высеянных клеток с учетом фактора разведения культур. Для определения частоты мутагенеза, индуцированного УФ-светом, суспензию клеток тестируемого штамма высевали на среду с канаванином, а затем облучали УФ-светом в течение 10 и 40 секунд (соответственно 20 и 80 Дж/м²). Для оценки выживаемости штамма, разведения клеток высевали на твердую среду YEPD и подвергали облучению в тех же дозах.

Тест для определения частоты полиплоидизации. Для определения частоты полиплоидизации мы использовали подход, разработанный нами ранее (Andreychuk et al., 2022). Полиплоидов и диплоидов отличали от гаплоидов по сниженной частоте образования *can^r* колоний на среде с канаванином после облучения УФ в дозе 40 Дж/м². Частоту полиплоидизации определяли как отношение числа полиплоидов к общему числу проверенных колоний. Темп полиплоидизации рассчитывали как описано в статье (Andreychuk et al., 2022).

Измерение частоты появления клонов с измененными параметрами мутагенеза. Ночную культуру штамма [*PIN⁺*] [*psi⁻*], несущего плазмиду pGAL1-SUP35, выращивали 2 суток в среде для индукции сверхпродукции белка Sup35. Суспензию клеток высевали на 2 типа сред для получения отдельных колоний – на минимальную среду без аденина для отбора колоний, в которых возник прион [*PSI⁺*] (выросшие на среде без аденина колонии дополнительно проверяли на наличие приона по потере способности расти на среде без аденина после инкубации на среде с ГТХ), параллельно суспензию клеток высевали на полную среду для отбора колоний, в которых прионизация белка Sup35 не произошла, а также для подсчета общего количества клеток в культуре. Колонии каждого типа пересевали на соответствующие среды в виде небольших штрихов. Через 24 ч инкубирования чашки YEPD и через 48 ч чашки с минимальной средой без аденина перепечатывали на среду с канаванином, и облучали УФ-светом в течении 20 сек. (40 Дж/м²). Через 3-5 дней на отпечатках гаплоидных колоний появляются мутанты *can^r*, на отпечатках ди- и полиплоидов мутанты практически не появляются. Пloidность таких клонов проверяли дополнительно методом проточной цитометрии. Изменение уровня мутагенеза оценивали качественно сравнивая со штаммом [*psi⁻*]. Частоту и темп появления колоний с измененными параметрами мутагенеза измеряли так же, как для полиплоидов.

Определение частоты совместного возникновения приона [*PSI⁺*] и прямых мутаций в гене *CANI*. Измерение частоты появления клеток, в которых одновременно возникли прион и мутации в гене *CANI* выполняли

следующим образом. Дрожжи, трансформированные плазмидой pGAL1-SUP35, выращивали в жидкой минимальной среде, содержащей 2% раффинозы и необходимые добавки за исключением урацила для поддержания плазмиды. Через 24 часа культуру дрожжей разводили в 10 раз в жидкой минимальной среде, содержащей 2% галактозы, и выращивали в течение 48 часов. Затем культуру клеток дрожжей высевали на среду без аденина и содержащую канаванин для отбора клеток $Ade^+ Can^r$. Затем каждую колонию проверяли на наличие приона [PSI^+] как описано выше. Параллельно в каждой культуре измеряли частоту прионизации и частоту мутагенеза. Теоретически ожидаемую частоту совместного возникновения приона [PSI^+] и мутаций can^r считали как произведение частоты мутагенеза и частоты прионизации. Затем сравнивали теоретически ожидаемую и экспериментальную частоту совместных событий. Измерения проводили для 6 культур. Параллельно таким же образом проводили измерения частоты мутагенеза, частоты прионизации и частоты совместных событий для штамма, трансформированного плазмидой pRS316, не содержащей вставки гена *SUP35*, для оценки частоты перечисленных событий при физиологическом уровне продукции белка Sup35.

Проточная цитометрия. Подготовку клеток и измерение плоидности проводили как описано (Andreychuk et al., 2022), для анализа ночную культуру дрожжей выращивали в полной жидкой среде с добавлением аденина в концентрации 100 мг/л для ингибирования синтеза красного пигмента.

Флуоресцентная микроскопия. Для детекции агрегатов приона [PSI^+] в клетках дрожжей, дрожжи трансформировали плазмидой pCUP1-SUP35NM-YFP. Трансформантов выращивали в течение 24 часов на минимальной среде, содержащей 150 μ M $CuSO_4$. Флуоресценцию наблюдали, используя микроскоп Leica DM6000B (Leica Microsystems GmbH) при $1000\times$ увеличении. Фотографии были сделаны цветной камерой Leica DC 500.

Тетрадный анализ. Для проведения тетрадного анализа тестируемые штаммы скрещивали со штаммом PLY122, индуцировали споруляцию и проводили тетрадный анализ как описано (Инге-Вечтомов, 1971).

Полногеномное секвенирование. Полногеномное секвенирование проводили на базе научного парка Санкт-Петербургского государственного университета в ресурсном центре "Центр Биобанк" на приборе illumina HiSeq 4000 с использованием набора для приготовления библиотек TruSeq DNA.

Статистические методы. В работе использовали стандартный метод вычисления медианы и доверительных интервалов для медианы (Глотов и др., 1982). Для сравнения выборок использовали непараметрические критерий Манна-Уитни и критерий Вилкоксона при $p < 0,01$.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ.

Фенотипический анализ штаммов [PSI^+] и [PIN^+] из коллекции кафедры генетики и биотехнологии биологического факультета СПбГУ. На первом этапе работы мы провели фенотипический анализ штаммов [PSI^+]

и $[PIN^+]$, имеющихся в коллекции кафедры генетики и биотехнологии СПбГУ, целью которого была оценка уровня спонтанного мутагенеза. Для этого использовали тест на «незаконную» гибридизацию. В работе использовали два штамма $[psi^-]$ различного происхождения 33Г-Д373 и К5-35В-Д924-*ade1-14* и нескольких изогенных им независимых клонов $[PSI^+]$, полученных ранее. У всех проверенных штаммов, несущих прион $[PSI^+]$, частота «незаконной» гибридизации оказалась снижена по сравнению с изогенными штаммами без приона (Таблица 2).

Таблица 2 – Частота «незаконной» гибридизации
(медиана и 95 % доверительный интервал)

Штамм	Наличие $[PSI^+]$	Частота «незаконной» гибридизации ($\times 10^{-6}$)
33Г-Д373	$[psi^-]$	12,8 (10,1 – 14,1)
33Г-373-61	$[PSI^+]$	5,8 (4,1 - 9,4) *
33Г-373-72	$[PSI^+]$	4,4 (2,9 – 5,0) *
33Г-373-74	$[PSI^+]$	3,0 (2,3 – 3,5) *
К5-35В-Д924- <i>ade1-14</i> клон 1	$[psi^-]$	5,5 (4,5 – 8,5)
К5-35В-Д924- <i>ade1-14</i> 1-1	$[PSI^+]$	1,9 (1,2 – 2,1) *
К5-35В-Д924- <i>ade1-14</i> 1-6	$[PSI^+]$	2,5 (1,6 – 2,9) *
К5-35В-Д924- <i>ade1-14</i> клон 2	$[psi^-]$	6,1 (5,1 – 7,3)
К5-35В-Д924- <i>ade1-14</i> 2-3	$[PSI^+]$	0,72 (0,3 – 1,0) *
К5-35В-Д924- <i>ade1-14</i> 2-5	$[PSI^+]$	0,73 (0,5 – 1,2) *

Примечание: * – обозначены статистически значимые отличия от соответствующего штамма без приона, по критерию Манна-Уитни, $p < 0,01$

Мы также оценили спонтанный уровень мутагенеза с применением теста на «незаконную» гибридизацию у штамма $[pin^-]$ $[psi^-]$ и двух изогенных ему штаммов $[PIN^+]$ $[psi^-]$, которые также имелись в генетической коллекции. Мы не обнаружили статистически значимых отличий между значениями частоты образования «незаконных» гибридов у исследованных штаммов (Таблица 3).

Таблица 3 – Частота «незаконной» гибридизации
(медиана и 95 % доверительный интервал)

Штамм	Частота «незаконной» гибридизации ($\times 10^{-6}$)
К5-35В-Д924- <i>ade1-14</i> $[PIN^+]$ $[psi^-]$ клон 1	5,5 (4,5 – 8,5)
К5-35В-Д924- <i>ade1-14</i> $[PIN^+]$ $[psi^-]$ клон 2	6,1 (5,1 – 7,3)
К5-35В-Д924- <i>ade1-14</i> $[pin^-]$ $[psi^-]$	7,6 (5,5 – 8,6)

Таким образом, на первом этапе работы нам удалось выявить снижение частоты «незаконной» гибридизации у штаммов с прионом $[PSI^+]$, имеющихся

в коллекции лаборатории, при этом мы не выявили изменения частоты «незаконной» гибридизации в штамме, несущем только прион [PIN^+], поэтому дальнейшая работа была сфокусирована на исследовании влияния именно приона [PSI^+]. Остались открытыми следующие вопросы: (а) всегда ли наличие приона [PSI^+] приводит к снижению частоты «незаконной» гибридизации; (б) возможно ли существование различных вариантов приона, по-разному влияющих на параметры мутагенеза; (в) на частоту возникновения каких генетических изменений (генных, хромосомных или геномных мутаций) влияет прион [PSI^+]. Мы сформулировали три рабочих гипотезы, каждая из которых предполагает различные типы взаимосвязи между амилоидогенезом и появлением генетических изменений:

1. Прион [PSI^+] влияет на частоту наследуемых изменений в геноме.
2. Изменения в геноме влияют на частоту прионизации Sup35.
3. Прион [PSI^+] и мутации возникают одновременно, вероятно под действием общего индуцирующего фактора.

Исследование влияния приона [PSI^+] на частоту генетических изменений различных типов. Для проверки предположения, что наличие приона может непосредственно влиять на частоту генетических изменений, учитываемых в системе «незаконной» гибридизации (Гипотеза 1) мы получили коллекцию из 64 изогенных независимых штаммов [PSI^+], несущих прион [PSI^+] на фоне штамма K5-35B-Д924-ade1-14 [PIN^+] [psi^-], каждому штамму был присвоен порядковый номер, у каждого мы измерили значение частоты «незаконной» гибридизации. Мы обнаружили, что большинство штаммов [PSI^+] (56 из 64) не отличается от изогенного штамма [psi^-] по частоте «незаконной» гибридизации. Среди вновь полученных вариантов [PSI^+] мы обнаружили 8 клонов, у которых частота «незаконной» гибридизации отличалась от контрольного родительского штамма без приона: у семи из них частота была снижена (штаммы № 15, 39, 56, 67, 84 110, 127), у одного повышена (клон № 108). В дальнейшей работе были исследованы 10 клонов [PSI^+] (в анализ были включены штаммы №№ 15, 39, 56, 67, 84 110, 127, 108, а также штаммы №№ 2-5 и 2-3, имевшиеся в генетической коллекции кафедры генетики и биотехнологии СПбГУ и полученные ранее на том же генотипическом фоне – K5-35B-Д924).

У отобранных штаммов были исследованы параметры спонтанного и индуцированного ультрафиолетовым светом (УФ) мутагенеза. Результаты представлены в таблице 4. Отобранные штаммы характеризуются различными параметрами спонтанного и индуцированного мутагенеза. Из 10 отобранных штаммов 4 штамма не мутируют после облучения УФ, у штамма [PSI^+] – 108 частота «незаконной» гибридизации и мутагенеза повышена, у штаммов [PSI^+] - 2-5 и 2-3 отсутствует индуцированный УФ мутагенез, кроме того, у штамма [PSI^+] – 2-3 изменен тип спаривания, это может свидетельствовать о наличии в их геноме изменений, таких как мутации или дупликации хромосом.

Для того чтобы определить, влияет ли на параметры мутагенеза непосредственно наличие самого приона или эти изменения вызваны наличием наследуемых изменений в геноме мы проверили, как меняется

частота «незаконной» гибридизации после изгнания приона [PSI^+] из клеток отобранных штаммов (Рисунок 1А). Изгнание приона проводили, индуцируя сверхпродукцию белка Hsp104. Также мы исследовали как на частоту незаконной гибридизации влияет перенос приона в родительский штамм [psi^-] с помощью метода белковой трансформации (Рисунок 1Б). Мы не обнаружили корреляции между присутствием приона и изменениями параметров мутагенеза: при изгнании приона штаммы сохраняли отличный от штамма [psi^-] фенотип, при переносе приона в родительский штамм [psi^-] частота «незаконной» гибридизации не изменялась. Таким образом, наличие приона само по себе не коррелирует с изменением параметров мутагенеза, вероятно, на проявление этого признака влияют изменения в геноме, возникшие в отобранных нами штаммах [PSI^+].

Таблица 4 – Фенотип штаммов с прионом [PSI^+], изучаемых в данной работе.

№	Клоны штамма K5-35B-Д924 – <i>ade1-14</i>	Фенотип			
		частота «незаконной» гибридизации	частота спонтанного мутагенеза	частота УФ индуциров. мутагенеза	тип спаривания
1	[PSI^+] - 2-3	снижена	снижена	нет индукции	n/m
2	[PSI^+] - 2-5	снижена	снижена	нет индукции	α
3	[PSI^+] - 39	снижена	нет отличий от штамма [psi^-]	нет отличий от штамма [psi^-]	α
4	[PSI^+] - 108	повышена	повышена	чувств. к УФ	α
5	[PSI^+] - 110	снижена	снижена	снижена	α
6	[PSI^+] - 127	снижена	снижена	снижена	α
7	[PSI^+] - 15	снижена	снижена	нет индукции	α
8	[PSI^+] - 56	снижена	снижена	нет индукции	α
9	[PSI^+] - 67	снижена	снижена	нет индукции	α
10	[PSI^+] - 84	снижена	снижена	нет индукции	α

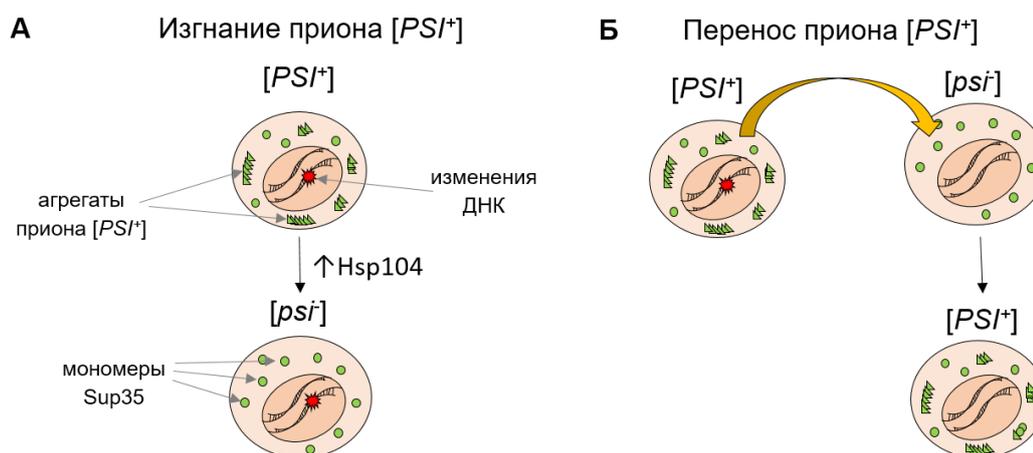


Рисунок 1 – Схема эксперимента по выяснению влияния приона $[PSI^+]$ на частоту мутагенеза у штаммов $[PSI^+]$. **А.** Изгнание приона из штаммов $[PSI^+]$. При сверхпродукции белка Hsp104 клетки дрожжей теряют прион $[PSI^+]$, при этом в геноме сохраняются генетические изменения. **Б.** При переносе приона в штамм $[psi^-]$ клетки приобретают только прион $[PSI^+]$, полученный от донора.

Генетические изменения, обнаруженные в штаммах $[PSI^+]$ с измененными параметрами мутагенеза. Для идентификации генетических изменений в геноме 10 отобранных нами для исследования штаммов $[PSI^+]$, были выполнены проточная цитометрия и полногеномное секвенирование. Результаты представлены в таблице 5. Мы показали, что из 10 штаммов $[PSI^+]$ четыре (клоны $[PSI^+]$ №№ 15, 56, 67 и 84) являются диплоидами по данным проточной цитометрии. Данное изменение генома объясняет снижение частоты спонтанного и индуцированного УФ мутагенеза у этих штаммов.

Таблица 5. Обнаруженные изменения в геноме в штаммах $[PSI^+]$ с измененными параметрами мутагенеза.

штамм	Фенотип штамма	Генетические изменения
$[PSI^+]$ - 2-5	α , снижена частота «незаконной» гибридизации, и мутагенеза, нет индукции УФ мутагенеза	мутация в гене <i>STE6</i> Leu575Stop
$[PSI^+]$ - 2-3	n/m , снижена частота «незаконной» гибридизации	мутация в гене <i>KEX1</i> Tyr57Stop
$[PSI^+]$ - 39	α , снижена частота «незаконной» гибридизации, частота мутагенеза не изменена	мутация в гене <i>CDC60</i> Arg797Lys
$[PSI^+]$ - 108	α , повышена частота «незаконной» гибридизации, повышена частота мутагенеза, чувствителен к высоким дозам УФ	мутация в гене <i>RAD50</i> Leu191Phe
$[PSI^+]$ - 110	α , снижена частота «незаконной» гибридизации, снижена частота спонтанного и УФ – индуцированного мутагенеза	Дупликации I и III хромосом

[<i>PSI</i> ⁺] - 127	α , снижена частота «незаконной» гибридизации, снижена частота спонтанного и УФ – индуцированного мутагенеза	Дубликации I и III хромосом
[<i>PSI</i> ⁺] - 15	α , снижена частота «незаконной» гибридизации и мутагенеза, нет индукции УФ мутагенеза	Диплоидизация
[<i>PSI</i> ⁺] - 56	α , снижена частота «незаконной» гибридизации и мутагенеза, нет индукции УФ мутагенеза	Диплоидизация
[<i>PSI</i> ⁺] - 67	α , снижена частота «незаконной» гибридизации и мутагенеза, нет индукции УФ мутагенеза	Диплоидизация
[<i>PSI</i> ⁺] - 84	α , снижена частота «незаконной» гибридизации и мутагенеза, нет индукции УФ мутагенеза	Диплоидизация

У гаплоидных штаммов [*PSI*⁺] - 2-5, [*PSI*⁺] - 2-3, [*PSI*⁺] - 39, [*PSI*⁺] - 108, [*PSI*⁺] - 110, [*PSI*⁺] - 127 и штамма без приона были просеквенированы геномы. В геноме каждого из штаммов [*PSI*⁺] нам удалось обнаружить генетические изменения (мутацию или дубликацию хромосомы), которые позволяют объяснить изменение параметров мутагенеза, характерные для носителей этих мутаций. Перечень таких мутаций, приведен в таблице 5.

В штамме [*PSI*⁺] – 2-5 была обнаружена нонсенс-мутация в гене *STE6*, этот ген кодирует мембранный белок, транспортирующий α -фактор (феромон) из клетки, мутации в этом гене приводят к стерильности α -клеток (*MAT α*). Наличие мутации в этом гене объясняет снижение частоты «незаконной» гибридизации, поскольку при переключении типа спаривания $\alpha \rightarrow a$ образовавшиеся клетки α -типа спаривания теряют способность скрещиваться. В штамме [*PSI*⁺]-2-3, который был исследован одним из первых, но изменивший тип спаривания в ходе работы, была обнаружена мутация в гене *KEX1* (нонсенс-мутация), этот ген кодирует белок, необходимый для синтеза предшественника α -фактора, мутации в этом гене приводят к стерильности клеток α -типа спаривания (*MAT α*).

Штамм [*PSI*⁺] - 39 несет в геноме миссенс-мутацию в гене *CDC60*. Этот ген кодирует лейцин - тРНК-синтетазу, которая присоединяет лейцин к соответствующей тРНК, описанные мутации в этом гене приводят к термочувствительности мутантов, остановке клеточного цикла на стадии G1 при 37°C, снижению способности к спариванию и к повышению частоты потерь хромосом (Bedard et al., 1981). Штамм [*PSI*⁺] – 108 мутантен по гену *RAD50*, этот ген кодирует белок, участвующий в мейотической рекомбинации и устранении двунитевых разрывов ДНК, мутанты по этому гену обладают гипермутабельным фенотипом и чувствительны к ДНК-повреждающим факторам, таким как УФ или ионизирующее излучение. В штаммах [*PSI*⁺] - 127 и [*PSI*⁺] - 110, обнаружены дубликации хромосом I и III. Так как локус *MAT* расположен в III хромосоме, то дисомики по этой хромосоме, содержат две

копии локуса *MATa*, что приводит к снижению частоты переключения типа спаривания и снижению частоты «незаконной» гибридизации.

Влияние приона [*PSI*⁺] на частоту дупликации генома. Поскольку среди отобранных штаммов [*PSI*⁺] были обнаружены диплоиды, мы проверили как влияет прион на частоту диплоидизации. Для этого был разработан подход, позволяющий различать гаплоидные и полиплоидные штаммы дрожжей на фенотипическом уровне, а также оценить частоту их появления в культуре дрожжей (Andreychuk et al., 2022). Поскольку мутации *can^r* рецессивны, диплоидные и полиплоидные клоны можно отличить от гаплоидов по частоте образования мутантных клонов *Can^r* на среде с канавабином после облучения УФ светом (диплоиды и полиплоиды образуют единичные колонии или не образуют совсем). В данном исследовании мы впервые измерили темп спонтанной полиплоидизации прямым методом в культурах гаплоидных гетероталлических штаммов *S. cerevisiae* (Таблица 6). Поскольку у нескольких полученных нами штаммов [*PSI*⁺] были обнаружены генетические изменения, сопровождающиеся различными показателями стабильности генома, для оценки влияния приона на частоту полиплоидизации был выбран штамм [*PSI*⁺] - 118, у которого частота «незаконной» гибридизации не отличается от штамма без приона. Мы оценили значение частоты полиплоидизации у этого штамма [*PSI*⁺] в сравнении со штаммом [*psi*⁻], полученном на его основе методом изгнания [*PSI*⁺] с помощью сверхэкспрессии *HSP104*. полученное значение частоты полиплоидизации в этом случае осталось неизменным (Таблица 6). Таким образом, полученные результаты подтверждают, что наличие приона не влияет на частоту полиплоидизации.

Таблица 6. Темп спонтанной полиплоидизации, в присутствии приона [*PSI*⁺] и после изгнания приона.

Штамм	Темп образования полиплоидных колоний (медиана и доверительный интервал) ($\times 10^{-5}$)
[<i>PIN</i> ⁺] [<i>psi</i> ⁻]	6,2 (5,1 – 36,4)
[<i>PIN</i> ⁺] [<i>PSI</i> ⁺] - 118	4,9 (1,0 – 38,0)
[<i>PIN</i> ⁺] [<i>psi</i> ⁻] - 118 (после изгнания приона)	4,5 (0,8 – 18,0)

По результатам проделанной работы мы пришли к выводу, что сам по себе прион [*PSI*⁺] не оказывает влияния на частоту мутаций, а повышенная частота появления клонов с измененными параметрами спонтанного и индуцированного мутагенеза может быть связана с тем, что изменения, возникающие в геноме спонтанно или под действием мутагенных факторов, могут влиять на частоту возникновения приона [*PSI*⁺].

Влияния дестабилизации генома на частоту прионизации Sup35. Для проверки предположения о влиянии дестабилизации генома на частоту прионизации Sup35 (Гипотеза 2) мы исследовали влияние таких дестабилизирующих геном факторов, как гидроксимочевина и дизрупция гена

RAD52 на частоту появления приона [*PSI*⁺]. Гидроксимочевина блокирует фермент рибонуклеотидредуктазу, синтезирующую предшественники ДНК дезоксинуклеотидтрифосфаты (дНТФ), что приводит к снижению концентрации дНТФ в клетках и замедлению синтеза ДНК, остановке вилки репликации, активации ферментов чекпоинта в ответ на повреждения ДНК и повышению уровня мутагенеза (Northam et al., 2010). Ген *RAD52* участвует в рекомбинации и устранении двунитевых разрывов ДНК, мутанты *rad52* неспособны безошибочно устранять разрывы ДНК, такие мутанты обладают мутаторным фенотипом и чувствительны к ДНК-повреждающим воздействиям. Мы не обнаружили статистически значимого отличия по частоте прионизации Sup35 в присутствии гидроксимочевины или у мутантного штамма *rad52::LEU2* по сравнению с контролем.

Оценка частоты одновременного появления приона [*PSI*⁺] и генетических изменений в клетках. Несмотря на то, что прион [*PSI*⁺] не влияет на стабильность генома, обращает на себя внимание тот факт, что в коллекции полученных нами штаммов [*PSI*⁺] были выявлены штаммы с измененными параметрами мутагенеза, несущие в геноме различные генетические изменения: точковые мутации, дубликации отдельных хромосом и дубликация генома. Частота таких штаммов в использованной выборке оказалась высокой (12,5% или 8 из 64), что явно превышает спонтанный уровень мутагенеза. Поэтому мы предположили, что генетические изменения возникают одновременно с появлением приона (Гипотеза 3).

Для того, чтобы выяснить, как связаны появление приона [*PSI*⁺] в клетке дрожжей и изменение параметров мутагенеза, мы оценили частоту появления клонов с измененными параметрами мутагенеза при переходе белка Sup35 в прионную форму. Для этого мы сравнивали частоту появления колоний с отличными от нормальных параметрами мутагенеза среди клонов [*PSI*⁺] и [*psi*⁻], происходящих из одной культуры и переживших сверхпродукцию Sup35p. Затем у отобранных колоний обоих типов качественно оценивали уровень УФ-индуцированного мутагенеза и подсчитывали частоту появления колоний с измененным по сравнению со штаммом [*psi*⁻] уровнем мутагенеза (тех колоний, которые не мутировали вообще или уровень индуцированного мутагенеза был заметно снижен) (Рисунок 2). Всего мы проверили 8324 колонии [*PSI*⁺] и 6214 колоний [*psi*⁻], полученных из 6 независимых культур (по 700-1500 колоний каждого типа из каждой из 6 независимых культур).

Оказалось, что темп образования колоний с измененными параметрами мутагенеза среди клонов [*PSI*⁺] в 62 раза выше по сравнению с клонами без приона (Таблица 7). Поскольку два типа клеток [*PSI*⁺] и [*psi*⁻] происходят из одной культуры, они были выращены в идентичных условиях и обладают одинаковым генотипическим фоном, а различаются они только наличием приона, то увеличение частоты появления клонов с измененными параметрами мутагенеза среди клонов [*PSI*⁺] указывает на то, что мутации и амилоидогенез происходят одновременно.

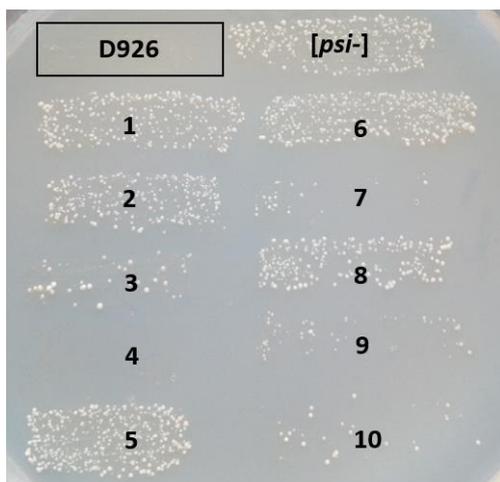


Рисунок 2 – Отпечатки различных клонов $[PSI^+]$ и контрольных штаммов на селективной среде с канаванином после облучения УФ. На рисунке отмечены: штаммы D926 – диплоидный штамм, $[psi^-]$ – штамм без приона, 1-10 – клоны, в которых произошла прионизация Sup35. Среди клонов $[PSI^+]$ есть немутуирующие клоны (№4) и клоны со сниженным уровнем мутагенеза.

Таблица 7 – Темп образования немутуирующих и редкомутуирующих колоний при возникновении приона $[PSI^+]$, при сверхпродукции белка Sup35 и спонтанный темп полиплоидизации.

штамм	Темп образования мутантных (немутуирующих и редкомутуирующих) колоний (медиана и доверительный интервал) ($\times 10^{-5}$)
$[PSI^+]$	342 (196-1033)*
$[psi^-]$	5,5 (0 - 45)
$[psi^-]$	6,2 (5,1 – 36,4) (темп спонтанной полиплоидизации)

Примечание: * – обозначены статистически значимые изменения по критерию Манна-Уитни, $p < 0,01$

В ходе проверки гипотезы о том, что прион и какое-либо генетическое изменение возникают одновременно, мы провели дополнительный эксперимент по оценке частоты возникновения клонов, одновременно несущих прион $[PSI^+]$ и мутацию can^r , а также частоты каждого из этих событий в отдельности (результаты представлены в таблице 8). Согласно нашему предположению, если мутация и прион возникают независимо друг от друга, то частота их совместного возникновения в клетке должна быть равна произведению частот каждого из этих событий в отдельности. Если же частота их совместного появления окажется выше, то это указывает на существование связи между событиями. В том случае, если частота их совместного появления окажется ниже, то это означает, что одно из двух событий подавляет возникновение другого. Мы измерили частоту прионизации Sup35, частоту возникновения мутаций устойчивости к канаванину, а также частоту появления колоний, в которых одновременно возникли прион и мутация в гене *CAN1*. Аналогичный эксперимент мы провели с использованием штамма, несущего контрольную плазмиду pRS316, в этом штамме ген *SUP35* экспрессируется на физиологическом уровне.

Экспериментальная частота одновременного возникновения can^r и $[PSI^+]$ оказалась в 2,5 раза выше теоретически ожидаемой (по критерию

Вилкоксона при $p < 0,01$) (Таблица 8). Таким образом, появление приона [PSI^+] и мутаций can^r взаимосвязано. Кроме того, частота мутагенеза при сверхпродукции Sup35 не отличается от частоты мутагенеза при физиологическом уровне продукции этого белка, что свидетельствует о том, что наблюдаемый эффект связан именно с прионизацией Sup35, а не увеличением продукции белка Sup35.

Таблица 8 – Частота (медиана и 95% доверительный интервал) прионизации Sup35 и прямых мутаций can^r в штамме, трансформированном плазмидой, содержащей ген $SUP35$ под контролем промотора $GAL1$, и штамме, трансформированном контрольной плазмидой pRS316.

Плазмида	Частота can^r	Частота прионизации Sup35	Частота одновременного появления can^r и [PSI^+] (эксперим.)	Теоретически ожидаемая частота одновременного появления can^r и [PSI^+]
$pGAL1 - SUP35$	$2,0 \times 10^{-6}$ ($1,2 \times 10^{-6} - 3,3 \times 10^{-6}$)	$2,1 \times 10^{-2}$ ($1,8 \times 10^{-2} - 3,2 \times 10^{-2}$)	$9,9 \times 10^{-8*}$ ($6,4 \times 10^{-8} - 17 \times 10^{-8}$)	$3,8 \times 10^{-8}$ ($2,2 \times 10^{-8} - 9,6 \times 10^{-8}$)
pRS316	$2,4 \times 10^{-6}$ ($2,2 \times 10^{-6} - 6,5 \times 10^{-6}$)	$2,3 \times 10^{-8}$ ($0 - 3,2 \times 10^{-8}$)	0	$5,0 \times 10^{-14}$ ($0 - 18,2 \times 10^{-14}$)

Примечание: * – значение отличается от теоретически ожидаемого по критерию Вилкоксона, $p < 0,01$.

ОБСУЖДЕНИЕ

Для того чтобы объяснить механизм совместного возникновения приона и генетических изменений мы предположили модель, схематично изображенную на рисунке 3. Согласно этой модели, в клетке действует неизвестный фактор, который оказывает влияние одновременно на структуру и ДНК, и белков, приводя к возникновению повреждений в этих молекулах. Затем в ходе репарации ДНК и процессов, контролирующих качество молекул белков, большая часть повреждений ДНК устраняется безошибочно, и большая часть молекул белков с повреждениями восстанавливается или деградирует. Небольшая часть первичных повреждений может быть зафиксирована в виде мутаций, тогда как небольшая часть измененных молекул белков может остаться неисправленной и индуцировать образование амилоидов. Учитывая разнообразие генетических изменений, обнаруженных в штаммах с прионом [PSI^+] в ходе выполнения нашей работы, можно предположить, что этот предполагаемый фактор обладает широким спектром действия. Таким фактором может быть окислительный стресс.

Описанный гипотетический механизм индукции амилоидогенеза согласуется с физиологической гипотезой мутагенеза Лобашева для линейных матричных процессов (Лобашев, 1947). Лобашев предположил механизм появления мутаций, который заключался в том, что мутациям предшествуют премутационные повреждения в генах, которые превращаются в мутации в результате ошибок репарации. Возможно, и амилоидам (в случае приона

[*PSI*⁺] наследуемым изменением пространственной структуры) предшествуют преамилоидные («предмутационные») изменения молекул белков. Так же, как и в МП I в МП II белки, содержащие преамилоидные повреждения, передают измененную структуру белка другим нативным молекулам белка, таким образом происходит нетождественное копирование пространственной матрицы («мутация»).

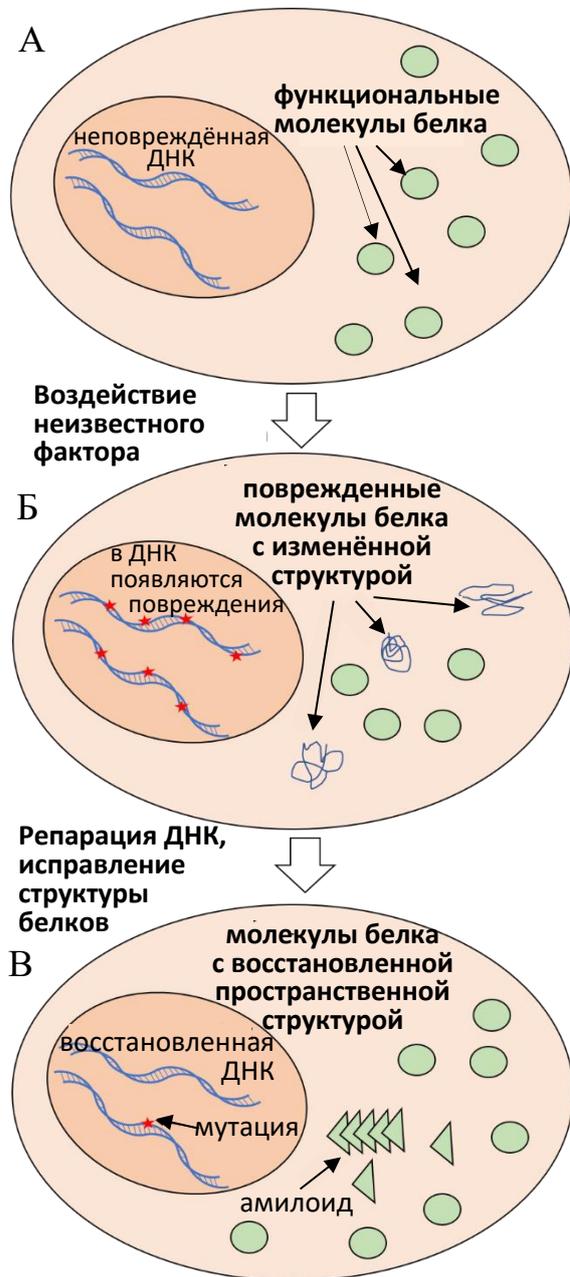


Рисунок 3 – Схема совместного возникновения приона [*PSI*⁺] и мутаций *can'*

А. клетка с неповрежденными ДНК и молекулами белков.

Б. под действием неизвестного фактора в ДНК возникают первичные повреждения, а также изменяется пространственная структура белков.

В. В ходе репарации ДНК большая часть первичных повреждений безошибочно устраняется, незначительная часть первичных повреждений превращается в наследуемые изменения – мутации. В то же время под действием комплексной системы, отслеживающей правильность укладки белков, большая часть молекул белков с поврежденной пространственной структурой восстанавливают исходную структуру или деградируют, незначительная часть поврежденных молекул белков приобретает амилоидную конформацию.

ВЫВОДЫ:

1. Наличие в клетке дрожжей *S. cerevisiae* стабильных вариантов приона [*PSI*⁺], наследуемых в ходе митотических делений, не влияет на стабильность генома.
2. Дестабилизация генома, индуцированная нарушением механизма гомологичной репарации или пула предшественников ДНК, не влияет на частоту возникновения [*PSI*⁺].

3. Частота одновременного возникновения приона [PSI^+] и генетических изменений в клетке дрожжей *S. cerevisiae* превышает теоретически ожидаемую частоту в случае их независимого возникновения.
4. Генетические изменения, возникающие в клетке дрожжей *S. cerevisiae* одновременно с прионом [PSI^+], представляют собой мутации разных типов: генные, хромосомные и геномные мутации.
5. Предложена модель, согласно которой совместное появление приона [PSI^+] и изменений генома в клетке, вероятно, опосредовано действием общего фактора (предположительно окислительный стресс), одновременно повреждающего и геном и протеом клетки.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе мы показали, что генетические изменения и прионы часто возникают в клетке одновременно, при этом нет прямого влияния генетических изменений и прионов на возникновение друг друга. Такого рода исследование, направленное на изучение взаимодействия амилоидогенеза и процессов, участвующих в поддержании стабильности генома, было выполнено впервые. Мы предположили механизм, благодаря которому можно объяснить повышенную частоту совместного возникновения генетических изменений и приона [PSI^+] в клетках дрожжей *S. cerevisiae*. Мы предполагаем, что ключевую роль в индукции амилоидогенеза играют активные формы кислорода, которые повреждают различные клеточные структуры, включая белковые молекулы и генетический материал клетки.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ РАБОТ:

1. Андрейчук Ю. В., Ширяева А. А., Жук А. С., Степченкова Е. И., Инге-Вечтомов С. Г. (2015) Влияние прионизации белка Sup35 [PSI^+] на частоту генетических нарушений, учитываемых в альфа-тесте у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* // *Экологическая генетика*. Т. 13, № 4, С. 22-24.
2. Андрейчук Ю. В., Задорский С. П., Жук А. С., Степченкова Е. И., Инге-Вечтомов С. Г. (2020) Связь матричных процессов I и II рода: амилоиды и стабильность генома // *Молекулярная биология*. Т. 54. № 5. С. 750-775.
3. Andreychuk Y. V., Zhuk A. S., Tarakhovskaya E. R., Inge-Vechtomov S. G., Stepchenkova E. I. (2022) Rate of spontaneous polyploidization in heterothallic yeast *Saccharomyces cerevisiae* // *Biological communications*. Vol. 67. Is. 2. P.88-96.
4. Степченкова Е. И., Андрейчук Ю. В., Афанасова Д. В., Задорский С. П., Инге-Вечтомов С. Г. (2023) NM-тест – усовершенствованная версия альфа-теста для дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, обладающая более высокой чувствительностью по отношению к генотоксическим факторам // *Генетика*. Т. 59. № 1. С. 18-25.
5. Zhuk A. S., Shiriaeva A. A., Andreychuk Y. V., Kochenova O. V., Tarakhovskaya E. R., Bure V. M., Pavlov Y. I., Inge-Vechtomov S. G., Stepchenkova E. I. (2023) Detection of primary DNA lesions by transient changes in mating behavior in yeast *Saccharomyces cerevisiae* using the alpha-test // *International Journal of Molecular Sciences*. V. 24. No. 15:12163.