

УДК 577.214.6

## **Rpn4p БЕЗ ДНК-СВЯЗЫВАЮЩЕГО ДОМЕНА ОБЕСПЕЧИВАЕТ УСТОЙЧИВОСТЬ *Saccharomyces cerevisiae* К ОКИСЛИТЕЛЬНОМУ СТРЕССУ И ЦИКЛОГЕКСИМИДУ**

© 2022 г. Д. С. Карпов<sup>а, \*</sup>, Д. С. Спаская<sup>а</sup>, В. В. Тютяева<sup>а</sup>, В. Л. Карпов<sup>б</sup>

<sup>а</sup>Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины, Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

<sup>б</sup>Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

\*e-mail: aleom@yandex.ru

Поступила в редакцию 12.02.2022 г.

После доработки 09.03.2022 г.

Принята к публикации 09.03.2022 г.

Убиквитин-протеасомная система участвует в контроле всех основных молекулярных процессов в норме и реакции клеток на стрессовые воздействия. Rpn4p служит ключевым транскрипционным регулятором протеасомы у дрожжей класса *Saccharomycetes* и участвует также в ответе клеток на различные стрессовые воздействия. Помимо протеасомных генов, Rpn4 влияет на экспрессию нескольких сотен других, включая гены, вовлеченные в репарацию ДНК и ответ на окислительный стресс. В то же время молекулярные механизмы, используемые Rpn4 в контроле генов-мишеней и функционировании как регулятора ответа клеток на стрессовые условия, остаются во многом неясными. Цель работы состояла в определении доменов Rpn4, необходимых для обеспечения устойчивости клеток к стрессовым воздействиям. Показано, что N-концевая и центральная части белка, содержат участки, необходимые для устойчивости ко всем видам стресса. Предполагаемый сигнал ядерной локализации не влияет на функционирование Rpn4. Неожиданно белок с делецией обоих мотивов “цинковых пальцев”, образующих ДНК-связывающий домен, обеспечивал устойчивость дрожжей к окислительному стрессу и циклогексимиду. Более того, нами показано, что Rpn4 может привлекаться к промоторным областям регулируемых им генов даже в том случае, если они не содержат его сайтов связывания. На основании полученных данных можно предполагать, что Rpn4 участвует в регуляции генов и ответе клеток на стресс за счет белок-белковых взаимодействий.

**Ключевые слова:** Rpn4p, делеционный анализ, ДНК-связывающий домен, окислительный стресс

**DOI:** 10.31857/S002689842204005X

Убиквитин-протеасомная система (УПС) включает в себя семейство ферментов, распознающих белковые субстраты и модифицирующих их ковалентно цепями небольшого белка убиквитина (масса около 8.5 кДа), и мультисубъединичный АТР-зависимый протеиназный комплекс – протеасому, куда доставляются полиубиквитинированные субстраты и где происходит отщепление от них полиубиквитиновых цепей, разворачивание белков и их расщепление до пептидов [1]. Основные функ-

ции УПС заключаются в контроле активности регуляторных белков и расщеплении белков, структура которых нарушена вследствие ошибок в экспрессии генетической информации или под действием стрессовых условий [2]. УПС участвует в протекании всех основных клеточных процессов и необходима в клеточном ответе на различные виды стресса. Нарушение функционирования УПС влечет развитие тяжелых нейродегенеративных заболеваний, дистрофию мышц, нарушение иммунно-

Сокращения: УПС – убиквитин-протеасомная система; 3-АТ (3-amino-1,2,4-triazol) – 3-амино-1,2,4-триазол; CAD (C-terminal acidic domain) – С-концевой “кислый домен”; CZnF (C-terminal zinc finger domain) – С-концевой домен “цинкового пальца”; DamID (Dam identification) – метод картирования участков генома, взаимодействующих с белками, с использованием ДНК-метилазы *Escherichia coli*; MACE (*MAGI*-associated control element) – регуляторный элемент, ассоциированный с геном *MAGI*; NAD (N-terminal acidic domain) – N-концевой “кислый домен”; NLS (nuclear localization signal) – сигнал ядерной локализации; NTAD (N-terminal transactivation domain) – N-концевой трансактиваторный домен; NZnF (N-terminal zinc finger domain) – N-концевой домен “цинкового пальца”; PACE (proteasome associated control element) – регуляторный элемент, ассоциированный с протеасомными генами; RACE (*RPN8*-associated control element) – регуляторный элемент, ассоциированный с геном *RPN8*; Rpn (regulatory particle non-ATPase) – не-АТФазная субъединица регуляторного комплекса протеасомы; Rpt (regulatory particle triple-A protein) – АТФазная субъединица регуляторного комплекса протеасомы; а.о. – аминокислотный остаток.

го ответа и т.д. [2]. Активность УПС контролируется на различных уровнях, включая экспрессию генов. Так, активность протеасом у всех эукариот регулируется по механизму отрицательной обратной связи с участием Rpn4-подобных факторов транскрипции у низших эукариот (дрожжей) [3, 4] или факторов транскрипции высококонсервативного семейства Cap-N-Collar у высших эукариот [5]. Следует отметить, что экспрессия протеасомных генов регулируется координированно и большая часть промоторных областей этих генов содержит сайты связывания соответствующих факторов [6]. У дрожжей класса *Saccharomycetes* Rpn4-подобные факторы транскрипции взаимодействуют с довольно консервативными элементами, называемыми PACE (Proteasome-Associated Control Element) за счет С-концевого ДНК-связывающего домена, содержащего два “цинковых пальца” [3, 4, 7]. В N-концевой и центральной части Rpn4p нами и другими авторами картированы трансактиваторные домены [8–10]. Ранее М. Nelson и соавт. [11] предположили, что фрагмент полипептидной цепи 381–398 этого белка представляет собой сигнал ядерной локализации Rpn4p и экспериментально показали локализацию Rpn4p в ядре.

Помимо протеасомных генов Rpn4p участвует в регуляции экспрессии нескольких сотен других дрожжевых генов [12], по-видимому, используя при этом как PACE, так и PACE-подобные элементы, обозначенные как MACE (*MAG1*-associated control element) и RACE (*RPN8*-associated control element) [13], а также укороченную GC-богатую часть сайта связывания – так называемый PACE-core [14]. В частности, нами показана Rpn4-зависимая регуляция экспрессии генов нескольких путей репарации ДНК [15, 16], а также генов, вовлеченных в ответ клеток на окислительный стресс [17]. Нами и другими авторами показано, что Rpn4 участвует в клеточном ответе на различные виды стресса, включая ДНК-повреждающие агенты, тяжелые металлы, аналоги аминокислот, циклогексимид, окислительные агенты [10, 16–18]. Несмотря на успехи в изучении структуры и функций Rpn4p, до сих пор не выяснены молекулярные механизмы, которые этот фактор задействует для выполнения роли регулятора транскрипции, а также регулятора клеточного ответа на стрессовые воздействия.

Цель представленной работы заключалась в идентификации доменов Rpn4p, необходимых для обеспечения устойчивости клетки к действию солей тяжелых металлов, окислительному стрессу и циклогексимиду.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Штаммы и условия их выращивания.** В работе использовали штаммы *Saccharomyces cerevisiae*

334t *rpn4*-Δ (MATα, *pep4*-3, *prb1*-1122, *ura3*-52, *leu2*-3,112, *reg1*-501, *gal1*, *rpn4*::*G418*) с делецией гена *RPN4* [8], штамм дикого типа BY4742 (MATα, *his3D1*, *leu2D0*, *lys2D0*, *ura3D0*) (“Euroscarf”, Германия) и производные от него мутантные штаммы *rpn4*-Δ (BY4742 YDL020c::kanMX4) (“Euroscarf”) и YPL (BY4742 *pre1-8 nat+*) [15], а также штамм PJ69-4A (MATα, *trp1*-901, *leu2*-3,112, *ura3*-52, *his3*-200, *gal4*-Δ, *gal80*-Δ, *LYS2*::*GAL1-HIS3*, *GAL2-ADE2*, *met2*::*GAL7-lacZ*) [19]. Дрожжевые культуры растили при 30°C на среде YPD (2% глюкозы, 2% пептона, 1% дрожжевого экстракта) и трансформировали, используя литий-ацетатный метод [20]. Штаммы, трансформированные экспрессионными плазмидами, выращивали в минимальной среде, содержащей YNB (6.7 г/л), смесь 20 аминокислот, глюкозу (2%), а также козаминовые кислоты (0.5%) без добавления урацила. В случае двугибридной системы дрожжевые трансформанты растили на селективной среде без триптофана, лейцина, гистидина и аденина. Использовали компоненты питательных сред производства “Sigma” (США). Плазмиды, использованные в работе, описаны в табл. 1.

**Получение плазмид pPRPN4ΔNLS и pPRPN4ΔNZnF.** Варианты гена *RPN4*, содержащие делецию предполагаемого сигнала ядерной локализации и N-концевого “цинкового пальца”, получали путем двухстадийного сайт-направленного мутагенеза с помощью высокоточной ДНК-полимеразы KAPA HiFi (“Roche Molecular Systems, Inc.”, США), используя пары праймеров *RPN4*-NcoI-F/*RPN4*-ΔNLS-R и *RPN4*-ΔNLS-F/*Rpn4*-XhoI-R и *RPN4*-NcoI-F/*RPN4*-ΔNZnF-R и *RPN4*-ΔNZnF-F/*Rpn4*-XhoI-R (табл. 2) соответственно. Полученные ПЦР-фрагменты очищали с использованием набора GeneJET PCR Purification Kit (“Thermo Fisher Scientific”, США) и клонировали в вектор pPDX2 по сайтам эндонуклеаз BamHI и XhoI. Отсутствие посторонних мутаций и наличие целевых делеций в последовательностях клонированных фрагментов проверяли секвенированием.

**Двугибридная дрожжевая система.** Гены *RPN2*, *NAS2* и *RPN4* амплифицировали с геномной ДНК дрожжей с помощью высокоточной ДНК-полимеразы KAPA HiFi (“Roche Molecular Systems, Inc.”), используя пары праймеров *RPN2*-EcoRI-F/*RPN2*-XhoI-R, *NAS2*-NcoI-F/*XhoI*-R и *RPN4*-NcoI-F/*RPN4*-XhoI-R. Полученные ПЦР-фрагменты очищали с помощью набора GeneJET PCR Purification Kit (“Thermo Fisher Scientific”). ПЦР-фрагмент гена *RPN2* обрабатывали эндонуклеазой EcoRI и XhoI и клонировали в векторы pGBT9 и pGAD424, гидролизованные по сайтам эндонуклеаз EcoRI и SalI. Сайты XhoI и SalI после гидролиза соответствующими эндонуклеазами образуют комплементарные липкие концы. Отсутствие посторонних мутаций в последовательностях кло-

**Таблица 1.** Плазмиды, использованные в работе

Название плазмиды	Описание плазмиды	Источник
pRS426	Высококопийный (2 $\mu$ ) шаттл-вектор для клонирования	[21]
YCpLac33	Низкокопийный (CEN) шаттл-вектор для клонирования	[22]
Ycp-Ub-dam	Вектор YCpLac33, кодирующий Dam-метиразу <i>Escherichia coli</i> с присоединенным убиквитинзависимым дегроном Rpn4p	[23]
YCp-GDR	Вектор YCpLac33, кодирующий Rpn4p, к которому с N-конца присоединена Dam-метиლაза; экспрессия химерного гена контролируется промотором <i>GAL1</i>	[23]
YCp-GDR-C/A	Вектор YCpLac33, кодирующий мутантный Rpn4p с заменой кодонов цистеина на кодоны аланина в позициях 450, 477, 480, к которому с N-конца присоединена Dam-метиლაза	[23]
YCp-GDR- $\Delta$ NCZnF	Вектор YCpLac33, кодирующий мутантный Rpn4p с делецией ДНК-связывающего домена, к которому с N-конца присоединена Dam-метиლაза	Данная работа
pPDX2-GAL	Высококопийный дрожжевой экспрессионный шаттл-вектор	[24]
pPRPN4	Вектор pPDX2-GAL, кодирующий полноразмерный белок Rpn4p под контролем <i>GAL1</i> промотора	[8]
pPRPN4 $\Delta$ 56	Вектор pPDX2-GAL, кодирующий Rpn4p с делецией 56 N-концевых а.о., под контролем <i>GAL1</i> промотора	[8]
pPRPN4 $\Delta$ 109	Вектор pPDX2-GAL, кодирующий Rpn4p с делецией 109 N-концевых а.о., под контролем <i>GAL1</i> промотора	[8]
pPRPN4 $\Delta$ 151	Вектор pPDX2-GAL, кодирующий Rpn4p с делецией 151 N-концевых а.о., под контролем <i>GAL1</i> промотора	[8]
pPRPN4 $\Delta$ 180	Вектор pPDX2-GAL, кодирующий Rpn4p с делецией 180 N-концевых а.о., под контролем <i>GAL1</i> промотора	[8]
pPRPN4 $\Delta$ 210	Вектор pPDX2-GAL, кодирующий Rpn4p с делецией 210 N-концевых а.о., под контролем <i>GAL1</i> промотора	[8]
pPRPN4 $\Delta$ NAD	Вектор pPDX2-GAL, кодирующий Rpn4p с делецией N-кислого домена под контролем <i>GAL1</i> промотора	[8]
pPRPN4 $\Delta$ CAD	Вектор pPDX2-GAL, кодирующий Rpn4p с делецией C-кислого домена под контролем <i>GAL1</i> промотора	[8]
pPRPN4 $\Delta$ NCAD	Вектор pPDX2-GAL, кодирующий Rpn4p с делецией обоих кислых доменов, включая участок между ними, под контролем <i>GAL1</i> промотора	[8]
pPRPN4 $\Delta$ NLS	Вектор pPDX2-GAL, кодирующий Rpn4p с делецией предполагаемого сигнала ядерной локализации под контролем <i>GAL1</i> промотора	Данная работа
pPRPN4 $\Delta$ NZnF	Вектор pPDX2-GAL, кодирующий Rpn4p с делецией предполагаемого N-цинкового пальца под контролем <i>GAL1</i> промотора	Данная работа
pPRPN4 $\Delta$ NCZnF	Вектор pPDX2-GAL, кодирующий Rpn4p с делецией обоих цинковых пальцев под контролем <i>GAL1</i> промотора	[25]
pPRPN4(4K-R)	Вектор pPDX2-GAL, кодирующий Rpn4p с заменой четырех остатков лизина на остатки аргинина в главном N-концевом трансактиваторном домене	[8]

Таблица 1. Окончание

Название плазмиды	Описание плазмиды	Источник
pGBT9	Дрожжевой вектор двугибридной системы, кодирующий ДНК-связывающий домен фактора транскрипции Gal4p	“Takara Bio”, Saint-Germain-en-Laye, Франция
pGAD424	Дрожжевой вектор двугибридной системы, кодирующий трансактиваторный домен фактора транскрипции Gal4p	“Takara Bio”, Saint-Germain-en-Laye, Франция
pGBT-Su(Hw)	Вектор pGBT9 с геном белка Su(Hw) <i>Drosophila melanogaster</i> , клонированным в одной рамке считывания с участком, кодирующим ДНК-связывающий домен Gal4p	[26]
pGAD-mod	Вектор pGAD424 с геном белка Mod(mdg4)-67.2 <i>D. melanogaster</i> , клонированным в одной рамке считывания с участком, кодирующим трансактиваторный домен Gal4p	[26]
pGBT10	Вектор, производный от pGBT9 и содержащий сайт NcoI	Данная работа
pGAD425	Вектор, производный от pGAD424 и содержащий сайт NcoI	Данная работа
pGBT-Rpn2	Вектор pGBT9 с геном <i>RPN2</i> , клонированным в одной рамке считывания с участком, кодирующим ДНК-связывающий домен Gal4p	Данная работа
pGAD-Rpn2	Вектор pGAD424 с геном <i>RPN2</i> , клонированным в одной рамке считывания с участком, кодирующим трансактиваторный домен Gal4p	Данная работа
pGBT-Nas2	Вектор pGBT10 с геном <i>NAS2</i> , клонированным в одной рамке считывания с участком, кодирующим ДНК-связывающий домен Gal4p	Данная работа
pGAD-Nas2	Вектор pGAD425 с геном <i>NAS2</i> , клонированным в одной рамке считывания с участком, кодирующим трансактиваторный домен Gal4p	Данная работа
pGBT-Rpn4	Вектор pGBT10 с геном <i>RPN4</i> , клонированным в одной рамке считывания с участком, кодирующим ДНК-связывающий домен Gal4p	Данная работа
pGAD-Rpn4	Вектор pGAD425 с геном <i>RPN4</i> , клонированным в одной рамке считывания с участком, кодирующим трансактиваторный домен Gal4p	Данная работа

нированных фрагментов проверяли секвенированием. Полученные плазмиды назвали pGBT-Rpn2 и pGAD-Rpn2 (табл. 1).

Перед клонированием генов *NAS2* и *RPN4* в векторы двугибридной системы ввели сайт NcoI. Векторы pGAD424 и pGBT9 обрабатывали эндонуклеазой EcoRI и лигировали с двухцепочечным олигонуклеотидом, имеющим липкие концы, комплементарные EcoRI, и образованным путем отжига олигонуклеотидов – pGAD-GBT-iMCS-F/pGAD-GBT-iMCS-R. Наличие вставки олигонуклеотида проверяли путем рестрикционного анализа по сайтам NcoI и PvuI с последующим секвенированием. Полученные плазмиды назвали pGAD425 и pGAD10. ПЦР-фрагменты генов *NAS2* и *RPN4* очищали набором GeneJET PCR Purification Kit (“Thermo Fisher Scientific”), обрабатывали эндонуклеазами NcoI и XhoI и клонировали в модифицированные векторы дву-

гибридной системы, обработанные эндонуклеазами NcoI и SalI. Отсутствие посторонних мутаций в последовательностях клонированных фрагментов проверяли секвенированием. Полученные плазмиды назвали pGBT-Rpn4, pGBT-Nas2, pGAD-Rpn4 и pGAD-Nas2 (табл. 1).

Штамм PJ69-4а котрансформировали парой плазмид, производных векторов pGBT9 и pGAD424, с помощью стандартного литий-ацетатного метода [20]. Колонии выращивали на селективной среде без триптофана и лейцина. Затем колонии рассеивали штрихом на чашках Петри с агаризованной селективной средой без триптофана, лейцина, гистидина и аденина в присутствии 5 мМ 3-амино-1,2,4-триазола (3-АТ) в качестве ингибитора фоновой активации экспрессии гена *HIS3*. Чашки инкубировали при 30°C в течение 2–3 суток.

**Определение устойчивости дрожжей к стрессовым условиям путем выращивания серийных разведений дрожжевой культуры на чашках Петри.** Дрожжевые культуры растили до стационарной фазы в течение ночи при 30°C. Культуры разводили до конечной оптической плотности  $OD_{600} = 1$ , готовили пятикратные разведения и высевали на твердую селективную среду с добавлением стрессовых агентов в виде капель объемом 5 мкл. В контроле штаммы растили на среде без добавления стрессовых агентов. Устойчивость к стрессу исследуемых дрожжевых штаммов определяли качественно по скорости формирования колоний при 30°C.

**Определение активности Dam-метиلاзы (DamID).** Плазмиду YCr-GDR- $\Delta$ NCZnF, кодирующую химерный белок Dam-Rpn4 $\Delta$ NCZnF с делецией ДНК-связывающего домена, получали путем клонирования ПЦР-фрагмента гена *RPN4*, полученного с праймерами RPN4-NcoI-F и RPN4- $\Delta$ NCZnF-R, в плазмиду YCr-GDR по сайтам NcoI и XhoI. Отсутствие посторонних мутаций в последовательностях клонированных фрагментов проверяли секвенированием.

Клетки штамма *rpn4- $\Delta$* , продуцирующие Dam-метилазу, соединенную с убиквитинзависимым деградом Rpn4 (U-dam), гибридный белок Dam-Rpn4 или гибридные белки Dam-Rpn4-C/A и Dam-Rpn4 $\Delta$ NCZnF с нарушенной ДНК-связывающей активностью Rpn4, растили при 30°C до оптической плотности 1–1.5 при длине волны 600 нм. Из полученной культуры выделяли геномную ДНК с использованием смеси фенол-хлороформ [27]. Далее 1 мкг геномной ДНК обрабатывали эндонуклеазами рестрикции MboI (“Thermo Fisher Scientific”) в концентрации 1 ед./мкл не менее 18 ч при 37°C. Обработанную ДНК амплифицировали методом ПЦР в реальном времени с праймерами, фланкирующими исследуемый GATC-сайт. Референтной последовательностью служил фрагмент гена *RPT6*, не содержащий сайтов GATC. Исползованные в работе праймеры указаны в табл. 2. Каждую реакцию проводили в трех технических повторях на приборе LightCycler 480-II (“Roche Diagnostics”, США) в присутствии флуоресцентного красителя Eva Green (“Синтол”, Россия). Метилирующую активность (*R*) определяли по соотношению сигналов от обработанной и необработанной ферментом пробы. Относительную метилирующую активность ( $R_{rel}$ ) определяли как соотношение метилирующих активностей Dam-Rpn4, или Dam-Rpn4-C/A, или Dam-Rpn4 $\Delta$ NCZnF к U-dam. Разброс данных рассчитывали по ранее описанной методике [23].

**ПЦР в реальном времени с обратной транскрипцией (ОТ).** Относительные уровни мРНК интересующих генов определяли с помощью ОТ-ПЦР в реальном времени, как описано ранее [8].

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### *Картирование доменов Rpn4p, обеспечивающих устойчивость дрожжей к стрессовым факторам*

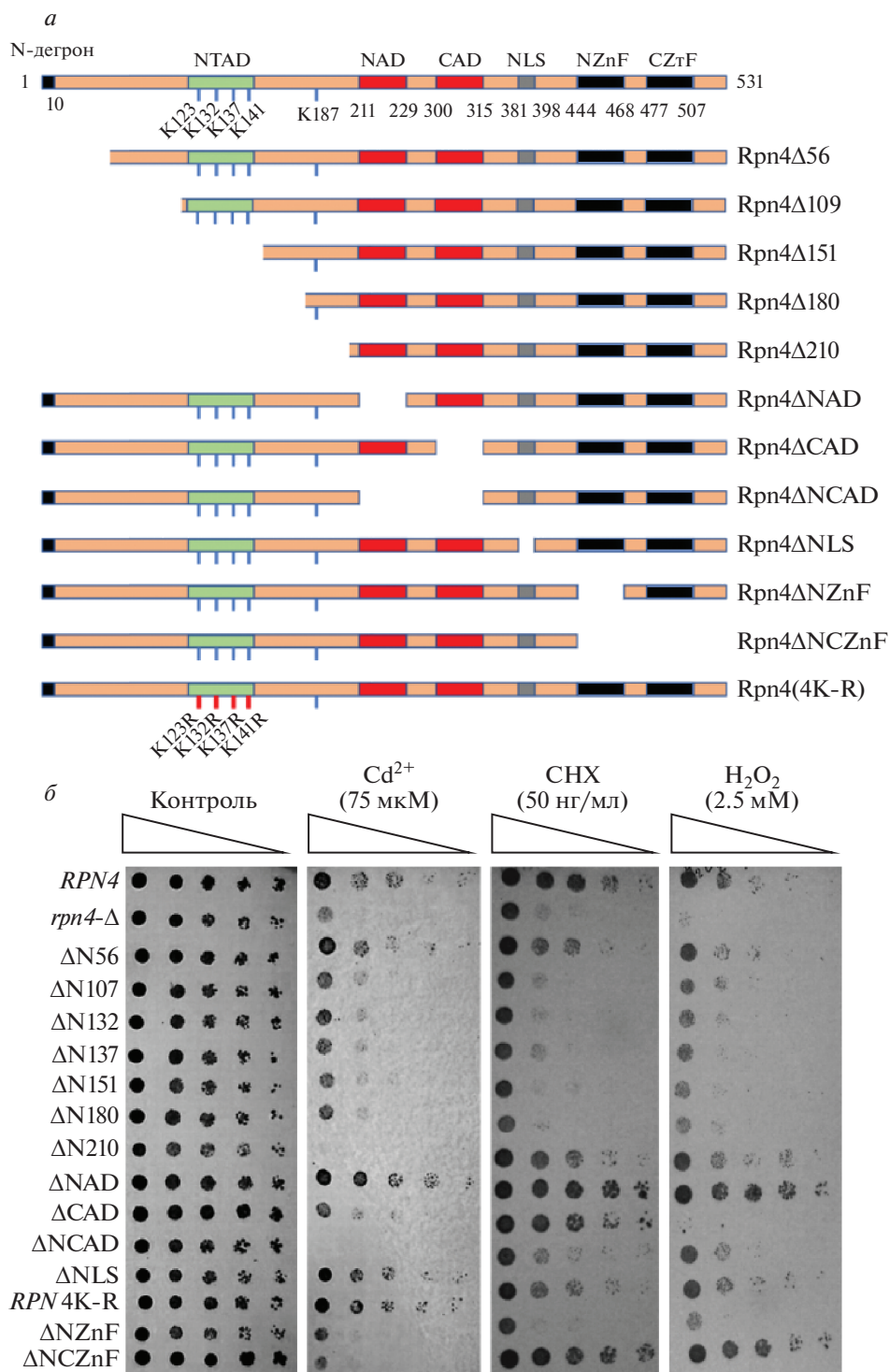
Ранее нами проведен делеционный анализ *RPN4* и оценена роль участков этого фактора в активации транскрипции протеасомных генов [8, 25]. Теперь полученный ранее набор мутантных производных *RPN4* дополнен вариантами с делецией предполагаемого сигнала ядерной локализации (участок, кодирующий аминокислотные остатки 381–398) и N-концевого домена “цинковых пальцев” (участок, кодирующий аминокислотные остатки 444–468) (рис. 1а). В предыдущих работах картирование важных участков Rpn4p проводили в нормальных условиях роста дрожжей. Теперь основной задачей было определение участков Rpn4p, необходимых для обеспечения устойчивости дрожжевых клеток к различным стрессовым воздействиям, а именно: окислительному стрессу, вызванному действием перекиси водорода, ацетату кадмия и ингибитору трансляции – циклогексимида. Согласно полученным данным (рис. 1б), как и ожидалось, продукция полноразмерного белка Rpn4p, его более активного производного Rpn4(4K-R) с заменой лизинов на аргинины в N-концевом трансактиваторном домене (NTAD) [8] или варианта с делецией N-концевого кислого домена (NAD), служащего убиквитинзависимым сигналом деградации Rpn4p [28], восстанавливает устойчивость мутантного штамма с делецией гена *RPN4*, ко всем стрессовым воздействиям. Делеция участка, состоящего из первых 56 аминокислот (Rpn4 $\Delta$ 56), который входит в состав N-концевого сигнала убиквитиннезависимой деградации Rpn4p [29], лишь немного снижает защитную функцию Rpn4p.

Неожиданно дальнейшая делеция N-концевого домена Rpn4p привела к полной потере устойчивости дрожжей ко всем видам стресса, несмотря на то, что форма Rpn4 $\Delta$ 109 сохраняла довольно высокую транскрипционную активность в отношении протеасомных генов [8]. Далее, хотя делеция 210 N-концевых а.о. полностью инактивировала Rpn4p в отношении транскрипции протеасомных генов [8, 25], мутантный вариант защищал клетки от действия окислительного стресса и кадмия. Следует отметить, что вариант с делецией 180 а.о. не обеспечивал защиту дрожжей от действия кадмия и окислительного стресса. Эти данные указывают на то, что между 180 и 210 а.о. может находиться репрессорный домен, действующий в отношении непротеасомных генов-мишеней Rpn4p. Ранее нами и другими авторами выявлена способность Rpn4p функционировать в качестве репрессора транскрипции [12, 30]. Делеция C-концевого кислого домена (CAD), функционирующего как трансактиваторный домен [8], ожидаемо подавляла устойчивость дрожжей к

Таблица 2. Олигонуклеотиды, использованные в работе

Олигонуклеотид	Нуклеотидная последовательность 5' → 3'	Источник
Клонирование делеционных форм <i>RPN4</i>		
RPN4-NcoI-F RPN4-XhoI-R RPN4-ΔNLS-F RPN4-ΔNLS-R RPN4-ΔNZnF-F RPN4-ΔNZnF-R	AGAGAGAGAC <b>CCATGG</b> CTTCTACGGAACTTAGT <sup>a</sup> ACACACAGAC <b>CTCGAG</b> ACGGGGGTAAGTATATAATATAAT AACGGCACATTAGAAAATTATACTAAGAAGCACTTA CTTAGTATAATTTTCTAATGTGCCGTTTTTCATT GATAATGAATGCTAAAAGGAAGATTGTCTTC TCSTTTTAGCATTCAATTATCTGACACGTAA	Данная работа
RPN4-ΔNCZnF-R	CGACTGACG <b>CTCGAG</b> TTAATTCATTATCTGACACGTAA	[25]
Клонирование генов в векторы дрожжевой двугибридной системы		
RPN2-EcoRI-F RPN2-XhoI-R NAS2-NcoI-F NAS2-XhoI-R pGAD-GBT-iMCS-F pGAD-GBT-iMCS-R	GAGAGAGA <b>AGAATT</b> CTCTTTGACGACTGCTGCTCCT GAGAGAGA <b>ACTCGAG</b> CTAAGCACTAGGGAAGTCGAC CAGAGAC <b>CATGG</b> AGGAAGAAGATTAAGT TACTG <b>CCTCGAG</b> TTATAGCTCTTGATCCTACAACC AATTG <b>ACCATGG</b> CACATATGACACCACA <b>ACTCGAGG</b> AATTCCTCGAGTTGTGGTGT <b>CATATGTGCCATGGTC</b>	Данная работа
DamID <sup>b</sup>		
RPT6-ND-F RPT6-ND-R ACT1+880-F ACT1+880-R ADH1-251-F ADH1-251-R RPT6-545-F RPT6-545-R	TAAACGTGAAGGACTTAAAG CTTTTTCCACCATCATCAAC GATGTCACGGACAATTTCTC CTGGTTTCTCTCTACCTCAC CAAGAACCGTTCAACCATTTG CGTTAAATACTCTGGTGTCTG CTACAGTTCTGAATTTGAGC GACCAAATCTGAATAATCACG	[23]
CLN1+300-F CLN1+300-R CLN2+319-F CLN2+319-R	GTATCAACTTTCAGTGATGAC CTTGGTCSTTTAACACTACTC GCATAATAGTTACCAGAGTCG CCTACTGAAAAACGGAAAGG	Данная работа
ПЦР в реальном времени		
PDA1-EX-RT-F PDA1-EX-RT-R CLN2+319-F CLN2+319-R	AGTTTGCTAAGGACTGGTGTGTC AATTGGATCGTTCTTGGATC GCATAATAGTTACCAGAGTCG CCTACTGAAAAACGGAAAGG	Данная работа

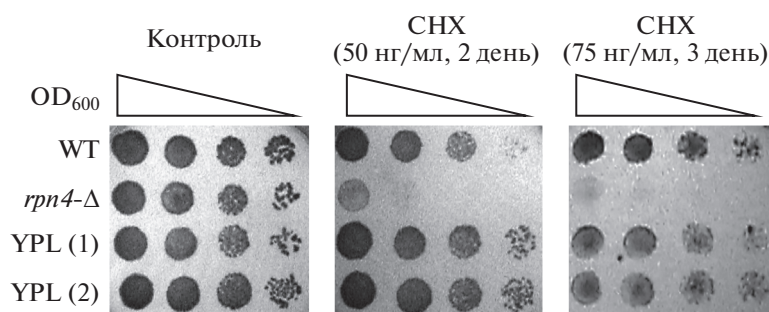
<sup>a</sup> Жирным шрифтом выделены сайты эндонуклеаз рестрикции. <sup>b</sup> DamID – метод картирования участков генома, взаимодействующих с белками, с использованием ДНК-метилазы *Escherichia coli*.



**Рис. 1.** Определение участков Rpn4p, обеспечивающих устойчивость дрожжей к стрессу. *a* – Схема положения делеций в Rpn4p. *b* – Результаты теста на устойчивость к стрессовым агентам штамма 334t *rpn4-Δ*, синтезирующего делеционные формы Rpn4p. Представлены фотографии репрезентативных чашек Петри после инкубации в течение 2 или 3 суток. В качестве положительного контроля использовали мутантный штамм *rpn4-Δ*, трансформированный плазмидой, кодирующей полноразмерный ген *RPN4* (самый верхний ряд разведений), а в качестве негативного контроля – штамм *rpn4-Δ*, трансформированный вектором pPDX2 (второй ряд разведений сверху). CHX – циклогексимид.

окислительному стрессу и кадмию, но при этом защитные свойства в отношении циклогексимида сохранялись. Делеция центральной части бел-

ка, включающей оба кислых домена и участок между ними, инактивировала фактор в случае действия кадмия и значительно ослабляла при



**Рис. 2.** Проверка устойчивости к циклогексимиду (СНХ) штаммов дикого типа и мутантов с нарушенной функцией протеасомы. Представлены фотографии репрезентативных чашек Петри после инкубации в течение 2 или 3 суток при 30°C. В эксперименте использованы штамм дикого типа BY4742 (WT), производный от него вариант с делецией гена *RPN4* (*rpn4-Δ*) и две независимые колонии штамма YPL с нарушенной Rpn4-зависимой регуляцией экспрессии гена *PRE1*, кодирующего субъединицу 20S протеолитического комплекса протеасомы.

воздействию циклогексимида и окислительного стресса. Можно предположить, что полной инактивации не происходит из-за наличия NTAD у этих делеционных вариантов белка. На основании этих данных можно говорить о том, что делеция предполагаемого сигнала ядерной локализации Rpn4p не влияет на его функции, а также предположить наличие в его структуре еще одного сигнала ядерной локализации или возможность его транспорта в ядро в качестве белка, ассоциированного с протеасомой [4, 29]. Наиболее значимым и неожиданным результатом оказалось то, что при полной делеции ДНК-связывающего домена Rpn4p дрожжи сохраняют устойчивость к циклогексимиду и перекиси водорода, но становятся чувствительными к кадмию. Следует отметить, что при этом удаление N-концевого “цинкового пальца” с сохранением С-концевого “цинкового пальца” инактивировало Rpn4p в отношении всех видов стресса. Таким образом, для функционирования Rpn4p как антистрессорного фактора необязательно наличие ДНК-связывающего домена. Возможно, в этом случае Rpn4p вовлечен в белок-белковые взаимодействия.

*Мутантный штамм с нарушенной экспрессией субъединицы 20S протеасомы проявляет повышенную устойчивость к циклогексимиду*

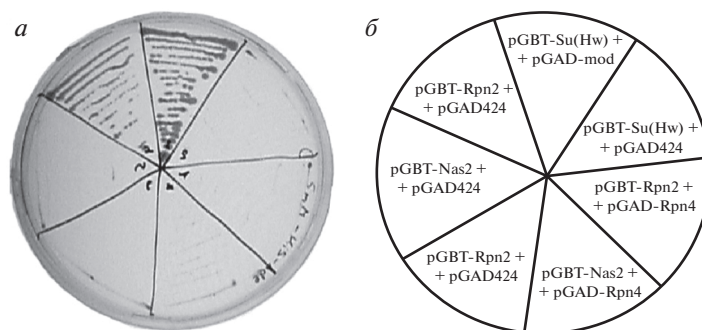
Ранее при поиске мутаций, вызывающих сверхустойчивость к циклогексимиду, выявлены штаммы с мутациями в генах 20S протеолитического субкомплекса протеасомы [31]. Поскольку Rpn4p с делецией ДНК-связывающего домена не активирует транскрипцию протеасомных генов [8, 25], интересно было выяснить, способен ли мутантный штамм YPL с нарушенной Rpn4-зависимой регуляцией гена субъединицы *PRE1* [15] проявлять сверхустойчивость к циклогексимиду. Согласно полученным результатам (рис. 2), штамм YPL проявлял повышенную устойчивость к циклогек-

симиду по сравнению со штаммом дикого типа при концентрации циклогексимида 50 нг/мкл. Однако при более высокой концентрации циклогексимида, 75 нг/мкл, разница в скорости формирования колоний мутанта и дикого типа отсутствовала. Ранее U. Gerlinger и соавт. сообщали [31], что не все мутации, в частности в гене *PRE1*, ведут к четко выраженному фенотипу сверхустойчивости к циклогексимиду. Как правило, таким фенотипом обладают штаммы, несущие мутации одновременно в двух генах (например, *pre1-1 pre4-1*), что соответствует очень сильному нарушению протеасомзависимого протеолиза. Можно отметить, что в штамме 334t *rpn4-Δ* нарушена деградация белков в двух внутриклеточных протеолитических системах: УПС (отсутствие трансаktиватора) и аутофагии (отсутствие ключевой протеазы Prb1p, обеспечивающей активацию других протеаз в аутофагосомах [32]). Возможно, такое серьезное нарушение внутриклеточного протеолиза функционально соответствует двойным мутациям в протеасомных генах и вносит вклад в наблюдаемый фенотип устойчивости к циклогексимиду в присутствии Rpn4Δ210 и Rpn4ΔNCZnF.

*Rpn2p и Nas2p не взаимодействуют с Rpn4 в двугибридной дрожжевой системе*

Полученные нами данные указывают на то, что нарушение экспрессии протеасомных генов вряд ли служит основным механизмом, посредством которого мутант Rpn4ΔNCZnF обеспечивает устойчивость дрожжей к стрессу. Логично предположить, что в отсутствие ДНК-связывающей активности мутантный Rpn4p функционирует за счет взаимодействия с белками-партнерами и белковыми комплексами. Ранее показано, что Rpn4p может очищаться вместе с протеасомой [33] и способен связываться с отдельными субъединицами 19S регуляторного комплекса протеасомы, включая Rpn2p [4, 29]. Кроме того, в мас-





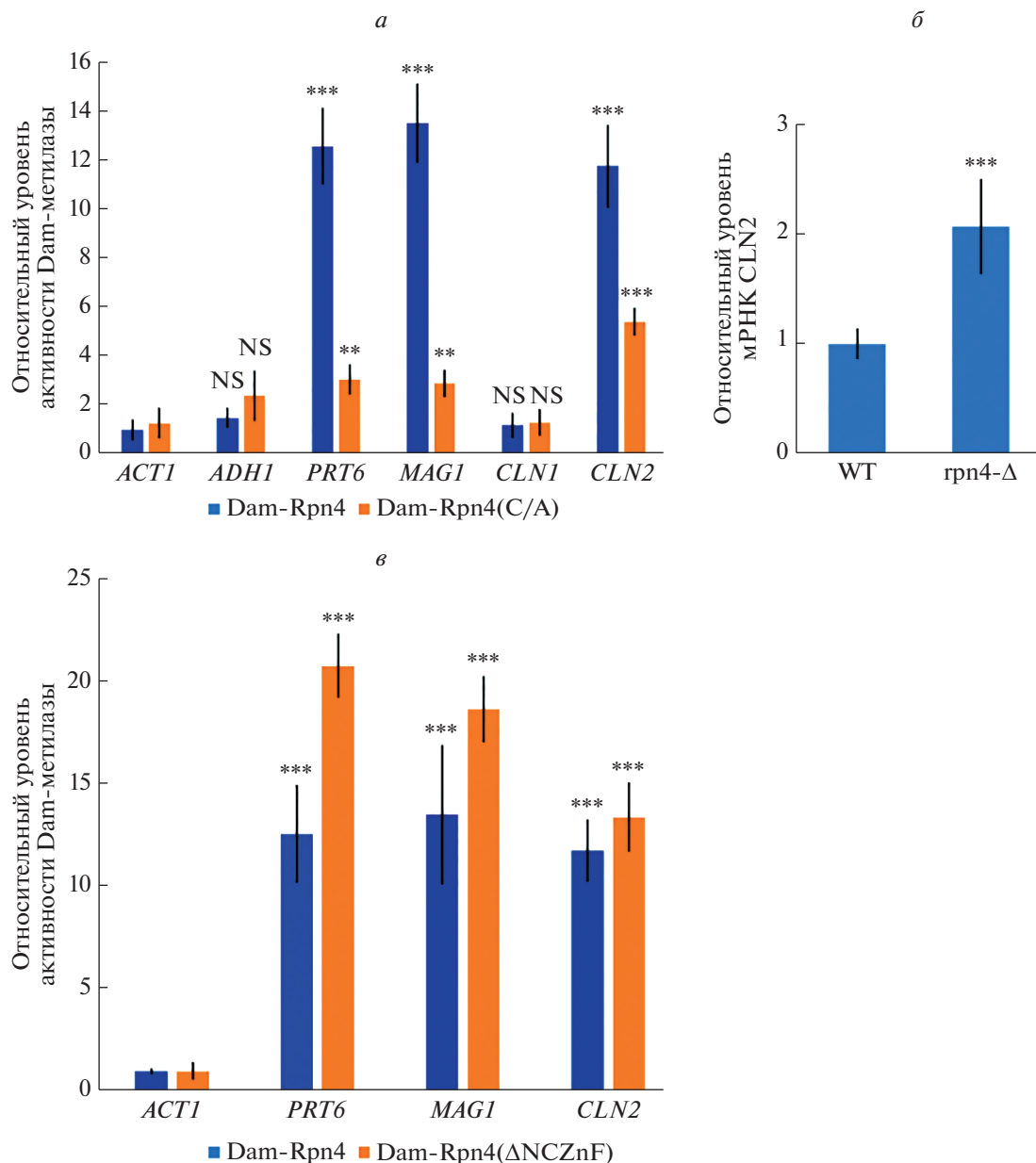
**Рис. 3.** Анализ взаимодействия Rpn4p с субъединицей 19S регуляторного комплекса протеасомы Rpn2p и шапероном Nas2p в дрожжевой двугибридной системе. *а* – Фотография репрезентативной чашки Петри. *б* – Схема комбинаций плазмид, использованных при трансформации дрожжей. Штамм PJ69-4a, трансформированный комбинацией плазмид pGBT-Su(Hw) и pGAD-mod, служил положительным контролем наличия белок-белковых взаимодействий.

штабных исследованиях белок-белковых взаимодействий показано, что Rpn4p физически взаимодействует с Nas2p [34], который служит одним из специализированных шаперонов, обеспечивающих сборку 19S регуляторного субкомплекса протеасомы [35]. Чтобы проверить полученные ранее данные о взаимодействии Rpn4p с Rpn2p и Nas2p, мы использовали дрожжевую двугибридную систему. Положительным контролем служили конструкции, продуцирующие белки Su(Hw) и Mod(mdg4), взаимодействие между которыми в двугибридной системе показано ранее [26]. Согласно полученным данным (рис. 3а), Rpn4p, будучи соединенным с ДНК-связывающим доменом Gal4p, может активировать экспрессию репортерных генов и в отсутствие белка-партнера с трансаKTиваторным доменом. Очевидно, это происходит благодаря наличию собственных трансаKTиваторных доменов Rpn4p. В парах pGBT-Rpn2/pGAD425-Rpn4 и pGBT-Nas2/pGAD425-Rpn4 не выявлено активации репортерных генов, что выражается в отсутствии роста дрожжевых колоний на селективной среде. Следует отметить, что дрожжи росли в присутствии 5 мМ 3-АТ, — чтобы надежно подавлять фоновую активацию репортерных генов. Полученные нами данные согласуются с результатами систематического анализа, проведенного G. Cagneu и др. [36], по взаимодействию между субъединицами протеасомы в дрожжевой двугибридной системе. Авторы тоже не обнаружили продуктивного взаимодействия между Rpn4p и Rpn2p при использовании 3-АТ, но выявили взаимодействие Rpn4p со структурной субъединицей 20S протеасомы Rpe7p. Однако позже S. На и соавт. [29] с помощью высокочувствительного метода переноса биотиновой метки показали взаимодействие Rpn4p *in vitro* с такими субъединицами 19S регуляторного комплекса протеасомы, как Rpn2p, Rpn5p, Rpt1p и Rpt6. Можно предположить, что выявленные взаимодействия Rpn4p с протеасомными субъединицами крат-

ковременные и служат “инструментом” деградации Rpn4p в протеасоме.

*Rpn4p может привлекаться  
к промоторным областям генов  
за счет белок-белковых взаимодействий*

В ходе исследования взаимодействия Rpn4p с промоторными областями генов, как содержащих его сайты связывания (PACe или MACe), так и не содержащих их, нами неожиданно обнаружено, что Rpn4p может привлекаться к промотору гена циклина *CLN2*, который не содержит сайтов связывания фактора. Более того, мутантный Rpn4p с ДНК-связывающим доменом, инактивированным путем внесения замен остатков цистеина на аланины, также привлекается к промотору *CLN2*, хотя и с меньшей силой (рис. 4а). Полученные данные указывают на то, что Rpn4p может привлекаться к регуляторным областям генов, по-видимому, за счет белок-белковых взаимодействий. Из литературных данных известно, что привлечение фактора транскрипции к гену может быть непродуктивным, то есть не приводит к изменению экспрессии гена [37]. С целью выяснить, продуктивно ли привлечение Rpn4p к *CLN2*, мы определили уровень мРНК *CLN2* в штамме BY4742 с мутацией *rpn4-Δ* относительно изогенного штамма дикого типа. Оказалось, что в мутантном штамме уровень мРНК *CLN2* повышен в среднем в 2 раза (рис. 4б). Из этого следует, что Rpn4p служит репрессором гена *CLN2*. Кроме того, проверили происходит ли взаимодействие мутантного Rpn4p с делецией ДНК-связывающего домена, Rpn4ΔNCZnF, с геном *CLN2*. Согласно полученным данным (рис. 4в), взаимодействие Rpn4ΔNCZnF усилилось и превысило уровень, наблюдаемый в случае белка дикого типа. Взаимодействие Rpn4ΔNCZnF усилилось также и с промоторными областями Rpn4p-зависимых генов: *RPT6*, содержащего PACe, и *MAG1*, содер-



**Рис. 4.** Rpn4p может привлекаться к промоторным областям регулируемых им генов за счет белок-белковых взаимодействий. *a* – Привлечение Rpn4p к промоторным областям генов-мишеней и генов, не регулируемых Rpn4p. В анализе DamID за единицу активности принят сигнал, полученный при метилировании гена *ACT1* химерным белком Dam-Rpn4. *б* – Анализ относительного уровня мРНК гена *CLN2* с помощью ОТ-ПЦР в реальном времени. В качестве референсного гена использован *PDA1*. *в* – Результаты анализа DamID с использованием химерного белка Dam-Rpn4ΔNCZnF. Данные представлены в виде среднего для трех независимых повторов, разброс данных представлен стандартным отклонением. В экспериментах использованы штаммы BY4742 и производный от него BY4742 *rpn4-Δ*. Статистическая значимость различий в средних определена с помощью *t*-критерия Стьюдента. NS – отличия статистически незначимы; \*\*0.001 < *p*-value < 0.01; \*\*\**p*-value < 0.001.

жащего MACE. Эти результаты можно объяснить полученными нами ранее данными о том, что уровень экспрессии мутантного белка Rpn4ΔNCZnF значительно выше, чем белка дикого типа [25]. Таким образом, показано, что Rpn4p может привлекаться к регулируемым им генам за счет белок-белковых взаимодействий и этот процесс стимулируется в случае делеции ДНК-связывающего домена.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В этой работе мы использовали набор делеционных производных Rpn4p, чтобы картировать функционально важные участки этого транскрипционного фактора, ответственные за его “работу” в условиях воздействия различных видов стресса. Установлено, что большая часть N-концевой обла-

сти, содержащая трансактиваторный домен NTAD, а также кислый трансактиваторный домен CAD нужны для устойчивости дрожжей ко всем видам стресса. В то же время без NAD, предполагаемого сигнала ядерной локализации или ДНК-связывающего домена Rpn4p может продолжать обеспечивать защиту дрожжей от стрессовых воздействий. Результаты, полученные с помощью DamID-анализа, указывают на возможность Rpn4p, лишённого ДНК-связывающего домена, участвовать в регуляции экспрессии генов за счет белок-белковых взаимодействий.

Отметим, что мутантные варианты Rpn4p без NAD и NCZnF наиболее активны в отношении устойчивости дрожжей к циклогексимиду и окислительному стрессу (рис. 1б). Эти данные можно объяснить повышением содержания соответствующих мутантных вариантов Rpn4p, которые наблюдали ранее [25]. В случае делеции NAD стабилизация Rpn4p связана, по-видимому, с нарушением его деградации по убиквитинзависимому пути [28]. На данный момент неясно, по какой причине происходит стабилизация Rpn4p при делеции ДНК-связывающего домена.

Отсутствие активности предполагаемого сигнала ядерной локализации можно рассматривать как указание на наличие, как минимум, еще одного сигнала транспорта Rpn4p в ядро, который компенсирует отсутствие этого участка. Таким сигналом может служить N-концевой дегрон, который распознается  $\alpha$ -кариоферинном Srp1p в комплексе с Sts1p [38]. Это предположение согласуется с полученными нами данными, указывающими на то, что делеция первых 56 а.о., включающих значительную часть N-дегрона, незначительно влияет на активность Rpn4p. Однако делеция 109 а.о., включающая в себя полный N-дегрон, подавляет способность Rpn4p обеспечивать устойчивость дрожжей к стрессу (рис. 1б). Отметим, что мутантный белок сохраняет некоторую активность активатора транскрипции протеасомных генов [8]. Это не исключает того, что делеция 109 а.о. может подавлять способность Rpn4p регулировать экспрессию непротеасомных генов. Не исключено также, что предполагаемый сигнал ядерной локализации менее активен, чем N-концевой дегрон.

Полученные нами и другими авторами данные позволяют сформулировать несколько предположений о том, каким образом Rpn4p, лишённый ДНК-связывающей функции, обеспечивает устойчивость дрожжей к стрессу.

Первое предположение заключается в том, что Rpn4p без ДНК-связывающего домена может нарушать деградацию субстратов протеасомы, включая белки, обеспечивающие устойчивость к рассматриваемым видам стресса. Эта гипотеза основана на данных о том, что делеция ДНК-

связывающего домена повышает содержание Rpn4 [25], а так как при этом сохранена N-концевая область Rpn4p, обеспечивающая взаимодействие с 19S регуляторным комплексом протеасомы [29], то мутантный Rpn4p продолжает более интенсивно связываться с протеасомой, конкурируя с другими ее субстратами. Кроме того, мутантный Rpn4p сохраняет также Ubr2-зависимый дегрон [28], благодаря чему может конкурировать за связывание и полиубиквитинирование с другими субстратами Ubr2-лигазы, вызывая их стабилизацию.

Второе предположение заключается в привлечении Rpn4p в качестве трансактиваторного домена к генам, не имеющим его сайтов связывания. В отсутствие ДНК-связывающего домена происходит диссоциация мутантного Rpn4p от участков его связывания в геноме и тогда, взаимодействуя с другими факторами транскрипции, он становится участником регуляции другого набора генов, в том числе вовлеченных в устойчивость к исследуемым видам стресса.

И, наконец, третье предположение состоит в том, что Rpn4p связывается с другими белками, не имеющими отношение к регуляции транскрипции генов, но вовлеченными в экспрессию генетической информации на других этапах, в том числе и в устойчивость дрожжей к циклогексимиду и окислительному стрессу. Так, согласно информации, представленной в базе данных *Saccharomyces cerevisiae* database (<https://www.yeastgenome.org/> посещение 06.02.2022), обнаружено физическое взаимодействие Rpn4p с 29 белками. Почти половину из этих белков составляют субъединицы протеасомы или ее шапероны (Nas2p, Pre2p, Pre7p, Rpn2p, Rpn5p, Rpn6p, Rpn10p, Rpn12p, Sem1p, Rpt1p, Rpt2p, Rpt3p, Rpt5p, Rpt6p), а также ферменты системы полиубиквитинирования белков (Ubr1p и Mub1p) и Hsp40p (Arl1p), вовлеченный в SUMO-опосредованную деградацию белковых агрегатов. Взаимодействие с этими белками, по-видимому, функционально ведет к деградации Rpn4p. К этой же группе можно отнести Srp1p, гомолог кариоферина- $\alpha$ , который, помимо импорта белков в ядро, взаимодействует с рибосомой и протеасомой и опосредует деградацию новосинтезированных белков [38]. Показано, что Srp1p взаимодействует с областью N-концевого дегрона Rpn4p и обеспечивает его деградацию в протеасоме, а нарушение функционирования Srp1p повышает чувствительность дрожжей к циклогексимиду и другим стрессовым факторам, вызывающим накопление неправильно свернутых белков [38]. Помимо Srp1p в связывании и транспорте Rpn4p в ядро может участвовать Mog1p, который, в свою очередь, связывается с Ran-GTPазой [39]. Другая часть белков, взаимодействующих с Rpn4, вовлечена в регуляцию экспрессии генов на уровне организации хроматина

(Ccr4p, Esa1p, Isw1p), метаболизма мРНК (Nab2p, Dhh1p, Puf3p), регуляции трансляции (Caf20p, Hek2p) и сворачивания новосинтезированных белков (Ssb2p). Отдельно нужно отметить взаимодействие Rpn4p с Dpb2p – второй большой субъединицей ДНК-полимеразы II, участвующей в репликации и репарации ДНК [40]. Известно, что ДНК-полимераза II, участвует в репаративном синтезе ДНК в ходе устранения повреждений ДНК, вызванных окислительным стрессом [41].

Полученные нами и другими авторами [36] данные указывают на то, что взаимодействие Rpn4p с компонентами УПС имеет временный характер и ведет к расщеплению Rpn4p. Возможно, такое же значение имеют взаимодействия Rpn4p с шаперонами, участвующими в сворачивании новосинтезированных белков. Взаимодействие Rpn4p (прямое или опосредованное) с белками, участвующими в регуляции экспрессии генов на уровне организации хроматина, по-видимому, связано с его функциями как регулятора экспрессии генов. На сегодняшний день неясно, имеет ли функциональное значение взаимодействие Rpn4p с регуляторами трансляции и ДНК-полимеразой II, которые, в свою очередь, имеют отношение к ответу дрожжей на действие циклогексимида и окислительный стресс. Очевидно, что взаимодействие с этими белками не требует участия ДНК-связывающего домена Rpn4p. Таким образом, имеющиеся на сегодняшний день данные указывают на то, что Rpn4p может быть вовлечен в белок-белковые взаимодействия, которые выходят за рамки его функций как субстрата протеасомы или фактора транскрипции. Необходимы дальнейшие исследования, чтобы верифицировать обнаруженные белки-партнеры и установить значение взаимодействий Rpn4p с ними.

Авторы выражают благодарность Центру высокоточного редактирования генома и генетических технологий для биомедицины ИМБ РАН за предоставленные вычислительные мощности и методики для анализа данных.

Работа выполнена при поддержке Российского Научного Фонда (грант № 17-74-30030).

Работа выполнена с использованием оборудования центра коллективного пользования “Геном” ИМБ РАН ([http://www.eimb.ru/ru1/ckp/ccu\\_genome\\_se.php](http://www.eimb.ru/ru1/ckp/ccu_genome_se.php)).

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов исследований.

Авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Glickman M.H., Ciechanover A. (2002) The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol. Rev.* **82**(2), 373–428.
- Lecker S.H., Goldberg A.L., Mitch W.E. (2006) Protein degradation by the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states. *J. Am. Soc. Nephrol.* **17**(7), 1807–1819.
- Карпов Д.С., Лысов Ю.П., Карпов В.Л. (2019) Эволюция системы координированной регуляции экспрессии протеасомных генов у дрожжей-сахаромицетов. *Молекуляр. биология.* **53**(6), 1029–1037.
- Xie Y., Varshavsky A. (2001) RPN4 is a ligand, substrate and transcriptional regulator of the 26S proteasome: a negative feedback circuit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **98**(6), 3056–3061.
- Xie Y. (2010) Feedback regulation of proteasome gene expression and its implications in cancer therapy. *Cancer Metastasis Rev.* **29**(4), 687–693.
- Mannhaupt G., Feldmann H. (2007) Genomic evolution of the proteasome system among Hemiascomycetous yeasts. *J. Mol. Evol.* **65**(5), 529–540.
- Mannhaupt G., Schnell R., Karpov V., Vetter I., Feldmann H. (1999) Rpn4 acts as a transcription factor by binding to PACE, a nonamer box found upstream of 26S proteasomal and other genes in yeast. *FEBS Lett.* **450**, 27–34.
- Karpov D.S., Tutyaeva V.V., Karpov V.L. (2008) Mapping of yeast Rpn4p transactivation domains. *FEBS Lett.* **582**(23–24), 3459–3464.
- Ju D., Xu H., Wang X., Xie Y. (2010) The transcription activation domain of Rpn4 is separate from its degrons. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **42**(2), 282–286.
- Karpov D.S., Grineva E.N., Leinsoo A.T., Nadolinskaia N.I., Danilenko N.K., Tutyaeva V.V., Spasskaya D.S., Preobrazhenskaya O.V., Lysov Y.P., Karpov V.L. (2017) Functional analysis of *Debaryomyces hansenii* Rpn4 on a genetic background of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* **17**(1), fow098.
- Nelson M.K., Kurihara T., Silver P.A. (1993) Extragenic suppressors of mutations in the cytoplasmic C terminus of SEC63 define five genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* **134**(1), 159–173.
- Jelinsky S.A., Estep P., Church G.M., Samson L.D. (2000) Regulatory networks revealed by transcriptional profiling of damaged *Saccharomyces cerevisiae* cells: Rpn4 links base excision repair with proteasomes. *Mol. Cell Biol.* **20**, 8157–8167.
- Капранов А.Б., Преображенская О.В., Тютяева В.В., Штука Р., Фельдман Х., Карпов В.Л. (2001) Выделение и идентификация PACE-связывающего белка Rpn4 – нового транскрипционного активатора, участвующего в регуляции 26S протеасомных и других генов. *Молекуляр. биология.* **35**, 420–431.
- Shirozu R., Yashiroda H., Murata S. (2015) Identification of minimum Rpn4-responsive elements in genes related to proteasome functions. *FEBS Lett.* **589**(8), 933–940.

15. Karpov D.S., Spasskaya D.S., Tutyaeva V.V., Mironov A.S., Karpov V.L. (2013) Proteasome inhibition enhances resistance to DNA damage via upregulation of Rpn4-dependent DNA repair genes. *FEBS Lett.* **587**(18), 3108–3114.
16. Spasskaya D.S., Nadolinskaia N.I., Tutyaeva V.V., Lysov Y.P., Karpov V.L., Karpov D.S. (2020) Yeast Rpn4 links the proteasome and DNA repair via RAD52 regulation. *Int. J. Mol. Sci.* **21**(21), 8097.
17. Karpov D.S., Spasskaya D.S., Nadolinskaia N.I., Tutyaeva V.V., Lysov Y.P., Karpov V.L. (2019) Dereglуlation of the 19S proteasome complex increases yeast resistance to 4-NQO and oxidative stress via upregulation of Rpn4- and proteasome-dependent stress responsive genes. *FEMS Yeast Res.* **19**(2), foz002.
18. Teixeira M.C., Dias P.J., Simoes T., Sa-Correia I. (2008) Yeast adaptation to mancozeb involves the upregulation of FLR1 under the coordinate control of Yap1, Rpn4, Pdr3, and Yrr1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **367**(2), 249–255.
19. James P., Halladay J., Craig E.A. (1996) Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics.* **144**(4), 1425–1436.
20. Gietz R.D., Woods R.A. (2002) Transformation of yeast by the LiAc/ss carrier DNA/PEG method. *Methods Enzymol.* **350**, 87–96.
21. Christianson T.W., Sikorski R.S., Dante M., Shero J.H., Hieter P. (1992) Multifunctional yeast high-copy-number shuttle vectors. *Gene.* **110**(1), 119–122.
22. Gietz R.D., Sugino A. (1988) New yeast-*Escherichia coli* shuttle vectors constructed with in vitro mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites. *Gene.* **74**(2), 527–534.
23. Спасская Д.С., Карпов Д.С., Карпов В.Л. (2011) Dam-метилаза *Escherichia coli* как молекулярный инструмент для картирования сайтов связывания дрожжевого фактора транскрипции Rpn4p. *Молекуляр. биология.* **45**(4), 642–651.
24. Козлов Д.Г., Чеперегин С.Э., Честков А.В., Крылов В.Н., Цыганков Ю.Д. (2010) Клонирование и экспрессия гена лизоцима бактериофага FMV в клетках дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* и *Pichia pastoris*. *Генетика.* **46**(3), 340–348.
25. Карпов Д.С., Тютяева В.В., Берестень С.Ф., Карпов В.Л. (2008) Картирование участков Rpn4p, ответственных за активацию транскрипции протеасомных генов. *Молекуляр. биология.* **42**(3), 526–532.
26. Melnikova L., Kostyuchenko M., Parshikov A., Georgiev P., Golovnin A. (2018) Role of Su(Hw) zinc finger 10 and interaction with CP190 and Mod(mdg4) proteins in recruiting the Su(Hw) complex to chromatin sites in *Drosophila*. *PLoS One.* **13**(2), e0193497.
27. Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Smith J.A., Seidman J.G., Struhl K. (1998) *Current Protocols in Molecular Biology*. New York: Wiley-Interscience.
28. Ju D., Xie Y. (2006) Identification of the preferential ubiquitination site and ubiquitin-dependent degradation signal of Rpn4. *J. Biol. Chem.* **281**, 10657–10662.
29. Ha S.W., Ju D., Xie Y. (2012) The N-terminal domain of Rpn4 serves as a portable ubiquitin-independent degron and is recognized by specific 19S RP subunits. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **419**(2), 226–231.
30. Карпов Д.С., Осипов С.А., Преображенская О.В., Карпов В.Л. (2008) Rpn4p – позитивный и негативный регулятор транскрипции убиквитин-протеасомной системы. *Молекуляр. биология.* **42**(3), 518–525.
31. Gerlinger U.M., Guckel R., Hoffmann M., Wolf D.H., Hilt W. (1997) Yeast cycloheximide-resistant crl mutants are proteasome mutants defective in protein degradation. *Mol. Biol. Cell.* **8**(12), 2487–2499.
32. He C., Klionsky D.J. (2009) Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu. Rev. Genet.* **43**, 67–93.
33. Fujimoro M., Tanaka K., Yokosawa H., Toh-e A. (1998) Son1p is a component of the 26S proteasome of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **423**, 149–154.
34. Drees B.L., Sundin B., Brazeau E., Caviston J.P., Chen G.C., Guo W., Kozminski K.G., Lau M.W., Moskow J.J., Tong A., Schenkman L.R., McKenzie A., 3rd, Brennwald P., Longtine M., Bi E., Chan C., Novick P., Boone C., Pringle J.R., Davis T.N., Fields S., Drubin D.G. (2001) A protein interaction map for cell polarity development. *J. Cell Biol.* **154**(3), 549–571.
35. Funakoshi M., Tomko R.J., Jr., Kobayashi H., Hochstrasser M. (2009) Multiple assembly chaperones govern biogenesis of the proteasome regulatory particle base. *Cell.* **137**(5), 887–899.
36. Cagney G., Uetz P., Fields S. (2001) Two-hybrid analysis of the *s* 26S proteasome. *Physiol. Genomics.* **7**(1), 27–34.
37. Lickwar C.R., Mueller F., Hanlon S.E., McNally J.G., Lieb J.D. (2012) Genome-wide protein-DNA binding dynamics suggest a molecular clutch for transcription factor function. *Nature.* **484**(7393), 251–255.
38. Ha S.W., Ju D., Xie Y. (2014) Nuclear import factor Srp1 and its associated protein Sts1 couple ribosome-bound nascent polypeptides to proteasomes for cotranslational degradation. *J. Biol. Chem.* **289**(5), 2701–2710.
39. Baker R.P., Harreman M.T., Eccleston J.F., Corbett A.H., Stewart M. (2001) Interaction between Ran and Mog1 is required for efficient nuclear protein import. *J. Biol. Chem.* **276**(44), 41255–41262.
40. Jain R., Aggarwal A.K., Rechkoblit O. (2018) Eukaryotic DNA polymerases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **53**, 77–87.
41. Chalissery J., Jalal D., Al-Natour Z., Hassan A.H. (2017) Repair of oxidative DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA Repair (Amst.)*. **51**, 2–13.

## **Rpn4p WITHOUT THE DNA-BINDING DOMAIN PROVIDES *Saccharomyces cerevisiae* RESISTANCE TO OXIDATIVE STRESS AND CYCLOHEXIMIDE**

**D. S. Karpov<sup>1, \*</sup>, D. S. Spasskaya<sup>1</sup>, V. V. Tutyaeva<sup>1</sup>, and V. L. Karpov<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> *Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine, Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia*

<sup>2</sup> *Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia*

*\*e-mail: aleom@yandex.ru*

The ubiquitin-proteasome system is involved in the control of all essential molecular processes under normal and stressed conditions. Rpn4p serves as a key transcriptional regulator of the proteasome in the *Saccharomyces cerevisiae* yeast and also involves in the cellular response to various stresses. In addition to proteasomal genes, Rpn4p affects the expression of several hundred other genes, including genes involved in DNA repair and response to oxidative stress. However, the molecular mechanisms used by Rpn4p in the control of its target genes and acting as a regulator of cell response to stress conditions remain largely unclear. This work aims to identify the Rpn4p domains required for cell resistance to various stress conditions. We showed that the N-terminal and central parts of the protein contain the sites necessary for resistance to all types of stress. The putative nuclear localization signal is not essential for Rpn4p function. Unexpectedly, with a deletion of both “zinc finger” domains forming the DNA-binding domain, the protein provides resistance to oxidative stress and cycloheximide. Moreover, we show that Rpn4p could be recruited to the promoter regions of genes it regulates, even if they do not contain its binding sites. The findings indicate that Rpn4 might mediate gene regulation and cellular response to stress through protein-protein interactions.

**Keywords:** Rpn4p, deletion analysis, DNA-binding domain, oxidative stress