

## СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА СОДЕРЖАНИЯ АМИЛОИДА И ПРИОНОВ В КЛЕТКАХ ДРОЖЖЕЙ

© О. В. Невзглядова,<sup>1</sup> И. М. Кузнецова, А. В. Артемов,  
Е. В. Михайлова, К. К. Туроверов, Т. Р. Сойдла

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург;  
<sup>1</sup> электронный адрес: oneva@mail.cytspb.rssi.ru

Предпринята попытка количественной оценки содержания амилоида при помощи обработки грубых лизатов дрожжевых клеток тиофлавином Т — агентом, специфически окрашивающим амилоидные фибриллы. Мы показали, что обработка хлоридом гуанидина (GuHCl) и сверхпродукция шаперона Hsp104p, приводящие к элиминации фактора  $[PSI^+]$ , сопровождаются стабильным снижением содержания амилоида, о чем говорит понижение интенсивности флуоресценции (IF) тиофлавина Т. В то же время сверхэкспрессия гена SUP35, кодирующего белок, прионизируемая форма которого служит фактором  $[PSI^+]$ , приводит к образованию  $[PSI^+]$ -клонов с повышенной IF тиофлавина Т. Передача  $[PSI^+]$ -фактора цитодукцией в скрещиваниях, в которых реципиент проявляет низкую IF, сопровождается также устойчивым повышением IF у цитодуктантов, что свидетельствует об увеличении содержания амилоида. Таким образом, в модельных опытах, в которых теми или иными воздействиями модифицируется количество одного из дрожжевых прионов амилоидов, фактора  $[PSI^+]$ , изменение IF тиофлавина Т соответствует ожидаемому сдвигу содержания амилоида, причем сдвиг IF ведет себя как цитоплазматический наследственный детерминант. Делается вывод, что IF тиофлавина Т позволяет дать количественную оценку содержания амилоида в клетке, а митотически стабильный сдвиг IF при воздействии ряда агентов, влияющих на прионовый состав, позволяет дать количественную оценку вклада прионов в амилоидный пул. Это дает основание полагать, что подобная оценка сдвигов IF тиофлавина Т при воздействии агентов, влияющих на прионовый состав, может оказаться полезной для обнаружения ранее неизвестных прионов в штаммах дрожжей.

Ключевые слова: прионы, амилоид, цитодукция, *Saccharomyces cerevisiae*.

Прионы представляют собой инфекционные агенты белковой природы, способные изменять нормальные белки по своему подобию (Herpner, Aguzzi, 2002). К белкам, способным существовать в прионовой форме, у дрожжей относятся: фактор терминации Sup35p (член семейства эукариотических факторов терминации трансляции eRF3), белок с неизвестной функцией Rnq1p и регулятор транскрипции, зависящий от катаболитной репрессии азотсодержащих соединений Ure2p. Доказано, что прионизация этих белков приводит к разным последствиям: к нонсенс-супрессии  $[PSI^+]$ , увеличению частоты появления белков в форме  $[PSI^+]$  —  $[PIN^+]$  — и способности импортировать из среды уреидосукцинат —  $[URE3]$  (Chernoff, 2004; Ross et al., 2005). По крайней мере один из перечисленных прионов —  $[PSI^+]$  — может сообщать клеткам преимущества, которые, как предполагают некоторые авторы (True, Lindquist, 2000; True et al., 2004), могут играть существенную роль в эволюции.

Вероятность того, что кроме известных прионов в дрожжах при определенных условиях могут генерироваться и другие амилоиды, кажется достаточно высокой. Хотя подсчеты, по которым их может быть более 100 (Michelettsch, Weissman, 2000), и являются спорными, ряд авторов обоснованно предполагают, что в дрожжевых клетках

следует искать новые белки, способные к прионизации (см.: Ross et al., 2004).

Тиофлавин Т — флуоресцентный краситель, который не взаимодействует с белками в их нативной форме. Он не связывается также с частично денатурированными белками и с аморфными агрегатами белков, но является специфическим агентом, взаимодействующим с белками, находящимися в состоянии амилоидных фибрилл. Это позволяет использовать тиофлавин Т для диагностики амилоидности и мониторинга кинетики образования определенных амилоидов (Chernoff et al., 2002). Показано, что в дрожжевых клетках тиофлавин окрашивает прионовые агрегаты in vivo (Kimura et al., 2003).

Ранее мы (Voropai et al., 2003) выявили стерические ограничения, определяющие высокий квантовый выход флуоресценции тиофлавина Т, встраивающегося в фибриллы. В настоящей работе делается попытка охарактеризовать количественное содержание амилоидов в клетке на основе связывания клеточных грубых лизатов с тиофлавином Т и сопоставить полученные количественные оценки с генетическими данными о наличии или отсутствии в клетках хорошо известного приона —  $[PSI^+]$ -фактора. Соответствие между генетическими и цитологическими данными является достаточно впечатляющим. Прделан-

ная работа позволяет предлагать окраску тιοфлавином Т в сочетании с воздействием агентами, влияющими на прионовый состав, как подход для поиска новых прионов. С учетом литературных данных (True, Lindquist, 2000; True et al., 2004) можно полагать, что выявление новых прионов будет способствовать лучшему пониманию эволюционных и регуляторных механизмов у эукариотических микроорганизмов.

### Материал и методика

Использованные штаммы приведены в таблице. Штамм АН/В был получен от д-ра А. С. Борхсениуса (СПбГУ). Штаммы со слабой супрессией OT55 [ $PSI^+_{weak} PIN^+$ ] и с сильной супрессией OT56 [ $PSI^+_{strong} PIN^+$ ], которые являются изогенными производными линий 74-D694 (Chernoff et al., 1995) и 74D/c [ $psi^- pin^-$ ], были предоставлены д-рами Л. Н. Мироновой и Г. А. Журавлевой (СПбГУ). Использованные в данной работе изоляты этих штаммов, обозначенные как OT56/h1, OT56/7, OT55/a и 74D/a, были получены нами.

Плазмиды, использованные в данной работе, для краткости пронумерованные № 3 — pRS316-GAL-SUP35(URA3), № 2 — pYS-GAL-104(URA3), содержащая ген *HSP104* под контролем индуцибельного промотора GAL1,10 (Chernoff et al., 1999), и № 1 — контрольная плаزمида pRS316-GAL(URA3) — были описаны Деркач и соавторами (Derkatch et al., 1997) и с разрешения авторов любезно предоставлены нам д-ром Г. А. Журавлевой (СПбГУ).

[ $PSI^+$ ]- и [ $psi^-$ ]-трансформанты от [ $PSI^+$ ]- и [ $psi^-$ ]-изолятов штамма 74-D694 с плазмидой 3 были названы соответственно 74-D(+) $\{3 [PSI^+]$ , 74-D(+) $\{3 [psi^-]$ , 74-D(-) $\{3 [PSI^+]$  и 74-D(-) $\{3 [psi^-]$ , где плюс или минус означает соответственно наличие или отсутствие [ $PSI^+$ ]-фактора у исходного штамма, подвергнувшегося трансформации. Аналогичную систему сокращений использовали для случаев, когда штамм трансформировался плазмидами 1 и 2.

Цитодуктанты, полученные от скрещивания двух родителей p1[ $PSI^+$ ] и p2[ $psi^-$ ], обозначаются как C[p1(+)]p2[ $PSI^+$ ]. Так, C1[74-D(+)]B [ $PSI^+$ ] обозначает [ $PSI^+$ ]-цитодуктант № 1, получивший от гетерокариотической зиготы ядро штамма АН/В и дополнительную цитоплазму с [ $PSI^+$ ]-фактором от штамма 74-D694.

Культуральные среды и основные методы генетического анализа дрожжевых клеток, включая микроманипулирование, описаны ранее (Sherman et al., 1986). Прионы элиминировали гуанидинхлоридом (GuHCl) (Chernoff et al., 2002). Цитодукцию проводили в соответствии с работой Захарова и Ярового (Zakharov, Yarovoy, 1977) с некоторыми изменениями: зиготы, а затем их первые почки изолировали с помощью микроманипулятора, выращивали на полной питательной среде и тестировали на соответствующих селективных средах (Nevzglyadova et al., 2002, 2004, 2005).

Интенсивность флуоресценции на единицу белка (IF) в грубых лизатах, окрашенных тιοфлавином Т, определяли следующим образом. Дрожжевые клетки выращивали до стационарной фазы в течение 120 ч на чашках с полной средой (YEFD) — это дает возможность визуально оценить наличие [ $PSI^+$ ]-фактора по супрессии нон-сенс-мутации в *ade1*. Клетки суспендировали в H<sub>2</sub>O, оптическую плотность (OD<sub>600</sub>) выравняли до 20. К дважды отмытым водой клеткам, ресуспендированным в 0.4 мл 25 мМ Tris-HCl (pH 7.5), добавляли равный объем стеклянных бус и разрушали дрожжи на встряхивателе 3 раза по 5 мин, охлаждая клетки в течение 5 мин перед каждым циклом. Остатки клеток и бусы удаляли центрифугированием при 4000 об/мин в течение 4 мин на микроцентрифуге Eppendorf 5415C. После этого 200 мкл супернатанта разбавляли в 10 раз 25 мМ Tris-HCl (pH 7.5) и выдерживали на льду. При этом измеряли OD<sub>440</sub>, которая колебалась от 0.15 до 0.30. Аликвоты по 500 мкл брали для определения белка и окрашивания тιοфлавином Т. В последнем случае добавляли 15 мкл 10<sup>-3</sup> М раствора тιοфлавина Т (Sigma, США). Приготовленные таким образом пробы инкубировали сначала в течение 1.5 ч при 30 °С, потом 1 ч в холодильнике при 6—8 °С, а затем измеряли IF при длинах волн возбуждения и эмиссии 435 и 486 нм соответственно. Суммарный клеточный белок определяли модифицированным методом Лоури (Северин, Соловьев, 1989). IF в наших экспериментах вычисляли как частное от деления показателя интенсивности флуоресценции на показатель суммарного белка в пробе.

Так как оценки IF для штаммов варьируют от опыта к опыту, полученные изменения соотносили с контрольным значением, полученным в том же опыте. Относительную разницу между опытным и контрольным вариантами, названную DIF, мы вычисляли по формуле  $DIF = (IF_s - IF_f)/IF_f$ , где  $IF_f$  — показатель первого (first), как правило исходного, клона, а  $IF_s$  — показатель второго клона, как правило после обработки. В некоторых особо оговоренных случаях DIF вычисляли как  $(IF_f - IF_s)/IF_s$ . Для оценки достоверности получаемых из опыта в опыт различий вычисляли среднее значение DIF и его 95%-ный доверительный интервал (Закс, 1976).

Для окрашивания тιοфлавином Т неразрушенных клеток их сначала фиксировали 70%-ным этанолом в течение 10 мин при комнатной температуре и дважды отмывали водой. К клеткам, ресуспендированным в 0.5 мл 25 мМ Tris-HCl (pH 7.5), добавляли 20 мкл 10<sup>-3</sup> М тιοфлавина Т на 1 ч при 30 °С. Затем клетки, отмытые дважды водой, изучали под флуоресцентным микроскопом AxioPhot, используя соответствующие фильтры.

Штаммы *Saccharomyces cerevisiae*, использованные в работе

Штамм	Генотип
K5-5A	<i>MAT α his4 ade2 kar1-1 [psi<sup>-</sup>]</i>
168t	<i>MAT α his5 [PSI<sup>+</sup>]</i>
YPH499	<i>MAT α ura3 leu2 his3 trp1 lys2 ade2 [PSI<sup>+</sup>]</i>
АН/В	<i>MAT α ade1-14 ura3 his3 lys9 kar1 [psi<sup>-</sup>]</i>
74-D694	<i>MAT α ade1-14 ura3 his3 trp1 leu2 [PSI<sup>+</sup><sub>weak</sub> PIN<sup>+</sup>]</i>
Производные 74-D694	
74-D/a	<i>MAT α ade1-14 ura3 his3 trp1 leu2 [psi<sup>-</sup> PIN<sup>+</sup>]</i>
74-D/c	То же [ $psi^- pin^-$ ]
OT56/h1	» » [ $PSI^+_{strong} PIN^+$ ]
OT56/7	» » [ $PSI^+_{strong} PIN^+$ ]
OT55	» » [ $PSI^+_{weak} PIN^+$ ]
OT55/a	» » [ $psi^- PIN^+$ ]

## Результаты и обсуждение

Адекватность сравнительной оценки количества прионизированных белковых молекул методом тиофлавинового окрашивания их грубых лизатов следует из четырех типов экспериментов: 1) по элиминации некоторых прионов обработкой клеток  $\text{GuHCl}$ ; 2) по элиминации прионов в результате введения в них индуцибельной плазмиды с геном шаперона *HSP104*; 3) по увеличению количества  $[PSI^+]$ -фактора при сверхпродукции внесенного на плазмиде гена *SUP35*; 4) по передаче  $[PSI^+]$ -фактора цитодукцией. Большинство штаммов, использованных нами, были маркированы хорошо изученным прионом  $[PSI^+]$ . Присутствие  $[PSI^+]$ -фактора выявлялось по супрессии нонсенс-мутации *adel-14*, которая приводит к уменьшению накопления красного пигмента (накапливающегося при блоке некоторых стадий биосинтеза аденина) и к способности расти на синтетической среде без аденина. Такой визуальный экспресс-тест на присутствие  $[PSI^+]$  в клонах значительно облегчает возможность отслеживать изменения в количестве этого приона и делает его удобной мишенью для апробации нашего подхода.

Действие  $\text{GuHCl}$ . В экспериментах первого типа  $[PSI^+]$ -клоны обрабатывали  $\text{GuHCl}$  и полученные клоны  $[psi^-]$  одновременно с исходным  $[PSI^+]$  оценивали по показателю IF. На основе IF вычисляли DIF для всех пар  $[PSI^+]/[psi^-]$ . А priori мы полагали, что у исходных  $[PSI^+]$ -клонов IF должна быть больше, чем у  $[psi^-]$ -клонов. При этом мы учитывали, что  $\text{GuHCl}$  помимо элиминации прионов, таких как  $[PSI^+]$  и  $[PIN^+]$ , может еще каким-то образом воздействовать на клетки на генетическом, физиологическом или структурном уровнях. Однако круг вызываемых  $\text{GuHCl}$  эффектов сужен до генетических, так как только такие эффекты передаются отдаленным потомкам обработанных клеток, с которыми мы имеем дело в наших экспериментах. Известно, что на генетическом уровне  $\text{GuHCl}$  влияет не только на процесс прионизации, но может вызывать митохондриальные мутации *rho^-*, приводящие к дыхательной некомпетентности. Для чистоты эксперимента после воздействия  $\text{GuHCl}$  мы отбираем только клоны с неповрежденной митохондриальной ДНК  $[rho^+psi^-]$ .

Мы изучали клоны OT56 (OT56/h1 и OT56/7), проявляющие супрессию сильного типа (strong), и клоны штам-

мов OT55 и 74-D694 с супрессией слабого типа (weak). Фенотипически разные степени супрессии выражаются в разной интенсивности роста клеток на среде без аденина.

Результаты сравнения исходных и обработанных клонов представлены на рис. 1, а. Столбики на рисунке соответствуют разнице между значениями  $IF_s$  обработанных  $[psi^-]$ -клеток (опытных) и  $IF_f$  исходных  $[PSI^+]$ -клеток (контрольных). Так как IF у обработанных клеток меньше, чем у исходных, DIF, вычисляемая как  $IF_s - IF_f$ , во всех случаях представляет собой отрицательную величину. Поскольку указанные доверительные интервалы нигде не выходят за нулевую отметку, с вероятностью 95 % можно считать, что обработанные  $[PSI^+]$ -клетки как strong- так и weak-типа (как с сильной, так и со слабой супрессией) одновременно с переходом в состояние  $[psi^-]$  понижают величину IF.

В случае обработки  $\text{GuHCl}$   $[psi^-]$ -штаммов в отличие от штаммов  $[PSI^+]$  показатель IF может как понижаться, так и возрастать по сравнению с исходным уровнем. Разные клоны одного и того же штамма при этом могут вести себя по-разному, что приближает к нулю суммарные данные по величине DIF. На рис. 1, б приводятся данные нескольких  $[psi^-]$ -штаммов независимого происхождения. 95%-ные доверительные интервалы DIF оказываются либо незначительно выше нуля, либо перекрывают эту отметку.

Случай, когда IF после обработки  $\text{GuHCl}$  возрастает, нетривиальный, хотя их разъяснение в рамках данной работы не представляется возможным. Все же предлагаем одно из возможных объяснений, кажущееся нам наиболее вероятным. Хотя  $\text{GuHCl}$  «выкуривает» прионы типа  $[PSI^+]$ ,  $[PIN^+]$  и  $[URE3]$ , его эффективность варьирует как у разных штаммов, так и применительно к разным прионам (Chernoff et al., 2002). Действие  $\text{GuHCl}$  на дрожжевые клетки опосредовано шапероном Hsp104p или других аналогичных белков (Ferreira et al., 2001; Kryndushkin et al., 2003). В то же время прион ( $P^{sc}$ ) в клетках млекопитающих не зависит от активности Hsp104p или других аналогичных белков (Herpner, Aguzzi, 2002). Это позволяет предположить, что среди еще неизвестных дрожжевых прионов могут быть и такие, которые высокорезистентны к  $\text{GuHCl}$  и не поддаются изгнанию этим способом. Эта возможность подтверждается наблюдением,

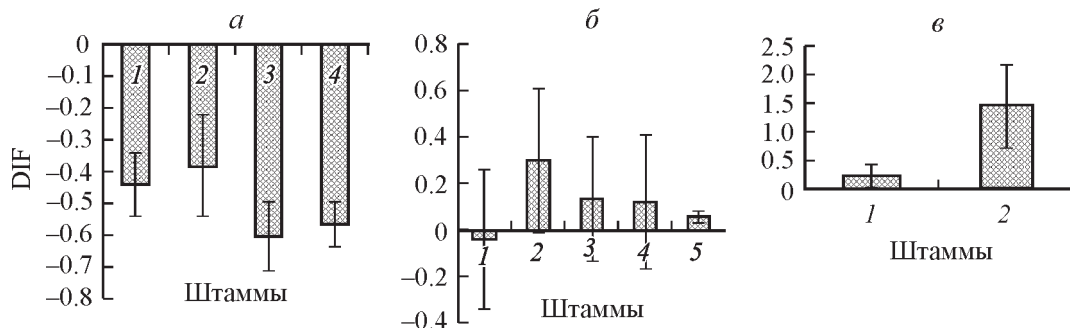


Рис. 1. Действие хлорида гуанидина ( $\text{GuHCl}$ ) на штаммы  $[PSI^+]$  (а) и  $[psi^-]$  (б) и сравнение некоторых изогенных штаммов, различающихся по составу прионов (в).

а: 1 — 74-D[ $PSI^+_{weak}$ ]::Gu — сравнение клонов штамма 74-D694 с его  $[psi^-]$ -изolataми, полученными после обработки  $\text{GuHCl}$ ; 2 — OT55[ $PSI^+_{weak}$ ]::Gu; 3 — OT56/h1[ $PSI^+_{strong}$ ]::Gu; 4 — OT56/7[ $PSI^+_{strong}$ ]::Gu. б: 1 — YPH499::Gu; 2 — K5-5::Gu; 3 — 168t::Gu; 4 — AH/B::Gu; 5 — OT55/a::Gu; ( $[psi^-]$ -клон OT55a получен от  $[PSI^+]$ -штамма OT55, трансформированного плазмидой, несущей ген *HSP104*, с последующей ее элиминацией). в: 1 — 74-D/a [ $PIN^+$ ]::74-D/c[ $pin^-$ ]; 2 — OT56[ $PSI^+_{weak}$ ]::OT55[ $PSI^+_{weak}$ ]. Здесь и далее приводятся величины DIF для сравнения разных пар штаммов. Пары обозначены как «штамм 1(f):штамм 2(s)». В некоторых случаях вместо штамма 2 может стоять обозначение «Gu». Это означает, что штамм 1 сравнивается с его собственными клонами, полученными после обработки  $\text{GuHCl}$ . Вычисленное DIF описывается в разделе «Материал и методика». На рис. 1, в DIF вычисляли как  $(IF_f - IF_s)/IF_s$ . DIF — повышение IF. Вертикальными отрезками указаны 95%-ные доверительные интервалы.



показывающим, что IF у некоторых штаммов  $[PSI^+]$  относительно мало меняется под воздействием  $GnHCl$  (данные приведены ниже). Так как в определенных условиях разные дрожжевые прионы могут проявлять антагонизм в отношении друг друга (Schwimmer, Masison, 2002; Bradley, Liebman, 2003), легко допустить, что благодаря этому антагонизму элиминация одних прионов может привести к увеличению количества других, устойчивых к  $GnHCl$ , прионизируемых белков.

Рис. 1, в иллюстрирует разницу между IF у изогенных штаммов с разными линиями одних и тех же прионов  $[PSI^+]$  (разные линии прионов, происходящие от одного белка, были обнаружены в ряде работ: Kocheneva-Pervukhova et al., 2001; King, Diaz-Avalos, 2004). Мы показали, что в пяти независимых повторях клоны  $[PSI^+]$  strong-типа проявляют более высокую IF, чем изогенные клоны  $[PSI^+]$  weak-типа. Сравнение  $[PIN^+]$  и  $[pin^-]$  изогенных клонов показывает, что разница между ними очень незначительна.

Влияние сверхэкспрессии генов  $HSP104$  и  $SUP35$ . Исследовали две плазмиды, несущие гены, которые влияют на уровень  $[PSI^+]$  и, возможно, других прионов. Плазмида 2 несла  $HSP104$ , а плазмида 3 —  $SUP35$  под контролем индуцибельного промотора  $GAL1,10$ . Известно, что сверхпродукция шаперона Hsp104p приводит к «выкуриванию» фактора  $[PSI^+]$  (Chernoff et al., 1995), перевода клетки в  $[psi^-]$ -состояние. Мы предположили, что если наш спектрофотометрический метод количественной оценки амилоидного пула в клетке адекватен, то конверсия клеток из  $[PSI^+]$ - в  $[psi^-]$ -состояние после введения плазмиды 2 должна сопровождаться понижением IF.

С другой стороны, сверхэкспрессия гена  $SUP35$  после трансформации клеток плазмидой 3, как было показано, приводит к увеличению прионизации продукта этого гена (Chernoff et al., 1993). Мы предположили, что если наш метод адекватен, сверхэкспрессия  $SUP35$  должна сопровождаться увеличением IF.

Трансформанты  $[PSI^+]$ -штаммов OT56 и 74D694, полученные с помощью плазмиды 2, отбирали на синтетической среде без урацила. Клоны  $Ura^+$  высевали на селективную среду, содержащую 2% галактозы. Пересев на эту среду повторяли несколько раз. Сверхпродукция Hsp104p на этой среде уже после первого отсева приводит к появлению красных  $[psi^-]$ -клонов практически в 100% случаев (рис. 2, б, е). Полученное  $[psi^-]$ -состояние устойчиво воспроизводится и после утраты плазмиды. Проводили сравнение IF у  $[PSI^+]$ - и  $[psi^-]$ -клонов одного и того же трансформанта, выросших на среде, содержащей соответственно глюкозу и галактозу.

Результаты сравнения приводятся на рис. 3. Они суммируют данные по десяти трансформантам, полученным с плазмидой 2, и восьми трансформантам с контрольной плазмидой 1. Клоны трансформантов, отобранные на глюкозосодержащей среде и сохранившие  $[PSI^+]$ , действительно обладают значительно более высокой IF, чем клоны тех же трансформантов, отобранные с галактозы и утратившие  $[PSI^+]$ -фактор. На рис. 3 также можно видеть, что нетрансформированные реципиентные  $[PSI^+]$ -клетки имеют большую IF, чем клетки, трансформированные плазмидой 2 и выросшие на галактозе. Разница более выражена для штаммов  $[PSI^+]$  strong-типа, чем для штаммов  $[PSI^+]$  weak-типа. Мы показали, что трансформация контрольной плазмидой 1 не приводит ни к появлению  $[psi^-]$ -клеток среди трансформантов, ни к изменению их IF.

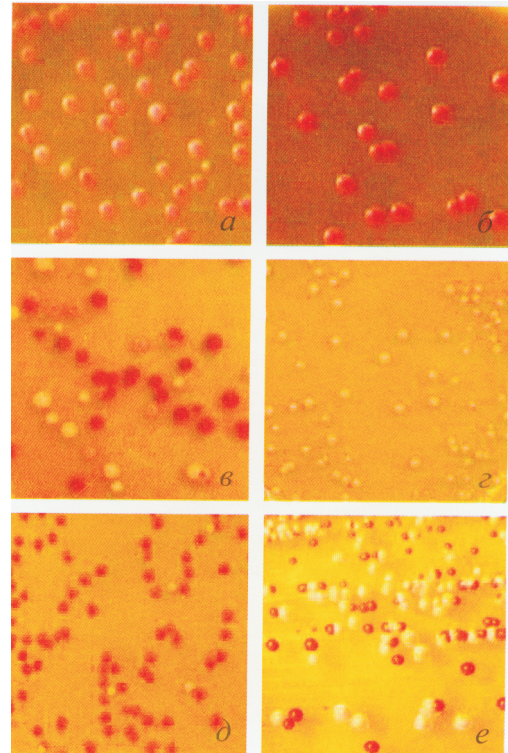


Рис. 2. Клоны трансформантов двух разных  $[PSI^+]$ -штаммов. а–в — трансформанты штамма 74-D, г–е — штамма OT56, получившие плазмиду 1 (а, г), плазмиду 2 (б, д) и плазмиду 3 (в, е).

Трансформируя  $[PSI^+]$ -штаммы плазмидой 3, несущей  $SUP35$  под  $GAL$ -промотором, и последовательно пересевая отобранные трансформанты на галактозосодержащую среду несколько раз, мы получили мозаичные клоны с  $[PSI^+]$ - и  $[psi^-]$ -клетками. Возможно, этот эффект связан с «разбавлением» прионизированного белка Sup35p в результате притока нового неприонизированного белка.

Дополнительное культивирование мозаичных клонов на галактозе приводит к появлению в них значительного количества клеток, в меньшей степени накапливающих красный пигмент, чем исходный 74D694  $[PSI^+_{weak}]$  (см. рис. 2, в). Для тестирования IF отбирали несколько белых

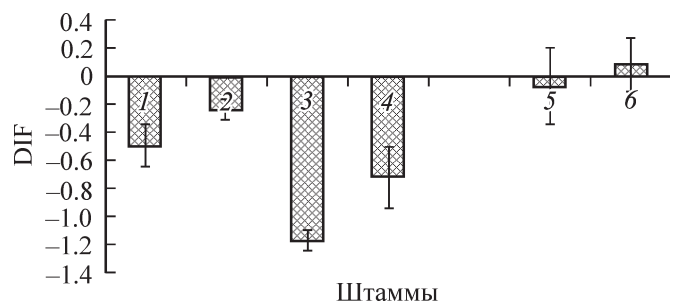


Рис. 3. Значения DIF для клонов, сохранивших  $[PSI^+]$ , и исходных клонов  $[PSI^+]$  в сравнении с клонами, потерявшими  $[PSI^+]$ -фактор в результате сверхэкспрессии гена  $HSP104$ , внешнего плазмидой 2 (1–4). Сравнение IF клонов исходных штаммов с трансформированными плазмидой 1 (5, 6).

1 — 74-D(+) $2[PSI^+]$ ::74-D(+) $2[psi^-]$ ; 2 — 74-D $[PSI^+]$ ::74-D(+) $2[psi^-]$ ; 3 — OT56(+) $2[PSI^+]$ ::OT56(+) $2[psi^-]$ ; 4 — OT56 $[PSI^+]$ ::OT56(+) $2[psi^-]$ ; 5 — 74-D $[PSI^+]$ ::74-D1 $[PSI^+]$ ; 6 — OT56 $[PSI^+]$ ::OT561 $[PSI^+]$ . Трансформанты, полученные после введения различных плазмид, обозначены так, как указано в разделе «Материал и методика».



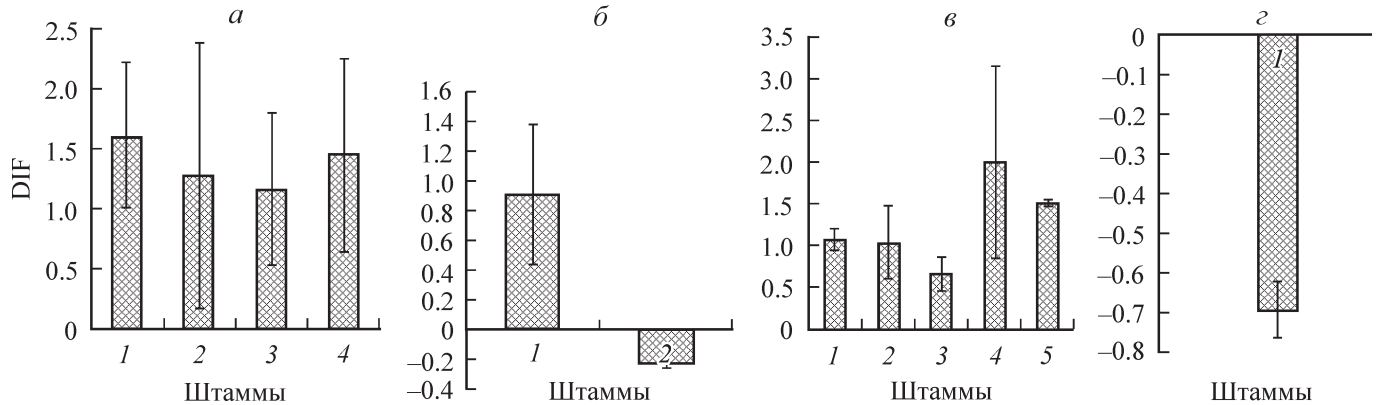


Рис. 4. Сравнение DIF у клонов-трансформантов со сверхэкспрессией гена *SUP35*, внесенного плазмидой 3.

*a* — значения IF у  $[PSI^+]$ -клонов в сравнении с  $[psi^-]$ -клонами, отобранными после индукции сверхэкспрессии гена *SUP35* у штамма, трансформированного плазмидой 3; результаты, полученные на изначально  $[PSI^+_{weak}]$ -штаммах (1, 2) и на изначально  $[PSI^+_{strong}]$ -штаммах (3, 4); 1 — 74-D(+) $3[PSI^+]$ ::74-D(+) $3[psi^-]$ ; 2 — 74-D(-) $3[PSI^+]$ ::74-D(-) $3[psi^-]$ ; 3 — OT56(+) $3[PSI^+]$ ::OT56(+) $3[psi^-]$ ; 4 — OT56(-) $3[PSI^+]$ ::OT56(-) $3[psi^-]$ . DIF вычисляли как  $(IF_r - IF_s)/IF_s$ , *b* — значения IF у  $[PSI^+]$ -клонов, отобранных после индукции сверхэкспрессии гена *SUP35*, в сравнении с клонами исходного штамма; данные, полученные на основе  $[PSI^+_{weak}]$ -штамма (1) и на основе  $[PSI^+_{strong}]$ -штамма (2); 1 — 74-D(+) $3[PSI^+]$ ::74-D(+) $[PSI^+]$ ; 2 — OT56(+) $3[PSI^+]$ ::OT56(+) $[PSI^+]$ ; DIF вычисляли как  $(IF_r - IF_s)/IF_s$ , *v* — сравнение IF у полученных сверхпродуктов Sup35p с исходными или реципиентными штаммами; 1 — 74-D(+) $3E[PSI^+]$ ::74-D(+) $[PSI^+]$ ; 2 — 74-D(+) $3D[PSI^+]$ ::74-D(+) $[PSI^+]$ ; 3 — 74-D(+) $3C[PSI^+]$ ::74-D(+) $[PSI^+]$ ; 4 — 74-D(-) $3A[PSI^+]$ ::74-D(-) $[psi^-]$ ; 5 — OT56(-) $3A[PSI^+]$ ::OT56(-) $[psi^-]$ . DIF вычисляли как  $(IF_r - IF_s)/IF_s$ , *z* — действие GuHCl на IF у клонов-сверхпродуктов Sup35p; 1 — OT56  $3[PSI^+]$ - и 74-D  $3[PSI^+]$ -клоны::Gu.

$[PSI^+]$ - и красных  $[psi^-]$ -клонов, изолированных после вышеописанных процедур. Для штамма OT56  $[PSI^+_{strong}]$  визуальное определение повышенной супрессорной активности было невозможно, так как колонии исходного штамма уже аккумулируют чрезвычайно мало красного пигмента (рис. 2). Поэтому, анализируя трансформанты OT56, мы сравнивали типичные белые  $[PSI^+]$ - и красные  $[psi^-]$ -клоны, выращенные на галактозе.

Кроме того, для трансформации плазмидой 3 использовали  $[psi^-]$ -изоляты от штаммов  $[PSI^+]$  strong- и weak-

1. Скрещивание гаплоидов на полной питательной среде  $p1 MAT\alpha adell-1 [PSI^+] \times p2 MAT\alpha adell-1, kar1-1 [psi^-]$

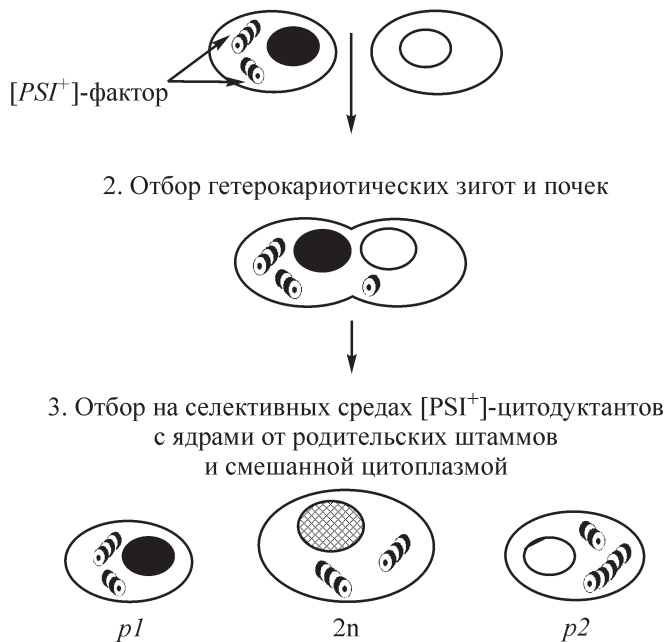


Рис. 5. Схема, иллюстрирующая получение и отбор  $[PSI^+]$ -цитодуктантов при скрещивании между родительскими штаммами  $[PSI^+]$ (*p1*) и  $[psi^-]$ (*p2*).

типа. В этих случаях сверхпродукция Sup35p приводила к конверсии отдельных клеток из  $[psi^-]$ - в  $[PSI^+]$ -состояние, которое стабильно воспроизводилось, несмотря на утрату плазмиды. Для сравнения IF брали  $[PSI^+]$ -клоны трансформантов, выросшие на галактозе, и те же клоны трансформантов, выросшие на обычной среде с глюкозой и поэтому в отсутствие сверхпродукции Sup35p сохранившие  $[psi^-]$ -состояние.

На рис. 4 суммированы данные, полученные на 16 независимых трансформантах. Клоны  $[PSI^+]$  и  $[psi^-]$ , полученные в результате сверхпродукции Sup35p, как у  $[PSI^+]$ -, так и  $[psi^-]$ -реципиентных штаммов проявляют значительные различия по величине IF.  $[PSI^+]$ -трансформанты всегда превосходят  $[psi^-]$ -изоляты (рис. 4, *a*). В то же время если белые  $[PSI^+]$ -трансформанты штамма 74D694 со слабой супрессией имеют IF, превосходящую IF исходного родительского штамма, то различия между белыми трансформантами штамма OT56 с сильной (strong) супрессией и его исходными клетками не наблюдается (рис. 4, *b*). Очевидно, это связано с возможностью селекции сверхпродуктов по Sup35p на фоне изначально-

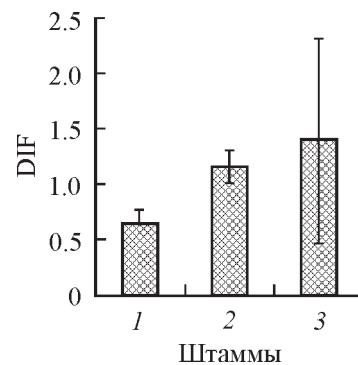


Рис. 6. Сравнение цитодуктантов и реципиентных штаммов по величине IF.

1 — C[74-D(+)]B $[PSI^+]$ ::AH/B $[psi^-]$ ; 2 — C[OT56/7(+)]B $[PSI^+]$ ::AH/B $[psi^-]$ ; 3 — C[OT56/h1(+)]B $[PSI^+]$ ::AH/B $[psi^-]$ . DIF вычисляли как  $(IF_r - IF_s)/IF_s$ .

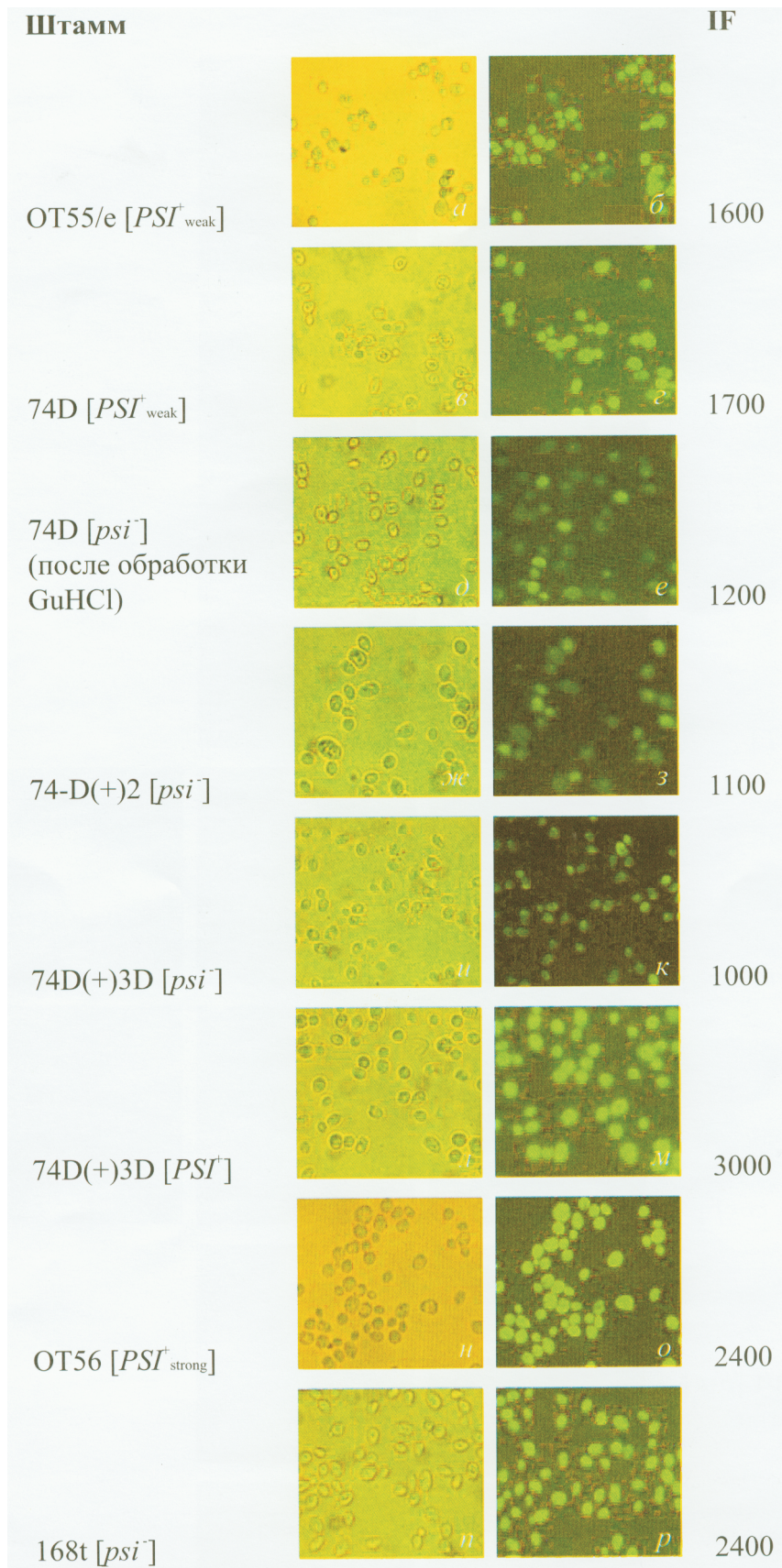
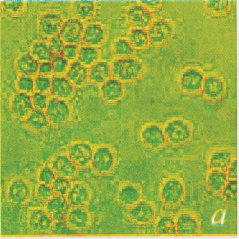
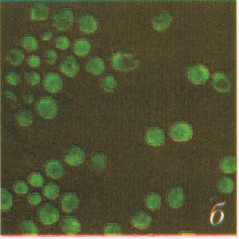
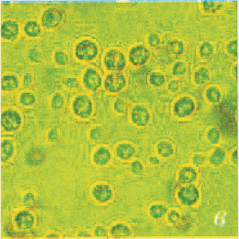
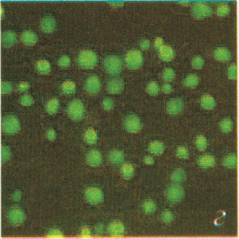
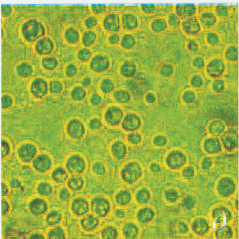
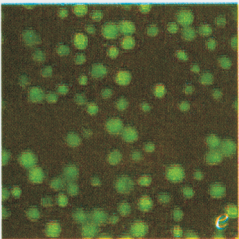
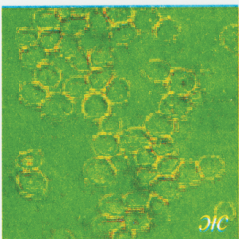
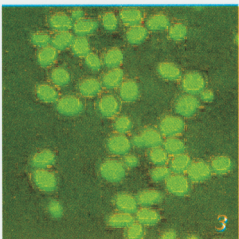
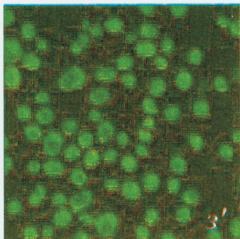
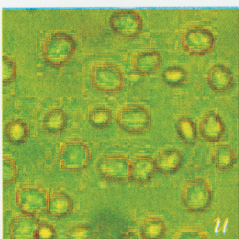
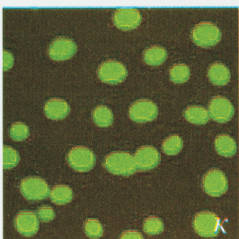
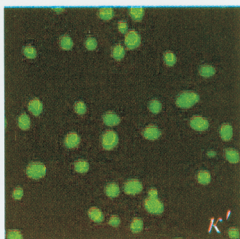
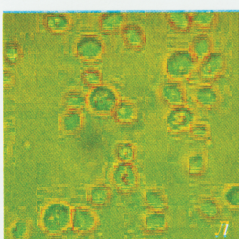
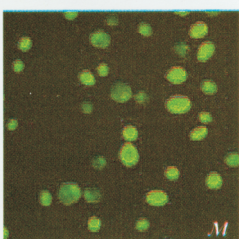
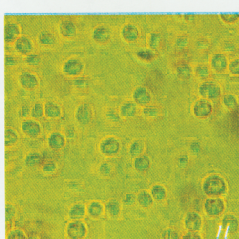
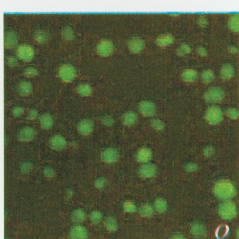


Рис. 7. Флуоресценция при окрашивании [ $psi^{-}$ ]-, [ $PSI^{+}_{weak}$ ]- и [ $PSI^{+}_{strong}$ ]-клеток разного происхождения тиофлавином T in vivo. *a, в, д, ж, и, л, н, п* — видимый свет; *б, г, е, з, к, м, о, р* — UV-пульс, 1 с. Названия и состояние [ $PSI$ ]-фактора для штаммов указаны на рисунке. Обозначения трансформантов, получивших плазмиды с генами *HSP104* (№ 2) и *SUP35* (№ 3), см. в разделе «Материал и методика». В правой колонке показаны оценки IF.



Штамм			IF	
АН/В [ $psi^-$ ]			1200	
С[74D(+)]В [ $PSI^{+weak}$ ]			2900	
С[74D(-)]В [ $psi^-$ ]			1500	
С[ОТ56(+)]В [ $PSI^{+strong}$ ]				3700
С[74D(+)]3D]В [ $PSI^{+}$ ]				6500
С[74D(+)]3D]В/1 [ $psi^-$ ] (после обработки GuHCl)			2200	
С[74D(+)]3D]В/2 [ $psi^-$ ] (после обработки GuHCl)			1500	



но слабой супрессии (weak) и отсутствием такой возможности на фоне супрессии strong-типа.

Результаты повторного тестирования индивидуальных клонов трансформантов с высоким уровнем супрессии и высоким значением IF свидетельствуют о том, что высокий уровень амилоидных прионов может быть достаточно стабильным (рис. 4, в). Обработка  $\text{GuHCl}$  таких клонов приводит к значительному падению величины IF (рис. 4, г).

Цитодукция использовалась нами как метод получения митотических потомков зигот со смешанной цитоплазмой, отошедшей к одному из родительских ядер. В качестве донора  $[PSI^+]$  использовали штаммы 74-D694 или OT56, а в качестве реципиента  $[PSI^+]$  — штамм АН/В, несущий *kar1-1* мутацию и нонсенс-мутацию *adel-14*, супрессируемую  $[PSI^+]$ . Благодаря мутации *kar1-1* в зиготах от скрещивания родительских штаммов кариогамия отстает от начала почкования. Зиготы отделяли микроманипулированием и выросшие зиготические клоны анализировали на селективной среде (рис. 5). Таким образом отбирали клоны, получившие ядро от АН/В со смешанной цитоплазмой, несущей  $[PSI^+]$ -фактор. У 14 независимых цитодуктантов была проверена IF. У всех  $[PSI^+]$ -цитодуктантов IF оказалась выше, чем у исходного реципиентного штамма (рис. 6).

Окрашивание целых клеток тиофлавином Т. Результаты окрашивания целых дрожжевых клеток тиофлавином Т соответствуют данным по интенсивности флуоресценции их грубых лизатов (рис. 7, 8). Клетки штамма 168t, возможно, заслуживают особого внимания, так как они проявляют высокую интенсивность флуоресценции как *in vivo*, так и в грубых лизатах. Наравне с некоторыми цитодуктантами они являются кандидатами для поиска новых прионов.

Таким образом, при 4 разных постановках опыта, где различными способами меняли количество «модельного» приона,  $[PSI^+]$ , одновременно с изменением фенотипа (исчезновением, усилением или уменьшением супрессии мутации *adel-14*) мы наблюдали соответствующие изменения IF. Выявлены штаммы, которые могут служить исходным материалом для поиска новых прионов.

Мы благодарим сотрудников кафедры генетики С.-Петербургского государственного университета Л. Н. Мионову, Г. А. Журавлеву и А. С. Борхсениуса за предоставление дрожжевых штаммов и плазмид и О. В. Степаненко за помощь в экспериментах. Мы благодарим Ю. О. Чернова за полезные дискуссии и предоставление дрожжевых штаммов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 06-04-48324-а) и С.-Петербургского научного центра РАН.

### Список литературы

- Закс Л. 1976. Статистическое оценивание. М.: Статистика. 598 с.  
Северин С. Е., Соловьев Г. А. 1989. Практикум по биохимии. М.: Изд-во МГУ. 508 с.

Bradley M. E., Liebman S. W. 2003. Destabilizing interactions among  $[PSI^+]$  and  $[PIN^+]$  yeast prion variants. *Genetics*. 165 : 1675—1685.

Chernoff Y. O. 2004. Cellular control of prion formation and propagation in yeast. In: Prions and prion diseases: current perspectives. Wymondham: Horizon Bioscience. 257—303.

Chernoff Y. O., Derkatch J. L., Inge-Vechtomov S. G. 1993. Multicopy *SUP35* gene induces *de novo* appearance of psi-like factors in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* 24 : 268—270.

Chernoff Y. O., Lindquist S. L., Ono B., Inge-Vechtomov S. G., Liebman S. W. 1995. Role of the chaperone protein hsp104 in propagation of the yeast prion-like factor  $[PSI^+]$ . *Science*. 268 : 880—884.

Chernoff Y. O., Newnam G. P., Kumar J., Allen K., Zink A. D. 1999. Evidence of a protein mutator in yeast: role of the Hsp70-related chaperone Ssb in formation, stability, and toxicity of the  $[PSI]$  prion. *Mol. Cell. Biol.* 19 : 8103—8112.

Chernoff Y. O., Uptain S. M., Lindquist S. L. 2002. Analysis of prion factors in yeast. *Meth. Enzymol.* 351 : 499—537.

Derkatch J. L., Bradley M. E., Zhou P., Chernoff Y. O., Liebman S. W. 1997. Genetic and environmental factors affecting the *de novo* appearance of the  $[PSI^+]$  prion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 147 : 507—519.

Ferreira P. C., Ness F., Edwards S. R., Cox B. S., Tuite M. F. 2001. The elimination of yeast  $[PSI^+]$  prion by guanidine hydrochloride is the result of Hsp104 inactivation. *Mol. Microbiol.* 40 : 1357—1369.

Heppner F. L., Aguzzi A. 2002. Prions. Nature publishing group encyclopedia of life sciences. Nature Publishing Group, www.els.net

Kimura Y., Koitabashi S., Kakizuka A., Fujita T. 2003. Analysis of yeast prion aggregates with amyloid-staining compound *in vivo*. *Cell. Struct. Funct.* 28 : 187—193.

King C. Y., Diaz-Avalos R. 2004. Protein only transmission of three yeast prion strains. *Nature*. 428 : 323—328.

Kocheneva-Pervukhova N. V., Chechenova M. B., Valouev I. A., Kushnirov V. V., Smirnov V. N., Ter-Avanesyan M. D. 2001.  $[PSI^+]$  prion generation in yeast: characterization of the «strain» difference. *Yeast*. 18 : 489—497.

Kryndushkin D. S., Alexandrov I. M., Ter-Avanesyan M. D., Kushnirov V. C. 2003. Yeast  $[PSI^+]$  protein aggregates are formed by small Sup35 polymers fragmented by Hsp104. *J. Biol. Chem.* 278 : 49 636—49 643.

Michelitsch M. D., Weissman J. C. 2000. A census of glutamine/asparagine-rich regions: implications for their conserved function and the prediction of novel prions. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 97 : 11 910—11 915.

Nevezglyadova O. V., Artyomov A. V., Gaivoronskii A. A., Soidla T. R. 2002. Concealed nuclei in *Saccharomyces* strains (MiniReview). *FEMS Yeast Research*. 2 : 471—479.

Nevezglyadova O. V., Artyomov A. V., Mikhailova E. V., Soidla T. R. 2004. The impact of manipulations with cytoplasmically inherited factors on nuclear transmission and degradation in yeast heterokaryons. *Curr. Genet.* 45 : 273—282.

Nevezglyadova O. V., Artyomov A. V., Mikhailova E. V., Soidla T. R. 2005. Bud selection and apoptosis-like degradation of nuclei in yeast heterokaryons: a KAR1 effect. *Mol. Gen. Genomics*. 274 : 419—427.

Ross E. D., Baxa U., Wickner R. B. 2004. Scrambled prion domains form prions and amyloid. *Mol. Cell. Biol.* 24 : 7206—7213.

Ross E. D., Minton A., Wickner R. B. 2005. Prion domains: sequences, structures and interactions. *Nature Cell. Biol.* 7 : 1039—1044.

Schwimmer C., Masison D. C. 2002. Antagonistic interaction between yeast  $[PSI^+]$  and  $[URE3]$  prions and curing of  $[URE3]$  by

Рис. 8. Флуоресценция клеток штамма АН/В и его производных, несущих цитоплазму разных родителей, при окрашивании тиофлавином Т.

а, в, д, ж, и, л, н — видимый свет; б, г, е, з, к, м, о — UV-пульс, 1 с; з', к' — UV-пульс, 0,5 с. Названия и состояние  $[PSI]$ -фактора для штаммов указаны на рисунке. Обозначения цитодуктантов см. в разделе «Материал и методика». В правой колонке показаны оценки IF.

Hsp70 protein chaperon Ssa1p but not by Ssa2p. *Mol. Cell. Biol.* 22 : 3590—3598.

Sherman F., Fink G. R., Hicks J. B. 1986. Laboratory course manual for methods in yeast genetics. New York: Cold Spring Harbor Lab. Press. 186 p.

True H. L., Berlin I., Lindquist S. L. 2004. Epigenetic regulation of translation reveals hidden genetic variation to produce complex traits. *Nature*. 431 : 184—187.

True H. L., Lindquist S. L. 2000. A yeast prion provides a mechanism for genetic variation and phenotypic diversity. *Nature*. 407 : 477—483.

Voropai E. S., Samtsov M. P., Kaplevskii K. N., Maskevich A. A., Stepuro V. I., Povarova O. I., Kuznetsova I. M., Turoverov K. K., Fink A. L., Uverskii V. N. 2003. Spectral properties of Thioflavin T and its complexes with amyloid fibrils. *J. Appl. Spectroscopy*. 70 : 868—874.

Zakharov I. A., Yarovoy B. 1977. Cytoduction as a new tool in studying the cytoplasmic heredity in yeast. *Mol. Cell. Biochem.* 14 : 15—18.

Поступила 4 IV 2006

## ESTIMATING OF CHANGES IN THE AMYLOID AND PRION CONTENT OF YEAST CELLS

O. V. Nevzglyadova,<sup>1</sup> I. M. Kuznetsova, A. V. Artyomov, E. V. Mikhailova, K. K. Turoverov, T. R. Soidla

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg; e-mail: oneva@mail.cytspb.rssi.ru

An attempt was made at estimating the overall amyloid content of yeast cells by treating crude cellular lysates with thioflavin T, the agent specifically staining amyloid fibrils. We demonstrated that overproduction of the yeast chaperone Hsp104p, as well as GuHCl treatment of the  $[PSI^+]$  cells led both to elimination of the  $[PSI^+]$  factor and to a stable decrease of the overall amyloid content estimated by intensity of fluorescence (IF) of the thioflavin T. At the same time, overexpression of gene *SUP35*, coding the protein prionizable to  $[PSI^+]$ , led to generation of  $[PSI^+]$  clones with higher IF of thioflavin T. Cytoduction in the crosses involving PSI factor leads to considerable enhancement of IF; cytoductants with the nucleus of the recipient  $[psi^-]$  strain not only got  $[PSI^+]$  factor from the donor strain but also increased their amyloid content. In these model experiments all treatments modifying one of the yeast prions,  $[PSI^+]$  factor, led to a predictable shift of IF of thioflavin T that behaved like a cytoplasmic hereditary determinant. The data obtained show that IF of thioflavin T staining gives reliable estimates of cellular amyloid content and that mitotically stable shift of IF after a battery of treatments modifying cellular prion set provides quantitative estimate of the input of prionizable protein molecules to the amyloid pool. The combination of thioflavin staining and prionotropic treatments applied here can be possibly used for future attempts of checking yeast strains for cryptic prions.

Key words: prion, amyloid, heterokaryon, cytoduction, *Saccharomyces cerevisiae*.