

1. Что определяет жизнеспособность нонсенс-мутантов по генам SUP45 и SUP35?

1.1. Улучшение сборки генома U-1A-D1628. Уточнение и дополнение данных об увеличении копийности мутантных аллелей генов SUP35, SUP45.

Для улучшения существующих сборок геномов U-1A-D1628 и 74-D694 были использованы одновременно прочтения, полученные с использованием технологий Illumina и Oxford Nanopore MinION (Barbitoff et al., 2021). Для уточнения последовательности прочтений исходный сигнал, полученный в ходе секвенирования на платформе Oxford Nanopore, был предобработан новой версией инструментария для определения оснований из сырого сигнала (base calling) Guppy (guppy <https://nanoporetech.com/>). По словам производителя, использование этого инструмента может позволить получить последовательности прочтений Oxford Nanopore, имеющие показатели точности, сравнимые с технологиями секвенирования второго поколения.

После проведения процедуры base calling, мы отфильтровали прочтения с наихудшим качеством и отобрали лучшие прочтения суммарной длиной 2,4 млрд. п.н (эквивалентно среднему покрытию генома около 200x) при помощи инструмента Filtlong. Затем при помощи программ Shasta (Shafin et al., 2020) и Flye (Kolmogorov et al., 2019) осуществили сборку геномов U-1A-D1628 и 74-D694.

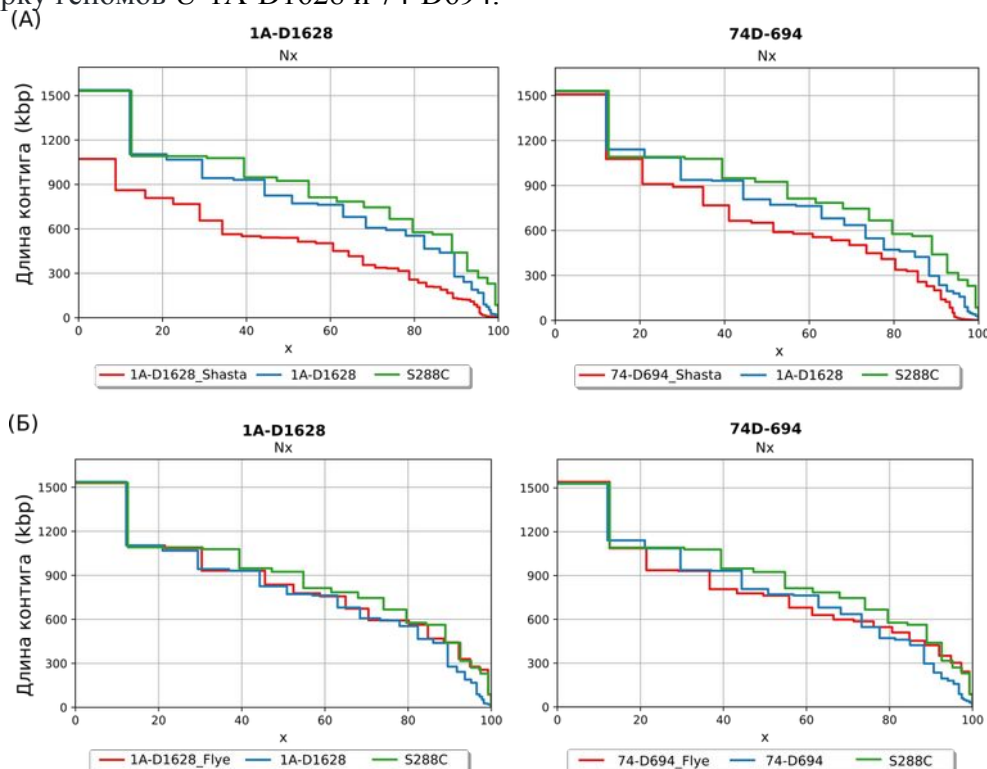


Рисунок 1-1. Сравнение сборок, полученных при помощи различных программ для сборки генома. Показаны графики убывания длины контига в зависимости от доли общей длины сборки (Nx). На панели А приведен сравнительный анализ сборок, полученных при помощи программы Shasta для штаммов U-1A-D1628 и 74-D694 (красная линия) по сравнению с предыдущими сборками (синяя линия) и эталонной сборкой S288C (зеленая линия). На панели Б приведен сравнительный анализ сборок, полученных при помощи программы Flye.

Несмотря на использование целого ряда инструментов, анализ качества полученных сборок при помощи программного пакета QUAST (<https://github.com/ablab/quast>) показал ухудшение качества сборки в случае Shasta (Рис. 1-1А, все рисунки приведены в файле, приложенном к отчету) относительно предыдущих сборок и незначительные улучшения в случае использования сборщика Flye (Рис. 1-1Б). В связи с этими результатами, для

дальнейшего анализа мы использовали существующую сборку геномов штаммов U-1A-D1628 и 74-D694.

Оценка количества копий плазмиды с использованием данных WGS и финальной версии сборки генома была осуществлена при помощи оригинального метода, основанного на оценке покрытия в областях, специфичных для плазмидной ДНК, по сравнению со средним покрытием дрожжевого генома. Количество копий плазмид варьировало от 4,3 до 11,7 для *sup35-n* и от 1,8 до 7,8 для мутантов *sup45-n* (Рис. 1-2А).

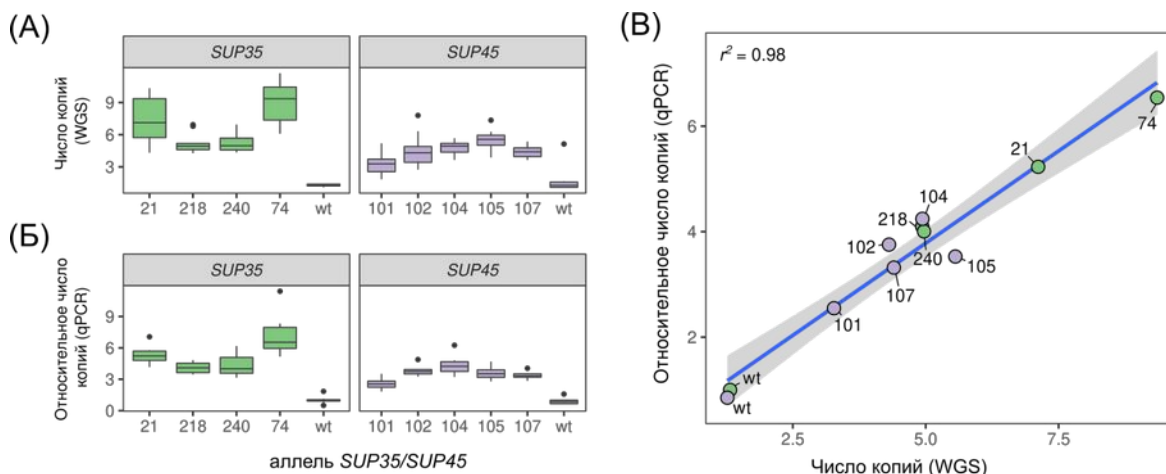


Рисунок 1-2. Оценка копийности плазмид с использованием различных подходов. Количество копий плазмиды, оцененное с использованием данных WGS (А) и количественной ПЦР (ПЦР-РВ) с праймерами к гену *bla* (Б). (В) Диаграмма рассеяния, показывающая соответствие между числом копий плазмид по данным WGS и ПЦР-РВ. Цифры соответствуют аллелям *SUP35* и *SUP45*. Сплошная линия представляет собой линию линейной регрессии; серая область соответствует доверительному интервалу линейной регрессии.

Интересно отметить, что количество копий было больше у штаммов, которые спонтанно утратили аллель дикого типа во время культивирования на полной среде по сравнению со штаммами, выращенными на среде 5-FOA, используемой для отбора клеток, потерявших плазмиду. Таким образом, количество копий плазмиды систематически увеличено у штаммов, несущих все изученные аллели *sup35-n* и *sup45-n*, по сравнению с соответствующими референсными штаммами. Статистический анализ показал высокую степень корреляции ($r^2 = 0,98$) (Рис. 1-2В) между данными, полученными с использованием полногеномного секвенирования и количественной ПЦР (результаты с использованием метода ПЦР-РВ были получены на предыдущих этапах работы) (Рис. 1-2Б)

1.2 Оценка копийности плазмид несущих аллели *sup35-n* (штамм 14-D1690), *sup45-n* (штамм 1A-D1628) в клетках, которые также содержат плазмиды с соответствующими аллелями дикого типа

В работе были использованы штаммы U-14-D1690 и U-1A-D1628 с делецией *SUP35* или *SUP45*, компенсированной копией этого гена на плазмиде, несущей маркер *URA3*. Этот штамм трансформировали либо вектором содержащим селективный маркер *LEU2* и несущим аллель дикого типа гена *SUP35/SUP45*, либо плазмидами, содержащими мутации *sup35-n/sup45-n* (2 стадия на Рис. 1-3). Впоследствии штаммы, содержащие две плазмиды, выращивали на среде, содержащей 5-FOA, для потери плазмиды с маркером *URA3*, несущей аллель дикого типа *SUP35* или *SUP45* (3 стадия на Рис. 1-3).

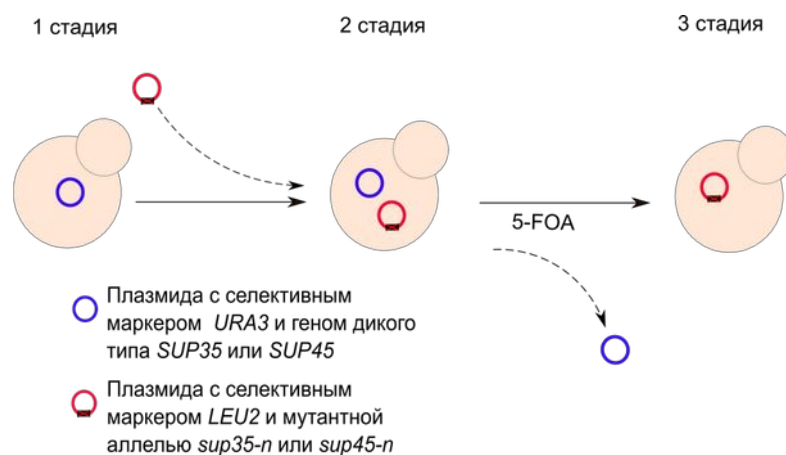


Рисунок 1-3. Схема эксперимента.

Затем выделяли геномную ДНК из штаммов, несущих одиночные плазмиды с аллелями дикого типа, или мутантными аллелями изучаемых генов, а также из штаммов, несущих одновременно две плазмиды (одна из которых содержит аллель дикого типа, а другая - аллель дикого типа или мутантную аллель). Выделенную геномную ДНК использовали для проведения серии количественных ПЦР в реальном времени (**Рис. 1-4**). Количество копий плазмиды определяли при помощи специально подобранных праймеров, специфичных к маркеру *LEU2* и *URA3* для отслеживания количества копий каждой из плазмид в отдельности. В качестве референсного гена использовали *ACT1*.

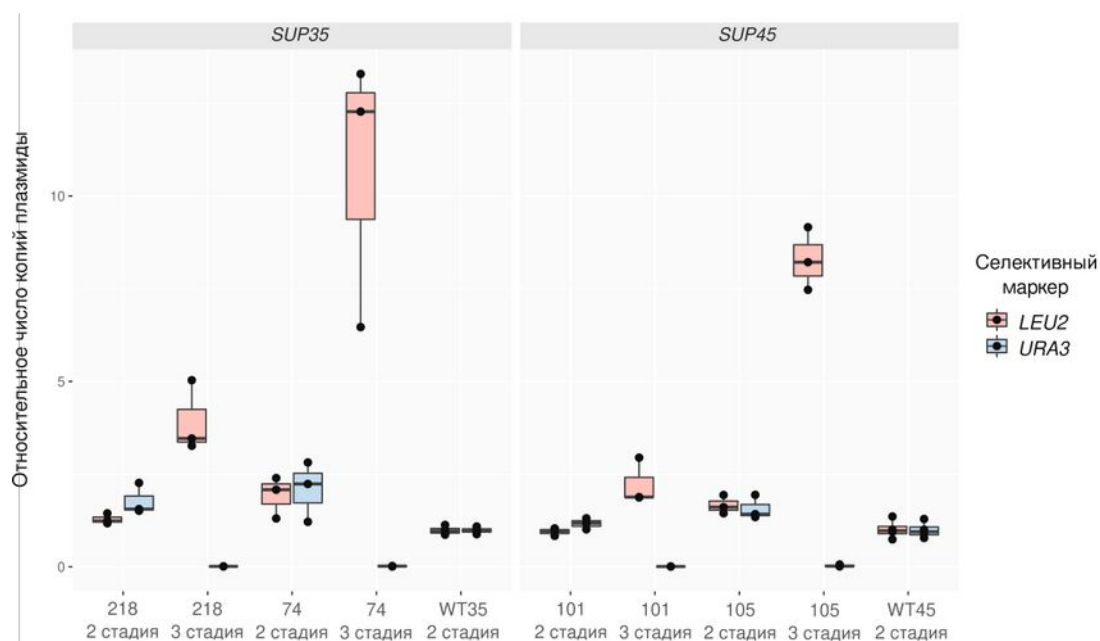


Рисунок 1-4. Анализ числа копий центромерных плазмид несущих мутантные аллели *sup35-n* и *sup45-n*. “2 стадия” - клетки, несущие две плазмиды, одна из которых несет аллель дикого типа, а другая - аллель дикого типа (WT35 и WT45) или мутантную аллель *sup35-218*, *sup35-74* или *sup45-101*, *sup45-105*. “3 стадия” - клетки, несущие исключительно мутантную аллель соответствующего гена на плазмиде с селективным маркером *LEU2*.

Несмотря на отсутствие значимых статистических различий, мы наблюдали небольшое увеличение копийности плазмид с мутантной аллелью во всех образцах на 2 стадии (т.е., даже в присутствии дополнительной аллели дикого типа) относительно контрольных клеток, несущих две аллели дикого типа и обозначенных на рисунке как WT35 и WT45. В соответствии с предыдущими результатами, для всех клеток, несущих исключительно

мутантную аллель (3 стадия) было обнаружено статистически значимое увеличение копийности плазмиды, несущей мутантную аллель *sup35-n* или *sup45-n*. Полученные результаты свидетельствуют в пользу гипотезы о том, что увеличение числа копий плазмиды служит основным механизмом адаптации дрожжевых клеток к мутациям в генах факторов терминации трансляции. Полученные результаты также показывают, что запуск процессов, отвечающих за адаптацию к нарушениям терминации трансляции, происходит даже в том случае, когда в клетке наряду с мутантной аллелью *sup35-n* или *sup45-n* содержится аллель *SUP35* или *SUP45* дикого типа.

Для выяснения того, оказывает ли увеличение количества копий плазмиды какой-либо эффект на уровне экспрессии мутантных аллелей соответствующих генов, мы провели анализ экспрессии генов *SUP35* и *SUP45* с помощью ПЦР-РВ. Для этого анализа были выбраны мутантные аллели *sup35-218* и *sup45-105*. В обоих случаях мы наблюдали устойчивое и значительное увеличение уровня экспрессии мутантных аллелей. Важно отметить, что не было обнаружено изменений в экспрессии аллелей *SUP35* и *SUP45* дикого типа в клетках, несущих аллели *sup35-218* и *sup45-105* соответственно (Рис. 1-5).

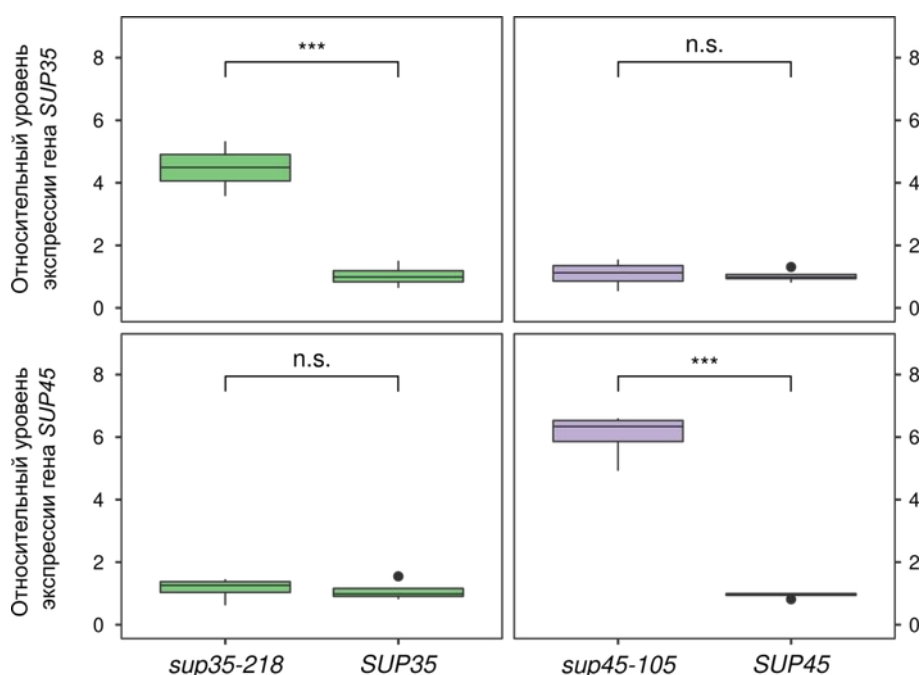


Рисунок 1-5. Уровни экспрессии генов *SUP35* и *SUP45* увеличены в клетках, содержащих мутантные аллели *sup35-218* и *sup45-105* на плазмиде. Относительные уровни экспрессии соответствующих генов оценивали с использованием метода $\Delta\Delta\text{CT}$. В качестве референсного гена во всех случаях использовали *ADHI*. n.s. - $p > 0,05$; *** - $p < 0,001$ по критерию Вилкоксона-Манна-Уитни.

Результаты анализа экспрессии генов показывают, что увеличение количества копий плазмиды действительно приводит к увеличению уровня транскрипции мутантных аллелей, которые, в свою очередь, могут способствовать более высокому уровню продукции полноразмерных белков.

1.3. Оценка копийности плазмиды, несущей аллели *SUP35* и *SUP45* у клеток, полученных при помощи обратного замещения аллелей *sup35-n*, *sup45-n* на аллели дикого типа.

Получены штаммы, несущие аллели *SUP35* (штамм 14-D1690) или *SUP45* (штамм 1A-D1628), при помощи обратного замещения аллелей *sup35-n*, *sup45-n* на соответствующую аллель дикого типа. Эти штаммы охарактеризованы по фенотипу. В настоящее время проводится выделение геномной ДНК из полученных штаммов. Затем будет проведена оценка числа копий плазмид, несущих гены *SUP35* и *SUP45* при помощи ПЦР в реальном време-

ни. Выполнение этого пункта смещено на начало 2022 г в связи с досрочным выполнением пункта 1.6 в 2021 г., а также дополнительными (не запланированными ранее) экспериментами в пункте 1.2 (оценка экспрессии генов *SUP35* и *SUP45*).

1.4. Изучение влияния генов *UPF1* и *PSH1* на копийность центромерных плазмид, несущих мутантные аллели генов *SUP45* и *SUP35*.

Нами были сконструированы плазмиды YEplac181GC9H-sgU1(7) и YEplac181GC9H-sgP1(6) на основе вектора pML107 (Laughery et al., 2015), содержащие ген Cas9 под контролем промотора *GPD*, а также кассету для экспрессии направляющей РНК, узнающей мишени в гене *UPF1* (U1(7)) или *PSH1* (P1(6)), под контролем промотора *SNR52* (Рис. 1-6). Плазмиды содержат маркер *LEU2*.

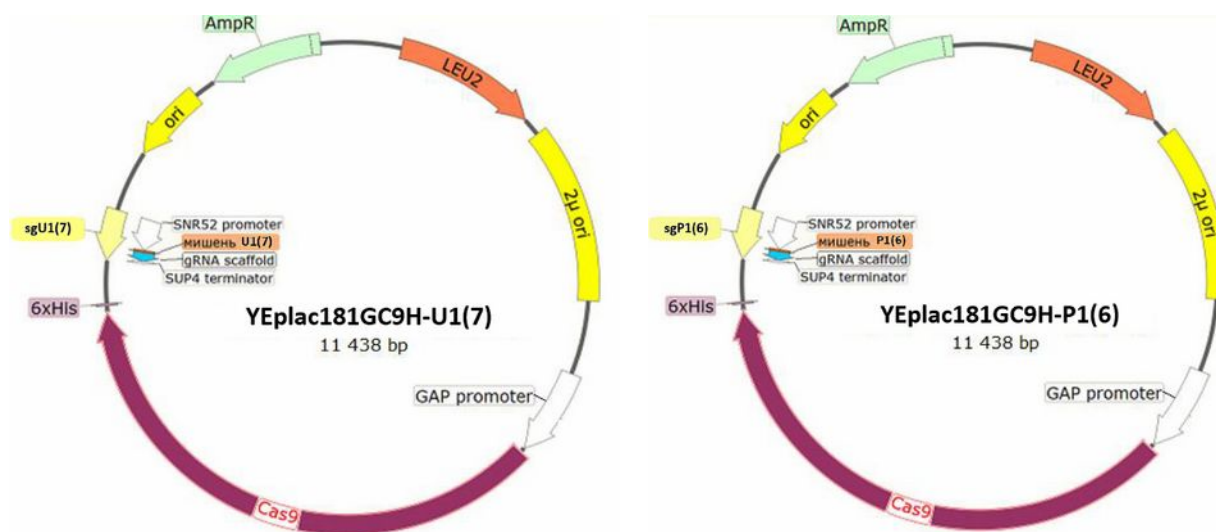


Рисунок 1-6. Физические карты сконструированных плазмид. ori – бактериальный ориджин репликации; AmpR – ген устойчивости к ампициллину; LEU2 – дрожжевой селективный маркер; AmpR – бактериальный ген устойчивости к ампициллину; 2μ ori – ориджин репликации 2μ ДНК; белыми стрелками изображены промоторы соответствующих генов.

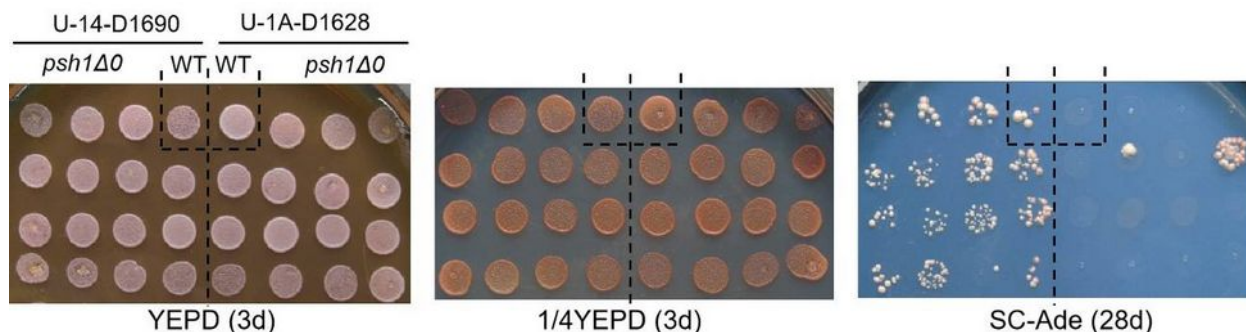
Для получения штаммов с делецией гена *UPF1* штаммы U-14-D1690 и U-1A-D1628 трансформировали плазмидой YEplac181GC9H-U1(7) и ПЦР-продуктом, содержащим кассету *kanMX*, обеспечивающую устойчивость к генетицину, фланкированную участками гомологии с 5' и 3'-нетранслируемыми областями гена *UPF1*. После трансформации отбирали штаммы, устойчивые к генетицину, у которых, в свою очередь, отбирали субклоны, потерявшие плазмиду с *LEU2*.

Для получения штаммов с делецией гена *PSH1* штаммы U-14-D1690 и U-1A-D1628 трансформировали плазмидой YEplac181GC9H-P1(6) и фрагментом для репарации. Этот фрагмент представлял собой фрагмент двунитовой ДНК, длиной 110 п.н., содержащий конец промотора гена *PSH1* и начало терминатора данного гена, благодаря чему при успешной рекомбинации данный ген полностью делетировался. Наличие делеции проверяли при помощи ПЦР с праймерами к участкам, фланкирующим *PSH1*.

Проверка фенотипов отобранных штаммов не выявила существенного влияния полученных делеций на нонсенс-супрессию (Рис. 1-7А). Однако штаммы, производные U-14-D1690, но не U-1A-D1628, с делецией гена *PSH1* демонстрировали повышенную частоту формирования клонов Ade⁺ при длительной инкубации на соответствующей среде, что могло свидетельствовать о повышенной частоте спонтанной индукции приона [*PSI⁺*]. Мы подтвердили это предположение, пассировав отобранные на среде без аденина клоны на среде, содержащей GuHCl. Такое воздействие привело к потере или ослаблению супрессорного фенотипа данных штаммов (Рис. 1-7Б), что говорит о том, что делеция гена

PSH1 действительно приводит к повышению частоты формирования [*PSI*⁺] в штамме U-14-D1690. Поскольку известно, что *PSH1* может влиять на сегрегацию плазмид, можно предположить, что данный эффект вызван повышением в некоторых клетках копияности плазмиды rRSU2, несущей ген *SUP35*, что приводит к его повышенной экспрессии и, как следствие, повышению вероятности возникновения приона.

А.



Б.

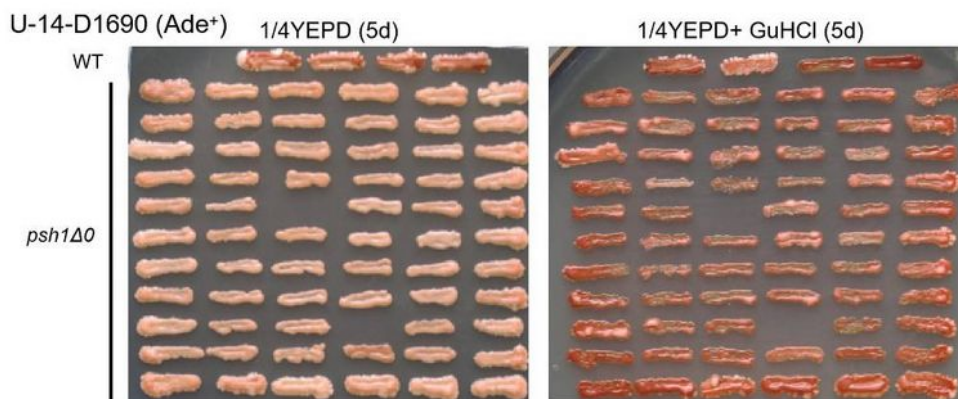


Рисунок 1-7. Фенотипический анализ штаммов с делецией *PSH1*. А. Отобранные штаммы с делецией *PSH1* были высеяны на указанные среды после достижения стационарной фазы в жидкой культуре. Б. Клоны, выросшие на SC-Ade были посеяны на среды 1/4YEED с добавлением и без добавления GuHCl. Красный цвет колоний означает, что GuHCl приводит к изгнанию приона.

Для фенотипической оценки полученных штаммов использовали серию сред, содержащую полную среду (YEED), селективные среды (SC-His, SC-Ura и др.) и среду для проверки дыхательной компетентности, где в качестве источника углерода вместо глюкозы используется глицерин (YPGly). Для относительной полуколичественной оценки роста для каждого штамма делали серию десятикратных разведений (**Рис. 1-8**). Как оказалось, делеции генов *UPF1* и *PSH1* не приводили к изменению фенотипа, поскольку на всех средах скорость роста штаммов не отличалась от скорости роста исходных штаммов U-1A-D1628 (*SUP45*) и U-14-D1690 (*SUP35*). Таким образом, делеции генов *UPF1* и *PSH1* не влияют на жизнеспособность изучаемых штаммов.

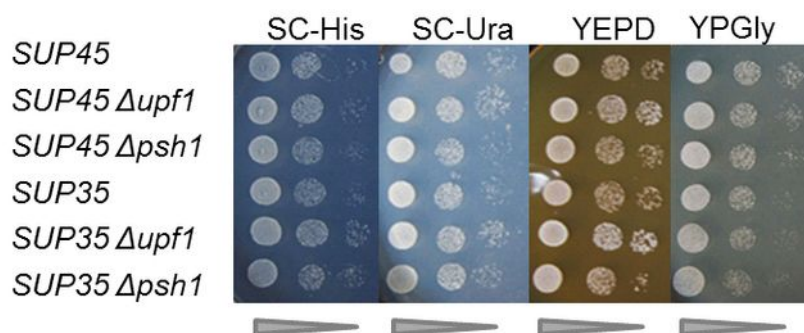


Рисунок 1-8. Фенотипическая характеристика штаммов, несущих делеции в генах *UPF1* и *PSH1*. Показан рост штаммов на полной (YEPD), селективных средах (SC-His и SC-Ura) и среде, содержащей глицерин в качестве источника углерода (YPGly). Рост всех анализируемых штаммов на селективных средах, не содержащих лизин, аденин, триптофан, лейцин отсутствовал (данные не представлены). Десятикратное разведение культуры показано внизу серым треугольником.

В ходе выполнения предыдущего этапа гранта РФФИ, а также этапа 2021г нами показано, что у нонсенс-мутантов *sup45-n* и *sup35-n* происходит увеличение числа копий генов *sup35-n* и *sup45-n* за счет амплификации центромерной плазмиды, на которой расположены изучаемые гены (Maksiutenko et al., в печати). Ранее нами показано, что делеция гена *UPF1*, кодирующего белок, который участвует в процессе NMD, приводит к увеличению жизнеспособности мутантов по генам *SUP35* и *SUP45* (Chabelskaya et al., 2007; Журавлёва и Грызина, 2012). Также, ранее в литературе описана делеция гена *PSH1*, которая приводит к увеличению копий центромерных плазмид. Поэтому мы решили проверить, приведет ли подобное увеличение к изменению жизнеспособности мутантов по генам *SUP35* и *SUP45*.

На первом этапе работы мы проводили трансформацию плазмидой pRSU1 с нонсенс-мутацией *sup35-n* (где n-21, -74, -218) и аллелью *SUP35* дикого типа в штаммах U-14-D1690 (*SUP35*), U-14-D1690-uk.3 (*SUP35 upf1Δ*) и U-14-D1690-p1Δ0.17 (*SUP35 psh1Δ*). В данных штаммах делеция гена *SUP35* компенсирована его копией дикого типа на центромерной плазмиде pRSU2. Аналогично проводили трансформацию плазмидами серии pRS315 с нонсенс-мутацией *sup45-n* (где n-101, -102, -104, -105, -107) и аллелью *SUP45* дикого типа в штаммах U-1A-D1628 (*SUP45*), U-1A-D1628-uk.3 (*SUP45 upf1Δ*), U-1A-D1628-p1Δ0.1 (*SUP45 psh1Δ*). Далее проводили отбор штаммов, имеющих фенотип Ura⁺Leu⁺. Штаммы, несущие ген *LEU2*, в обоих случаях были получены с помощью индуцированной потери плазмид pRSU2 или pRS316-SUP45 на селективной среде без лейцина с добавлением 5-фтороротовой кислоты (5-FOA).

На первом этапе мы провели глобальный скрининг влияния изучаемых делеций, используя различные нонсенс-мутации в генах *SUP45* и *SUP35*. Мы оценивали рост полученных трансформантов на селективной среде без лейцина, содержащей 5-FOA. Полученные экспериментальные данные представлены на рисунке 1-9. Как оказалось, делеция гена *UPF1* значительно повышает жизнеспособность нонсенс-мутантов как по гену *SUP45*, так и по гену *SUP35*. В то же время, делеция гена *PSH1* не влияет частоту потери центромерной плазмиды с геном дикого типа.

Делеция гена *UPF1* влияет как на частоту потери плазмиды в штамме дикого типа, так и на частоту потери на фоне миссенс-мутации *sup45-103* (Рис. 1-10). Таким образом, увеличение частоты потери на фоне этой делеции характерно не только для нонсенс-мутантов *sup45-n* и *sup35-n*. Как видно на рисунке, двойные трансформанты в штаммах *sup45-105 upf1Δ*, *sup45-103 upf1Δ*, *sup35-21 upf1Δ* и *sup35-74 upf1Δ* также лучше растут на селективной среде без аденина, что связано с усилением нонсенс-супрессии мутации в гене *ade1* в данных штаммах. По всей видимости, это связано с нарушением процесса нонсенс-опосредованной деградации транскриптов, содержащих нонсенс-мутации (NMD) вследствие

отсутствия белка Upf1.

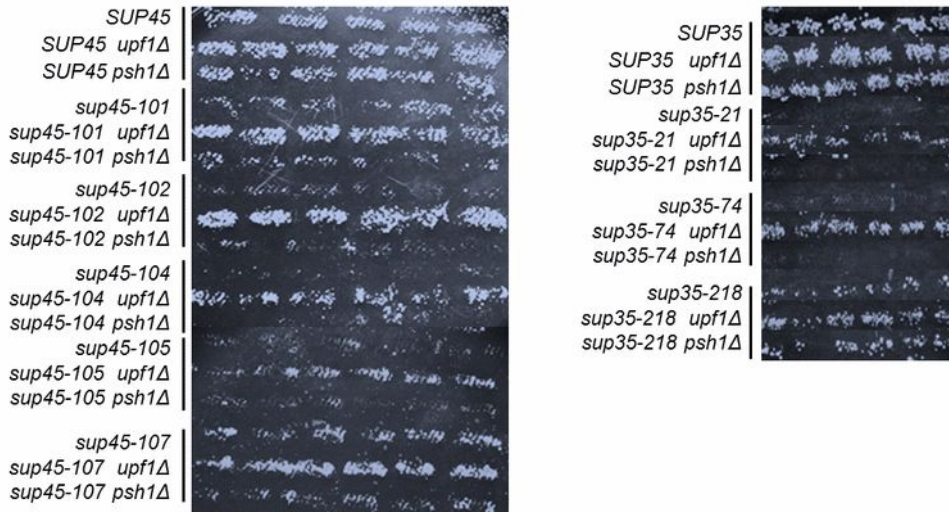


Рисунок 1-9. Анализ частоты потери центромерной плазмиды с генами *SUP45* или *SUP35* дикого типа в штаммах с делецией генов *UPF1* и *PSH1* по росту на селективной среде, содержащей 5-FOA.

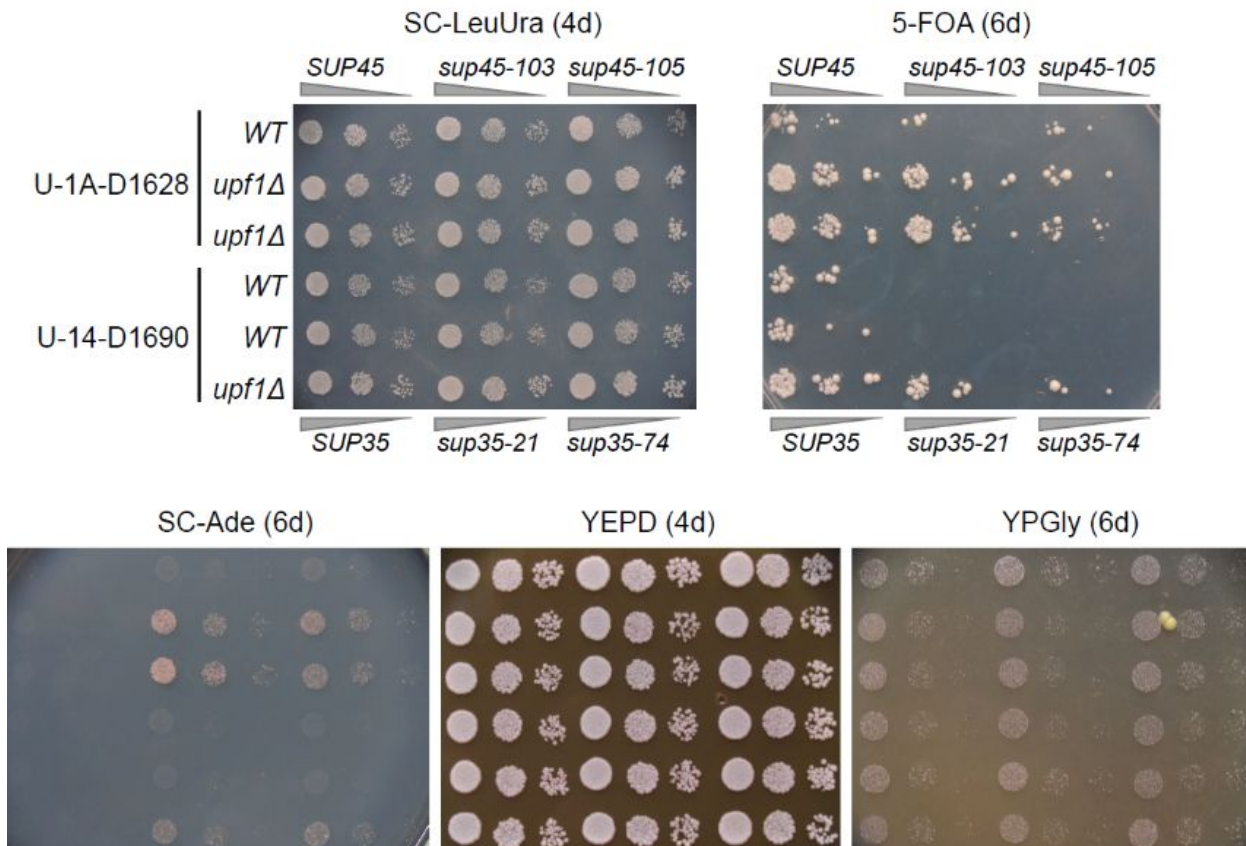


Рисунок 1-10. Делеция гена *UPF1* приводит к увеличению частоты потери центромерной плазмиды, а также усилению нонсенс-супрессии в штаммах, содержащих мутации в генах *SUP45* и *SUP35*. Показан рост штаммов на полной (YEPD), селективных средах (SC-LeuUra и SC-Ade, SC-Leu+5-FOA (5-FOA)) и среде, содержащей глицерин в качестве источника углерода (YPGly). Десятикратное разведение культуры показано внизу серым треугольником. В скобках показано количество дней инкубации (4d – 4 дня, 6d – 6 дней).

1.5. Оценка числа копий *sup35-n* и *sup45-n* (штамм 1Б-Д1606) при помощи ПЦР-РВ в случае их локализации в геноме в качестве единственной хромосомной копии *SUP35/SUP45*

Отдельный интерес представляет изучение адаптации штаммов дрожжей, несущих мутантные аллели генов *SUP35* и *SUP45* в качестве единственной хромосомной копии соответствующего гена. Такие штаммы (n-1Б-Д1606) были получены в нашей лаборатории ранее (Moskalenko *et al.*, 2003; Chabelskaya *et al.*, 2004). Для выяснения механизмов адаптации таких штаммов к нарушениям терминации трансляции нами была выделена геномная ДНК из клеток дрожжей 1Б-Д1606, несущих мутации *sup35-n* (wt, 203, 218, 244, 240, 260) и *sup45-n* (wt, 101, 102, 104, 105, 107). На первом этапе исследования геномная ДНК была использована для проведения ПЦР-РВ с праймерами к генам *SUP45* и *SUP35*. В качестве референсного гена использовали *ACT1* (Рис. 1-11).

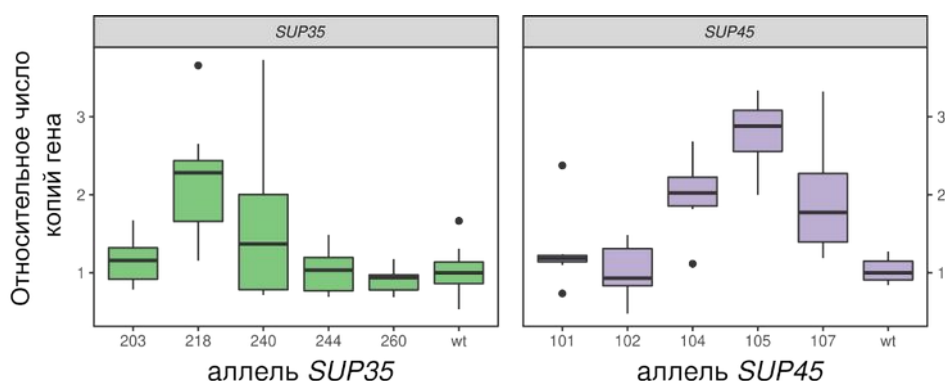


Рисунок 1-11. Количество копий некоторых мутантных аллелей *sup35-n* и *sup45-n* увеличено в клетках штамма 1Б-Д1606. На рисунке представлены графики показывающие число копий аллелей *sup35-n* (слева) и *sup45-n* (справа) относительно штамма дикого типа 1Б-Д1606 (wt), определенное при помощи ПЦР-РВ. Относительное число копий гена было оценено с использованием метода $\Delta\Delta C_T$ (Livak and Schmittgen 2001).

Для ПЦР-РВ для каждого образца было взято не менее 7 биологических повторностей. Результаты ПЦР в реальном времени показывают, что количество копий мутантных аллелей генов факторов терминации трансляции увеличено по сравнению с контролем дикого типа в нескольких исследованных штаммах (Рис. 1-11). В частности, мы наблюдали двукратное увеличение количества копий для аллелей *sup35-218*, *sup45-104* и *sup45-107*. В случае *sup45-105* число копий было увеличено почти в три раза, хотя различия между *sup45-105* и *sup45-104* или *sup45-107* не показывают статистической значимости ($p > 0,05$ оценено при помощи теста Вилкоксона-Манна-Уитни). В случае аллеля *sup35-240* результаты анализа ПЦР-РВ были неоднозначными и варьировались от 1 до 4 копий гена в разных биологических повторностях. Для остальных протестированных мутантных аллелей (*sup35-203*, *sup35-244*, *sup35-260*, *sup45-101*, *sup45-102*) количество копий не отличалось от дикого типа (Рис. 1-11). Таким образом, для выяснения механизмов адаптации таких штаммов к мутациям в генах факторов терминации трансляции было необходимо провести полногеномное секвенирование этих штаммов.

1.6. Секвенирование генома штамма 1Б-Д1606, содержащего мутантные аллели *sup35-n* и *sup45-n* в геноме в качестве единственной хромосомной копии *SUP35/SUP45*. Биоинформатический анализ полученных данных (2021-2022)

С использованием технологии Illumina, было проведено полногеномное секвенирование различных штаммов n-1Б-Д1606, несущих мутантные аллели *sup45-n* и *sup35-n*. Полученные данные секвенирования сравнивали с эталонной сборкой генома штамма Петергофской генетической коллекции U-1A-D1628, описанной в предыдущих разделах. На первом этапе

анализа при помощи утилиты Qualimap (<http://qualimap.conesalab.org/>) проводили анализ профиля покрытия генома прочтениями с целью выявления участков генома, число копий которых увеличено или уменьшено по сравнению с клетками 1Б-Д1606 дикого типа. В соответствии с результатами ПЦР-РВ, в некоторых штаммах мы наблюдали увеличение покрытия в регионах, где расположены гены *SUP35* и *SUP45* (Рис. 1-12). Однако такое увеличение произошло по разным причинам: например, в случае аллелей *sup45-104*, *sup45-105* и *sup45-107* мы наблюдали дисомию хромосомы II; в то время как для мутации *sup35-218* мы наблюдали локальную дупликацию сегмента хромосомы IV, содержащего ген *SUP35*.

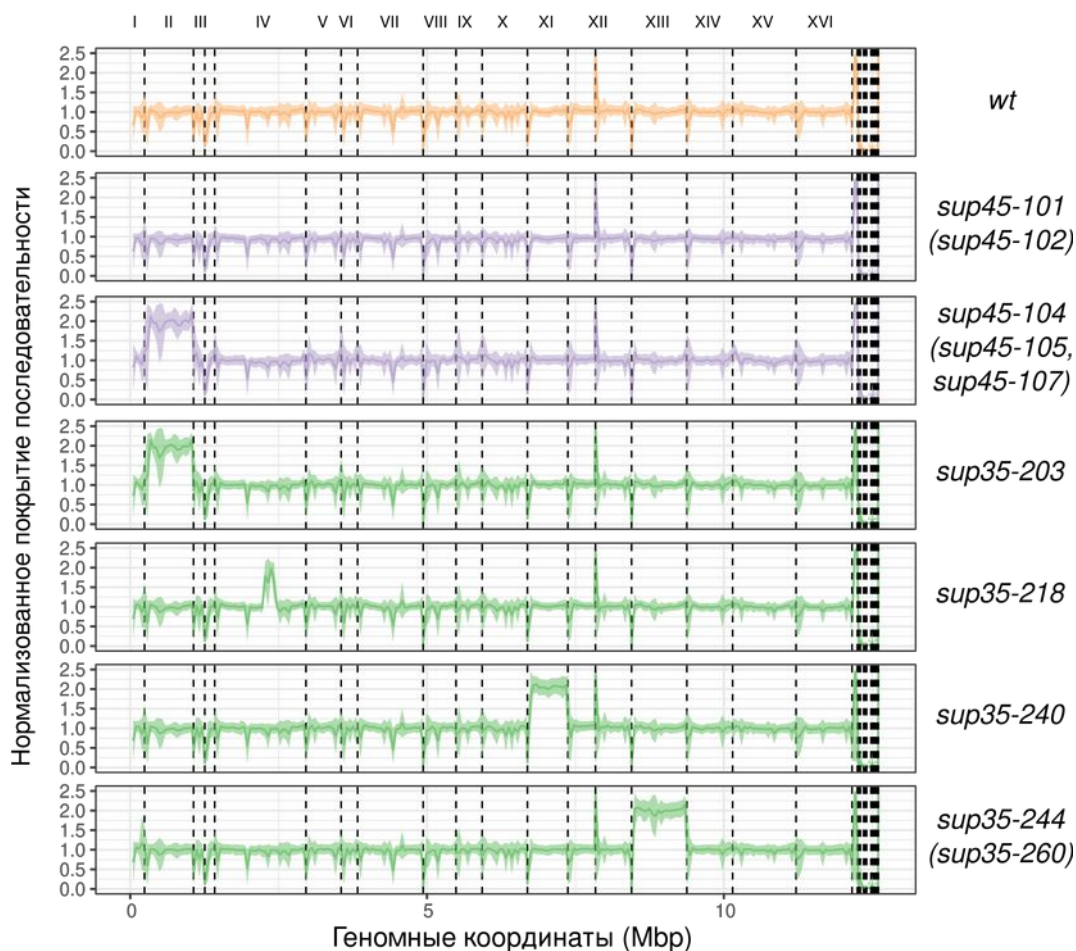


Рисунок 1-12. Визуализация результатов полногеномного секвенирования штаммов n-1Б-Д1606, содержащих мутантные аллели *sup35-n* и *sup45-n* в геноме. На рисунке представлены нормализованные профили покрытия относительно последовательности генома U-1A-D1628. Пунктирные линии соответствуют границам контигов. Показаны репрезентативные профили покрытия для указанных наборов аллелей; штаммы с аналогичными профилями покрытия указаны в скобках.

Интересно отметить, что границы этой дупликации были идентичны границам дупликации, которые ранее наблюдались в случае аллеля *sup35-222* (Matveenko *et al.*, 2009). Также было обнаружено несколько случаев, в которых мутантные штаммы были дисомиками по хромосомам, не содержащим генов факторов терминации трансляции. Например, в случае мутации *sup35-240*, для которой результаты ПЦР-РВ были неоднозначными, мы наблюдали дисомию хромосомы XI. В случае *sup35-203* мы также наблюдали дисомию хромосомы II, несущей ген *SUP45*. Наконец, в штаммах 244-1Б-Д1606 и 260-1Б-Д1606 мы обнаружили дисомию по хромосоме XIII (Рис. 1-12). Таким образом, полученные результаты показывают, что адаптация к нонсенс мутациям в генах факторов терминации в штаммах 1Б-Д1606 включает как амплификацию соответствующего аллеля посредством локальной дупликации или дисомии, так и дупликации других хромосом. В то же время, конкретные механизмы того, как именно изменения числа копий хромосом XI и XIII у дрожжей связаны с

адаптацией к нарушениям терминации трансляции, требуют дальнейшего изучения.

На основе результатов, представленных в разделе 1 (кроме раздела 1.4), была подготовлена статья, которая на момент составления отчета прошла первый круг рецензирования в журнале Genes (IF 4,096).

2. Взаимодействие генетических и эпигенетических факторов в контроле терминации трансляции.

2.1. Изучение индукции приона $[PSI^+]$ в клетках дрожжей, содержащих нонсенс-мутации в гене *SUP35*.

Для сравнения эффективности индукции $[PSI^+]$ в присутствии нонсенс-мутаций в гене *SUP35* у штаммов $[psi^-]$, не содержащих прион, использовали различные методы, включая флуоресцентную микроскопию и электрофорез в агарозном геле (SDD-AGE).

Штамм 7a-D835 $[psi^-][PIN^+]$ [pRSU1] с единственной копией *SUP35* на центромерной плазмиде трансформировали серией плазмид pRS316/PCUP1-sup35n-GFP, в которых под контролем промотора *CUP1* вставлены последовательности, кодирующие укороченные варианты белков Sup35, слитых с Gfp. В жидкой селективной среде выращивали по три трансформанта для каждой плазмиды до OD_{600} 0,1-0,2. Затем добавляли $CuSO_4$ до конечной концентрации 50 мкМ и растили культуры в течении 24 часов. После индукции высевали аликвоты клеток на $\frac{1}{4}$ YEPD и растили 3-4 дня, затем считали количество красных, секторных, розовых и белые колоний. Кроме этого, оставшиеся клетки собирали из жидкой культуры и проверяли на наличие агрегатов укороченных вариантов Sup35 с помощью флуоресцентной микроскопии и SDD-AGE.

Сверхпродукция Sup35NM-GFP приводила к возникновению приона с частотой более 35%, что соответствует описанным ранее результатам. Спонтанная частота появления $[PSI^+]$ составила порядка 1% (конструкция с GFP) (Рис. 2-1). В присутствии мутантного варианта Sup35-240 $[PSI^+]$ появлялся менее чем у 5% клеток. Также с низкой частотой индукцию $[PSI^+]$ вызывал укороченный белок Sup35-21. Короткий белок Sup35-218 индуцировал $[PSI^+]$ в два раза хуже, чем Sup35NM, а вариант Sup35-74 приводил к появлению $[PSI^+]$ значительно эффективнее Sup35NM в 50% клеток. Все частоты формирования приона при сверхпродукции *sup35-n* значимо отличаются от контролей (Sup35NM и GFP) (Рис. 2-1).

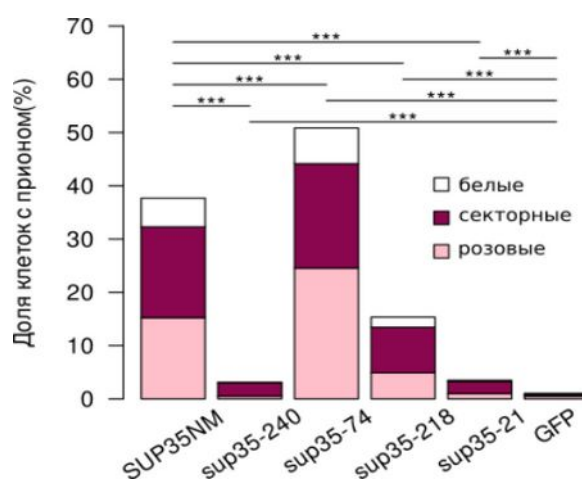


Рисунок 2-1. Сравнение частоты возникновения $[PSI^+]$ при сверхпродукции укороченных вариантов Sup35. Статистическую обработку данных проводили с помощью теста Фишера с поправкой на множественные сравнения (метод Холма). Белые, секторные и розовые колонии соответствуют разным вариантам приона $[PSI^+]$.

С помощью флуоресцентной микроскопии у трансформантов после сверхпродукции укороченных вариантов Sup35 проверили наличие агрегатов и их морфологию (Рис.2-2). Оказалось, что в клетках с Sup35-240 присутствует множество очень мелких агрегатов по всей клетке. Клетки после сверхэкспрессии *sup35-74* содержат одновременно много мелких и крупных агрегатов (возможно, они представляют собой скопления агрегатов) с нечеткими краями, также наблюдали много клеток с ленточными структурами. В клетках с Sup35-218 агрегаты похожи на клетки с Sup35-74, также есть мелкие и крупные агрегаты с нечеткими краями, но по сравнению у Sup35-218 больше клеток с крупными фокусами и меньше с ленточными структурами. В большей части светящихся клеток, несущих Sup35-21, встречаются крупные единичные четкие агрегаты.

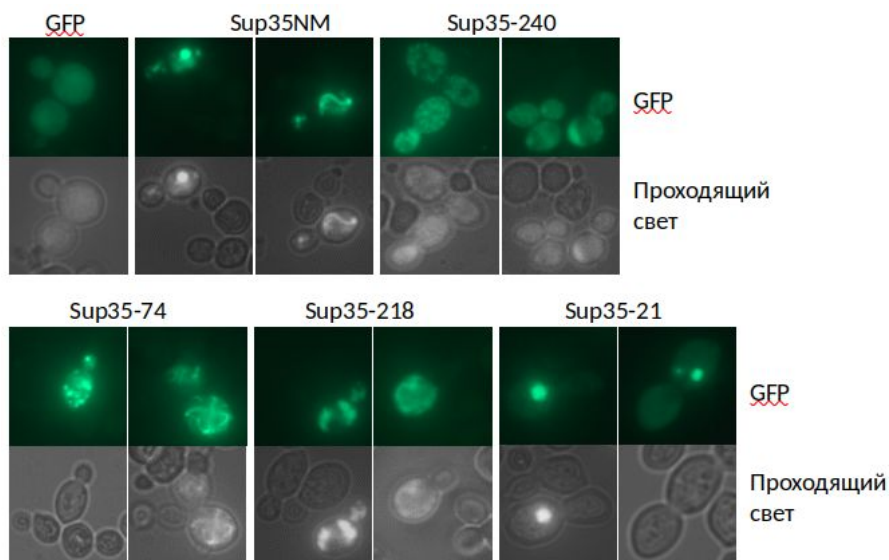


Рисунок 2-2. Флуоресцентные фокусы в клетках со сверхпродукцией укороченных вариантов Sup35 имеют разную морфологию. Представлены репрезентативные микрофотографии отдельных клеток при флуоресценции (GFP) и в проходящем свете с характерной картиной агрегации.

Мы сравнили частоту клеток с флуоресцентными агрегатами при сверхпродукции укороченных вариантов Sup35 (Табл.2-1). Она оказалась выше частоты возникновения [*PSI*⁺] (Рис.2-1). Это может быть связано с тем, что не все агрегаты приводят к возникновению [*PSI*⁺], а также с гибелью клеток, вызванной прионной токсичностью при сверхэкспрессии укороченных белков.

Таблица 2-1. Сравнение частоты появления клеток с флуоресцентными агрегатами при сверхпродукции укороченных вариантов Sup35.

| Варианты <i>SUP35</i> | Всего клеток | Клеток с агрегатами (%) |
|-----------------------|--------------|-------------------------|
| NM | 889 | 65,5 |
| 240 | 840 | 15,6 |
| 74 | 1077 | 73,6 |
| 218 | 229 | 74,2 |
| 21 | 1315 | 59,6 |
| GFP | 529 | 0 |

Наличие агрегатов проверяли также с помощью SDD-AGE (Рис.2-3). Из клеток, собранных после индукции, выделяли белки с помощью стеклянных шариков, проводили электрофорез белков в агарозном геле, затем - капиллярный перенос белков на PVDF мембрану и гибридизацию с антителами к Sup35 (SE4290). В случае GFP видны мономеры Sup35, у Sup35-NM наблюдается присутствие агрегатов. В присутствии Sup35-240 нет сигнала в области агрегатов и видны мономеры. Sup35-74 и Sup35-218 образуют более крупные агрегаты. Для Sup35-21 наблюдается переходное олигомерное состояние Sup35 (Рис. 2-3).

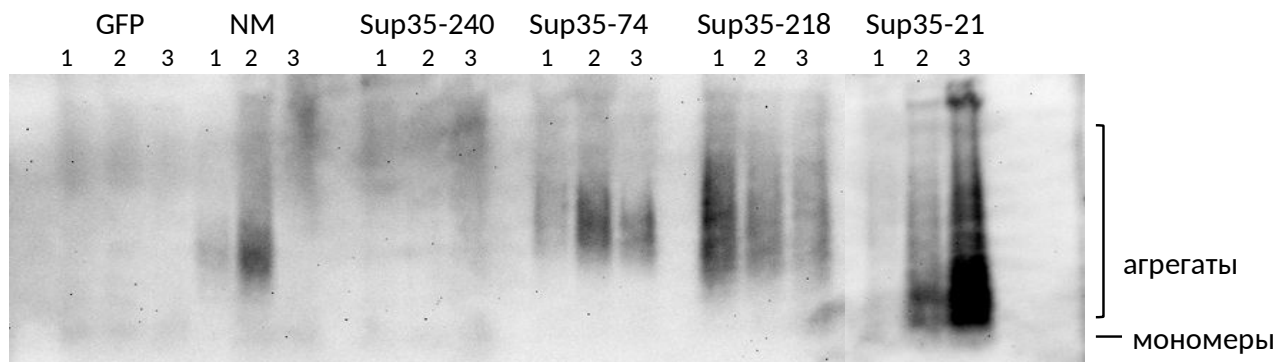


Рисунок 2.3. Различия в размере агрегатов Sup35-n-GFP. Представлены результаты SDD-AGE лизатов клеток со сверхпродукцией различных укороченных вариантов Sup35, слитых с GFP. Для вестерн-блот гибридизации использованы антитела против GFP. Эксперимент был проведен в трех биологических повторностях.

Для сравнения способности формирования фибрилл N-терминальными фрагментами белка Sup35 *in vitro* из клеток бактерий *E.coli* с помощью аффинной хроматографии были получены препаративные количества укороченных фрагментов Sup35, за исключением Sup35-240, для которого не удалось добиться продукции в клетках бактерий. Все белки очищали в денатурирующих условиях (в присутствии 8М мочевины), чтобы предотвратить преждевременную агрегацию белка. Перед постановкой эксперимента белки сильно концентрировали, чтобы иметь возможность развести растворы перед началом эксперимента не менее чем в 100 раз в буфере без мочевины. Перед экспериментом белок сначала разводили в 50 раз, и центрифугировали получившийся раствор в течение получаса на максимальной скорости, чтобы осадить агрегаты. После это белки смешивали с буфером, содержащим Тиофлавин Т (ThT) в соотношении 1:1. Финальная концентрация белков в пробах составляла 3-7 мкМ. Изменение флуоресценции ThT в пробах с белками измеряли на приборе ClarioStar (BMG).

Данные о кинетики агрегации белков были проанализировали следующим образом. Для каждой реакции нормализовали данные, принимая за ноль минимальные значения, а за единицу — медиану флуоресценции на стадии «плато», когда процесс агрегации заканчивался. Затем для каждой реакции подбирали параметры следующей модели:

$$y = A_2 + \frac{A_1 - A_2}{1 + e^{\frac{(x-x_0)}{dx}}}$$

где A_1 и A_2 начальный и финальный уровень флуоресценции, x_0 — время полуреакции, dx — величина обратная скорости агрегации. С учетом подобранных параметров также рассчитывали время lag фазы реакции: $lag = x_0 - 2dx$.

В результате проведенного анализа удалось показать, что Sup35-218 агрегирует быстрее, чем Sup35NM, а Sup35-21 — медленнее (параметр dx — величина обратная скорости агрегации). При этом, время lag фазы отличается только у Sup35-21 и оно гораздо выше по

сравнению с другими проанализированными фрагментами (Рис. 2-4). В случае Sup35-74 собрать аналогичных данных не удалось, поскольку этот белок формировал крупные аморфные агрегаты сразу после снижения концентрации мочевины. В результате при центрифугировании растворов белков перед экспериментами основная масса Sup35-74 оставалась в осадке и не попадала в реакцию.

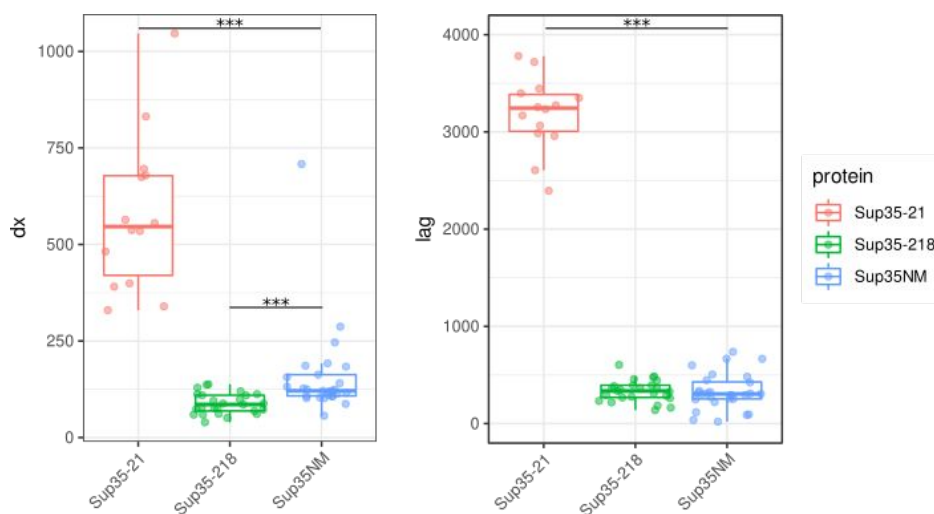


Рисунок 2-4. Отличия в агрегации фрагментов Sup35 *in vitro*. Значения lag фазы представлены в минутах. Статистическая обработка проведена с помощью критерия Карскала-Уоллеса и попарного критерия Вилкоксона с поправкой на множественные сравнения (метод Хольма).

Морфология полученных *in vitro* агрегатов была также проанализирована с помощью просвечивающей электронной микроскопии (Рис. 2-5). В случае Sup35-74 характерных фибриллярных агрегатов обнаружить не удалось, материал был представлен в виде аморфных скоплений. В случае остальных проанализированных фрагментов фибриллы были обнаружены (Рис. 2-5).

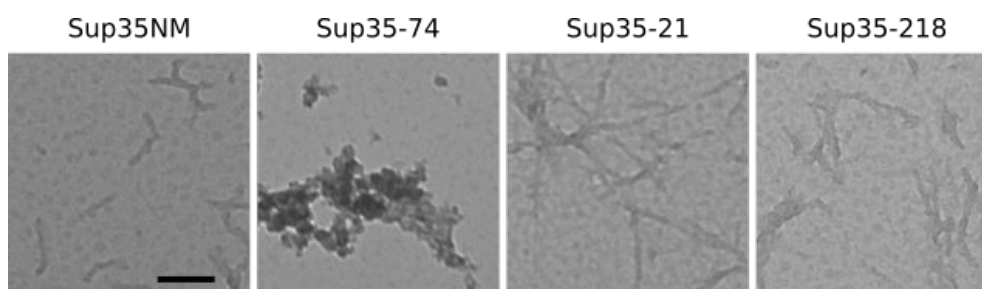


Рисунок 2-5. Микрофотографии агрегатов фрагментов Sup35. Масштабная линейка соответствует 100 нм.

Далее проводили сравнение эффективности агрегации белка дикого типа в присутствии фибрилл из укороченных вариантов Sup35 *in vitro*. При отработке экспериментов по агрегации полноразмерного Sup35 мы столкнулись с проблемой неспецифической агрегации этого белка, если он выделен в денатурирующих условиях. А именно, при резком падении концентрации мочевины в буфере белок образует крупные нерастворимые хлопья в растворе. Такой раствор оказывается непригоден для дальнейших экспериментов. В результате мы были вынуждены использовать другой буфер для очистки белка, который бы не содержал денатурирующих агентов. Однако при этом встал вопрос об том, насколько мы можем контролировать процесс агрегации, и не происходит ли агрегация уже при очистке белка. Для этого мы провели пробный эксперимент по агрегации очищенного Sup35b, при этом пробу белка мы разделили на две части, одну из которых центрифугировали на максимальной скорости, а

вторую нет. В случае, если бы агрегаты были в исходном растворе, мы бы зафиксировали изменение скорости агрегации белка в этих двух пробах (Рис. 2-6). Таким образом, в ходе очистки белка Sup35 в неденатурирующих условиях он не успевает агрегировать.

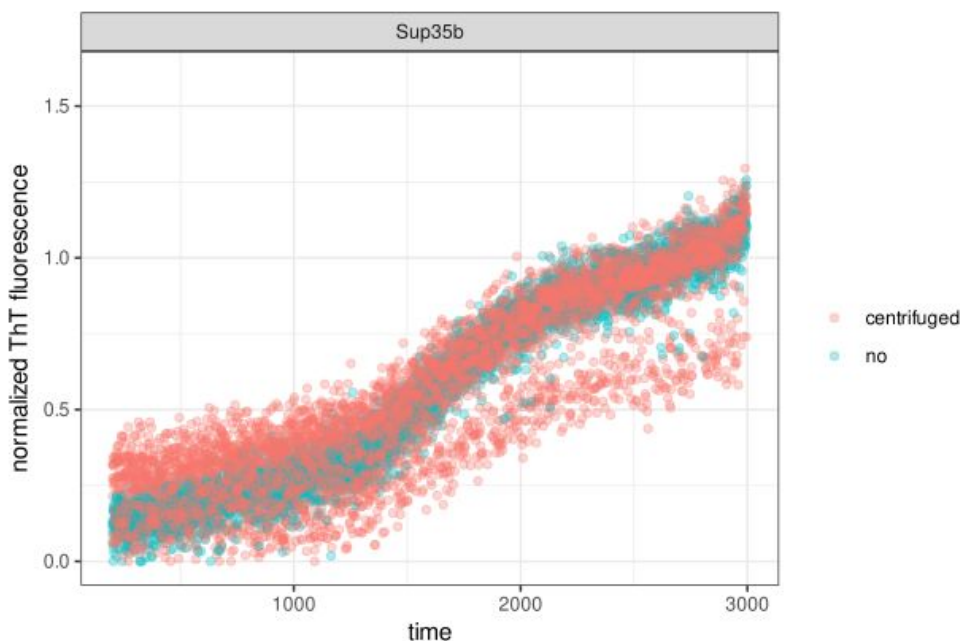


Рисунок 2-6. Спонтанная агрегация Sup35b. Представлен график изменения флуоресценции Тиофлавина Т в пробах с Sup35b, одна из которых была центрифугирована перед постановкой эксперимента.

Мы также поставили эксперимент по индукции агрегации Sup35b фибриллами Sup35NM и зафиксировали различия в скорости агрегации между пробами с предсуществующими агрегатами и без них. Также мы обратили внимание, что lag фаза агрегации отсутствовала в образцах с фибриллами Sup35NM (Рис. 2-7). Таким образом, мы провели все подготовительные эксперименты для сравнения эффективности агрегации белка дикого типа в присутствии фибрилл из укороченных вариантов Sup35 *in vitro*. Эти эксперименты запланированы на начало 2022 года.

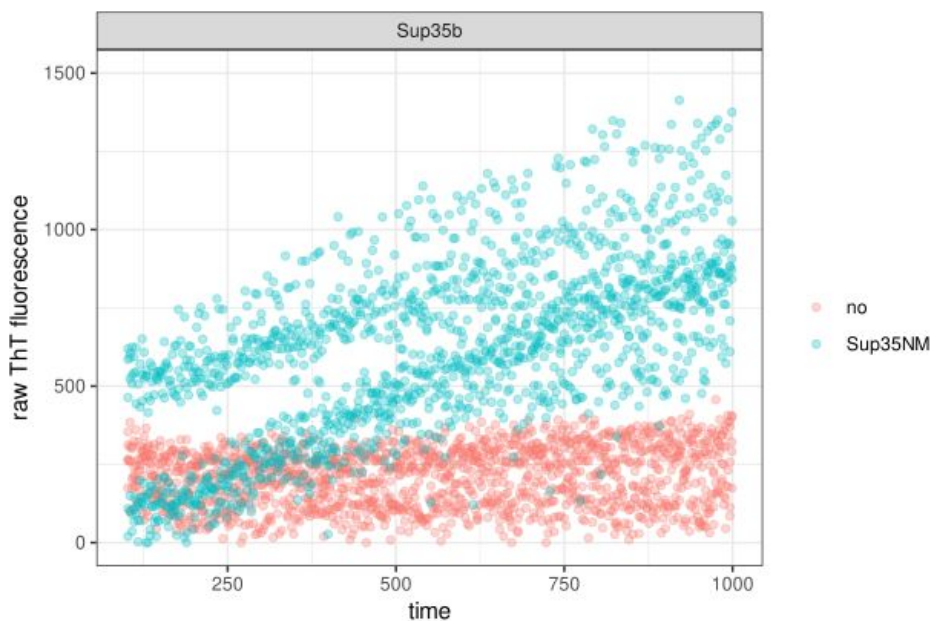


Рисунок 2.7. Агрегаты Sup35NM ускоряют агрегацию Sup35b и нивелируют lag фазу агрегации. Представлены ненормализованные данные флуоресценции Тиофлавина Т.

На основании совокупности данных (Табл.2-2) мы можем заключить, что фрагмент Sup35-240 существенно снижает способность белка к агрегации и индукции приона [PSI^+]. Наиболее вероятным объяснением этого факта является то, что соответствующий фрагмент слишком короткий (включает только первые 55 аминокислот) и не достаточен для индукции приона. Аллель *sup35-21* имеет сходное проявление, однако в данном случае наиболее вероятным объяснением является общее снижение скорости агрегации данного белка, которое, вероятно, связано с наличием фрагмента С-домена белка Sup35. Фрагмент, соответствующий *sup35-74*, с более высокой частотой агрегирует в клетках дрожжей и, скорее всего, благодаря этому эффективнее индуцирует [PSI^+]. С точки зрения эффективности агрегации наиболее интересной мутацией является *sup35-218*, поскольку соответствующий белок демонстрирует более высокую скорость агрегации *in vitro* и приводит к большему числу клеток с агрегатами *in vivo*. Однако, частота индукции приона после сверхпродукции этой аллели оказывается снижена. Возможно, что недостающий (по отношению к Sup35NM) фрагмент М-домена требуется для «созревания» приона и формированию инфекционных свойств агрегатов. А поскольку он отсутствует в фрагменте Sup35-218 частота возникновения приона снижается. С другой стороны, эта гипотеза плохо согласуется с эффектом *sup35-74*.

Таблица 2-2. Сводные результаты по агрегации укороченных фрагментов Sup35 в разных системах.

| Мутация | Агрегация | | | | Индукция [PSI^+] | |
|------------------|-------------|--------------------|----------------|---------------------|----------------------|----------|
| | in vivo GFP | in vivo SDD-AGE | in vitro (lag) | in vitro (скорость) | in vivo | in vitro |
| <i>sup35-240</i> | ↓↓↓ | Нет агрегатов | ND | ND | ↓↓↓ | ND |
| <i>sup35-74</i> | ↑ | Увеличение размера | ND | ND | ↑ | ND |
| <i>sup35-218</i> | ↑ | Увеличение размера | Нет эффекта | ↑ | ↓ | ND |
| <i>sup35-21</i> | ↓ | Увеличение размера | ↑ | ↓ | ↓↓↓ | ND |

2.2. Роль миссенс-мутаций в С-терминальном домене Sup35 в прионизации белка Sup35

Для сравнения эффективности индукции [PSI^+] у мутантных вариантов Sup35 по сравнению с полноразмерным Sup35 дикого типа штамм 7a-D382 [psi^+][PIN^+] трансформировали серией плазмид pRS316, в которых под контролем промотора *CUP1* находятся последовательности *SUP35* дикого типа или миссенс мутантных аллелей, слитые с последовательностью *GFP*. Были использованы две аллели дикого типа – из берклийской (wtb) и из петергофской (wtp) генетических коллекций, эти аллели отличаются по шести аминокислотным заменам, затрагивающим N- и М-домены Sup35, но не приводят к фенотипическим отличиям (Волков и др., 2000). Миссенс-мутация *sup35-228*, затрагивающая С-домен Sup35, была получена на фоне берклийской аллели (Chabelskaya et al., 2004), а мутации *sup30-10* и *sup35-25* - на фоне петергофской аллели (Volkov et al., 2002). Полученных трансформантов выращивали в жидкой селективной среде до OD600 0,1-0,2, после чего в среду добавляли $CuSO_4$ до конечной концентрации 50 мкМ и растили еще в течение 24 часов. Через сутки инкубации равные аликвоты клеток высевали на селективную среду ¼ YEPD, растили 3-4 дня и считали количество красных, белых, розовых и секторных колоний. Оставшиеся клетки собирали для анализа агрегатов с помощью флуоресцентной микроскопии и SDD-AGE.

Трансформантов, несущих на плазмиде только *GFP*, использовали как негативный

контроль. [*PSI*⁺] в этих клетках возникал с частотой около 1% (Рис. 2-8). Частота появления [*PSI*⁺] в клетках со сверхэкспрессией *SUP35(wtb)* оказалась выше, чем у других аллелей *SUP35*, в то время как в клетках со сверхэкспрессией *SUP35(wtp)* частота появления [*PSI*⁺] была неотличима от отрицательного контроля. Частота индукции [*PSI*⁺] мутантными аллелями не показала закономерных отличий между аллелями разных генетических линий. При этом следует отметить очень низкую частоту индукции [*PSI*⁺] полноразмерными вариантами *Sup35* в сравнении с *Sup35NM* (Рис. 2-8).

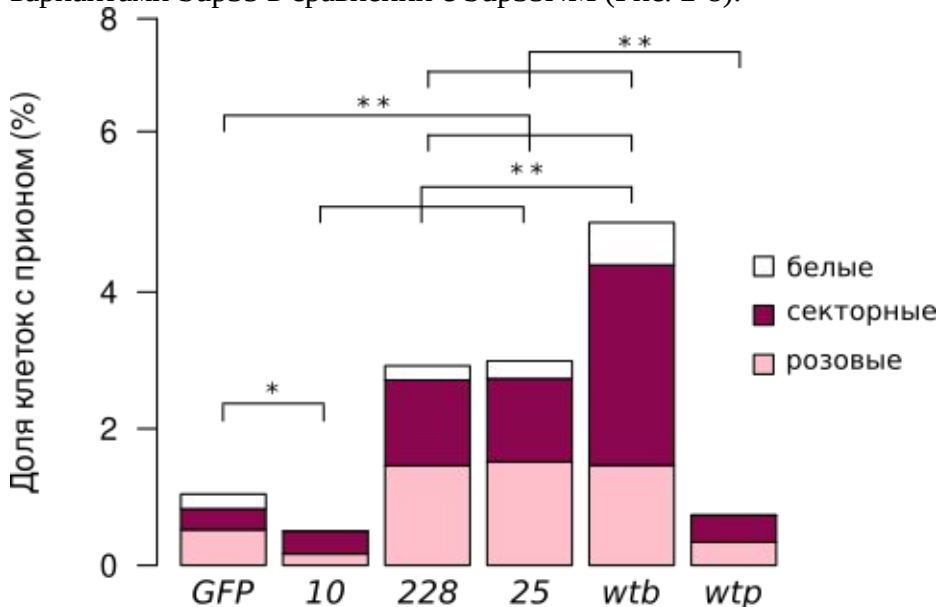


Рисунок 2-8. Сравнение частоты появления [*PSI*⁺] клонов в результате индукции конструкций с разными аллелями *SUP35*. Статистическую обработку данных проводили с помощью теста Фишера с поправкой на множественные сравнения (метод Холма).

Наличие агрегатов проверяли с помощью флуоресцентной микроскопии. Все трансформанты, сверхпродуцирующие *Sup35-GFP*, образовывали похожие крупные множественные флуоресцентные фокусы (Рис. 2-9). При этом доли клеток с агрегатами существенно отличались (Рис. 2-10). В присутствии мутаций *sup35-10* и *sup35-228* количество клеток с агрегатами было существенно ниже, аллель *sup35-25* при этом не имела никакого эффекта. Эти данные на первый взгляд плохо согласуются с эффективностью образования [*PSI*⁺] (Рис. 2-8). Возможно, что исследуемые мутации также нарушают взаимодействие *Sup35* с другими белками дрожжей, что находит отражение в частотах появления клеток с прионом. Другим объяснением может быть то, что часть клеток с нонсенс-супрессорным фенотипом (Рис. 2-8) может не нести приона. Свидетельство в пользу второго предположения описано далее.

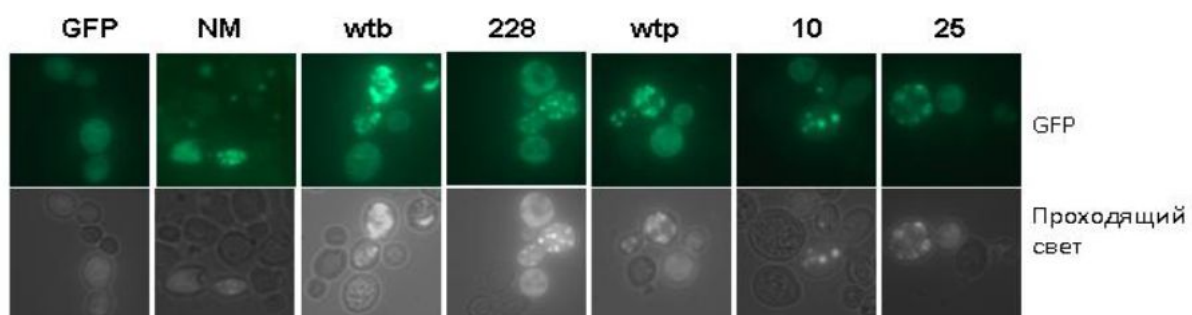


Рисунок 2-9. Агрегаты *Sup35-GFP*, а также белков с заменами, не отличаются по своей морфологии. Представлены микрофотографии клеток в проходящем свете, а также флуоресцентный сигнал GFP в них.

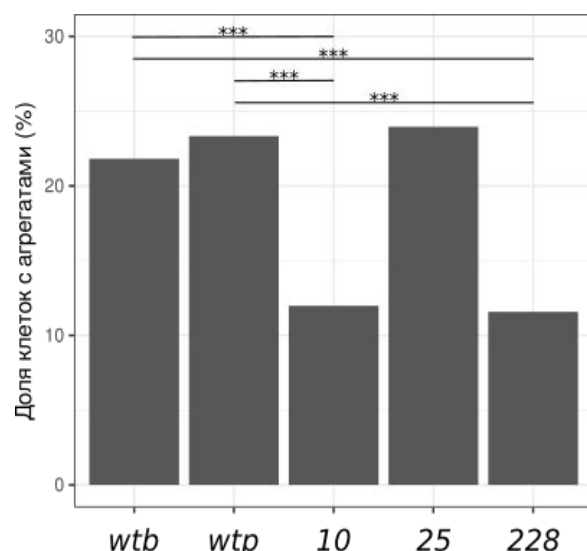


Рисунок 2-10. Доля клеток с агрегатами при сверхпродукции Sup35 с миссенс-мутациями. Статистическую обработку данных проводили с помощью критерия Хи-квадрат с поправкой на множественные сравнения (метод Холма).

Мы также проверили наличие белковых агрегатов Sup35-GFP в полученных трансформантах с помощью SDD-AGE (Рис. 2-11). Для этого из клеток, собранных после индукции, выделили белки с помощью стеклянных шариков, провели электрофорез белков в агарозном геле, затем капиллярный перенос белков на PVDF мембрану и гибридизацию. В результате получили, что большая часть белка находится в области мономеров, и только небольшая часть находится в олигомерной форме (Рис.2-11).

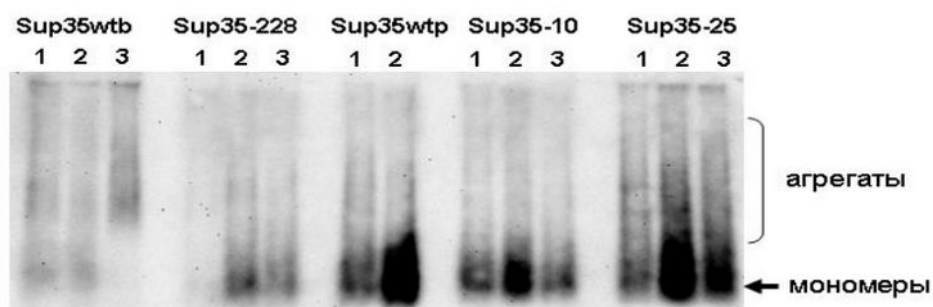


Рисунок 2-11. Соотношение агрегаты-мономеры в тотальных лизатах культур после экспрессии различных аллелей SUP35 смещено в сторону мономеров. Дорожки соответствуют лизатам, полученным из независимых трансформантов. Для вестерн-блот гибридизации были использованы антитела к Sup35 (SE4290).

Для дальнейшей проверки были отобраны отличающиеся по фенотипу [PSI^+] клоны, полученные в результате сверхэкспрессии различных аллелей SUP35 (Рис. 2-12А). Для клеток со сверхэкспрессией SUP35(wtb) отобрали три клон - два секторных и один розовый, для SUP35(wtp) пять клонов – один белый, два секторных и два розовых, для sup35-228 три – два розовых и секторный, sup35-10 четыре клон – один белый, два секторных и один розовый, sup35-25 пять клонов – один белый, два секторных и два розовых. Из трех белых клонов только один, полученный у трансформанта sup35-10, сохранял стабильный фенотип на ¼ YEPD. Из семи розовых клонов фенотип сохранили четыре - по одному для всех трансформантов кроме SUP35wtp.

Важно отметить, что все большинство отобранных клонов показали нестабильный фенотип. Для всех вариантов был проведен анализ агрегатов с помощью метода SDD-AGE. И далеко не во всех случаях мы смогли подтвердить наличие детергент-устойчивых агрегатов Sup35 (Рис. 2-12Б). Эти результаты согласуются с данными, полученными ранее. В клетках

со сверхпродукцией Sup35, либо его вариантов с заменами, мы также не наблюдали большого числа агрегатов (Рис. 2-11). Судя по всему, полноразмерные Sup35 агрегируют очень слабо, что затрудняет формирование $[PSI^+]$. При этом часть отобранных клонов с нонсенс-супрессорным фенотипом, вероятно, не несет приона, а сам фенотип обусловлен иными механизмами. В 2022 году мы планируем частично повторить эти эксперименты, чтобы точно оценить долю клеток с прионом и отобрать стабильные $[PSI^+]$ штаммы, необходимые для последующих экспериментов. Это также позволит сделать строгие выводы относительно эффектов миссенс-мутаций в С-домеине Sup35 на формирование приона $[PSI^+]$.

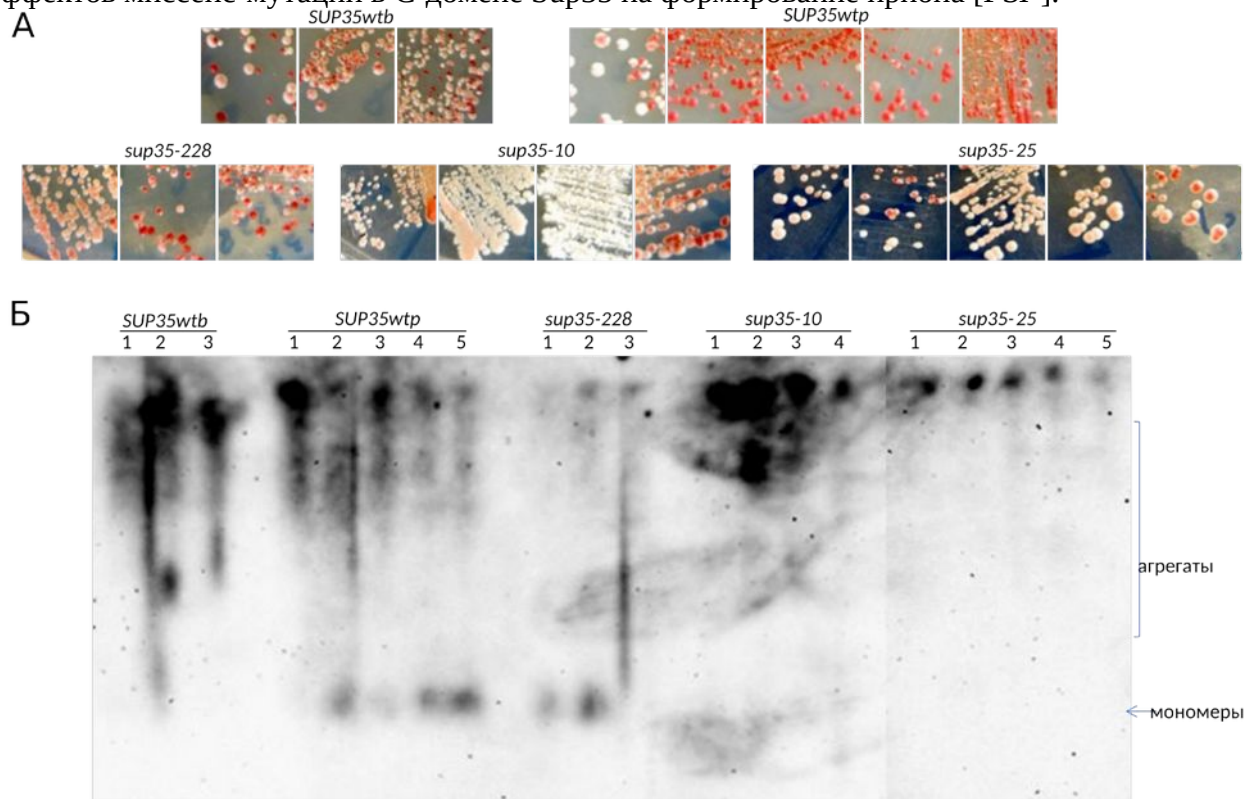


Рисунок 2.12. Анализ $[PSI^+]$ клонов, полученных при сверхэкспрессии разных аллелей *SUP35*. (А) Рост клонов на 1/4 YEPD. (Б) Результат SDD-AGE. Номера над дорожками соответствуют порядковым номерам клонов на панели А. Антитела к Sup35 (SE4290) были использованы для вестерн-блот гибридизации.

Для анализа полученных вариантов $[PSI^+]$ с помощью белковой трансформации нам необходимо получить стабильные варианты приона после сверхэкспрессии миссенс-мутаций *SUP35*. Поскольку отобранные нами трансформанты в большинстве оказались нестабильны, мы были вынуждены отложить эти эксперименты на 2022 год.

2.2.3. Изучение ГТФазной активности белка Sup35 у миссенс-мутантов по гену *SUP35* на дрожжевых рибосомах (2021-2022)

Миссенс-мутации *sup35* так же, как и нонсенс-мутации, приводят к снижению эффективности терминации, однако не влияют на содержание полноразмерного белка в клетке и не нарушают взаимодействие с Sup45p. Белок Sup35 является ГТФазой, которая обеспечивает процесс терминации трансляции энергией для высвобождения новосинтезированного полипептида фактором eRF1. Поскольку изучаемые замены в аминокислотной последовательности белка Sup35 затрагивают область сайтов связывания ГТФ в С-домеине, то в качестве механизма снижения точности терминации трансляции, мы предположили снижение эффективности реакции гидролиза ГТФ. Для проверки гипотезы требовалось сравнить ГТФазную активность белков с заменами *sup35-10*, *sup35-25*, *sup35-*

228 с ГТФазной активностью белка Sup35 дикого типа. Измерение ГТФазной активности изучаемых белков планировали проводить с использованием системы Malachite Green Phosphate Assay Kit (Sigma-Aldrich MAK307).

Для проведения ГТФазной реакции в первую очередь требуется получить очищенные дрожжевые рибосомы и белковые факторы eRF1 и eRF3, которые осуществляют ключевые процессы терминации трансляции.

Выделение рибосом из дрожжей первоначально проводили по протоколу выделения рибосом человека (Alkalaeva et al., 2006 PMID: 16777602), который адаптировали в процессе работы. Подробный протокол был любезно предоставлен Е.З. Алкалаевой.

Первоначально выделение и очистку рибосом дрожжей проводили, получая отдельно субчастицы 60S и 40S. Затем мы пришли к практике очистки субчастиц совместно в виде комплекса 80S. Тем не менее по оценке при дальнейшей работе первый способ кажется более эффективным. Клетки штамма BY4749 *S. cerevisiae* растили до оптической плотности OD600 ~ 1 при длине волны 600 нм. Затем клетки осаждали центрифугированием в течение 5 мин, на скорости 3000 g, взвешивали и ресуспендировали в буфере, содержащем 1M сорбитол, 2 mM ЭДТА, 14 mM β-меркаптоэтанол, из расчета 10 мл буфера на 1 г клеток. Суспензию клеток инкубировали 30 мин при комнатной температуре с постоянным перемешиванием. Далее клетки осаждали центрифугированием (5 мин, 2300 g), ресуспендировали в 10 мл 1M сорбитола, добавляли литиказу (Sigma) до конечной концентрации 50 ед.акт./мл и инкубировали в течение 25 минут при температуре 30 °С с постоянным перемешиванием. Сферопласты клеток дрожжей осаждали центрифугированием (5 мин, 2300 g) и растворяли в 2 мл охлажденного буфера, содержащего 30 mM HEPES-КОН (pH = 7.4), 100 mM КОАс, 2 mM Mg(OAc)₂, 2 mM DTT. Гомогенизировали сферопласты дрожжей на приборе MPBiomed The FastPrep 24. Полученный лизат клеток центрифугировали (15 мин, 20000 g, 3°C) и отбирали супернатант, не затрагивая верхний липидный слой. Затем измеряли оптическую плотность полученного экстракта при длине волны 260 нм на спектрофотомете SmartSpec™ Plus (Bio-Rad) (Altmann and Trachsel, 2002). К полученному безмитохондриальному лизату добавляли Refabloc SC (AEBSF) «Roche» из расчёта 0.3 мг/мл и центрифугировали со скоростью 55000 об/мин в течение 4 часов на ультрацентрифуге Beckman Optima TLX. Осадок ресуспендировали в буфере I (Tris-HCl 30 mM, KCl 50 mM, MgCl₂ 6 mM, DTT 2 mM, Sucrose 0,25M) и растворяли на мешалке во льду до оптической плотности 150 ОЕ/мл. Добавляли по каплям 4 M KCl (до 0,6 M) и перемешивали в течение ночи на мешалке во льду. Далее осаждали рибосомы центрифугированием на скорости 84000g, 6 часов на ультрацентрифуге BC Optima MAX-XP на роторе MLS-50. Супернатант, содержащий факторы трансляции, удаляли.

Осадок рибосом после отмывки факторов растворяли стеклянной палочкой в буфере RS (Tris-HCl 20 mM, KCl 50 mM, MgCl₂ 4 mM, DTT 2 mM). Далее центрифугировали 10 мин, на скорости 15000 g. Изменяли оптическую плотность при длине волны 260 нм и растворяли до оптической плотности 125 ОЕ/мл. Добавляли 1 mM пурамицин, инкубировали 10 мин во льду и 10 мин при 37 °С. Затем добавляли 4 M KCl (до 0,6 M) и наносили на линейный градиент сахарозы 10%-30% (объемом 5 мл) в буфере (Tris-HCl 20 mM, MgCl₂ 4 mM, KCl 500 mM, DTT 2 mM). Далее откручивали на ультрацентрифуге BC Optima MAX-XP на роторе MLS-50 со скоростью 86000g в течение 6 часов. Фракционировали градиент по 0,15 мл и оценивали содержание рРНК во фракциях.

У собранных в процессе очистки рибосомных субчастиц фракций измеряли количество содержащейся в них рРНК при длине волны 260 нм. 10 мкл фракции разводили в 70 мкл 10% сахарозы в градиентном буфере. Во фракциях содержится высокая концентрация сахарозы, поэтому их обязательно нужно разводить при измерении. Полученные значения использовали для построения кривой (Рис.2-13 верхняя панель). Этот график позволяет оценить распределение выделенных рибосомных субчастиц по градиенту сахарозы и выбрать наиболее насыщенные фракции. Также определили распределение непосредственно субчастиц 40S и 60S, а также их производных (Рис.2-13, нижняя панель).

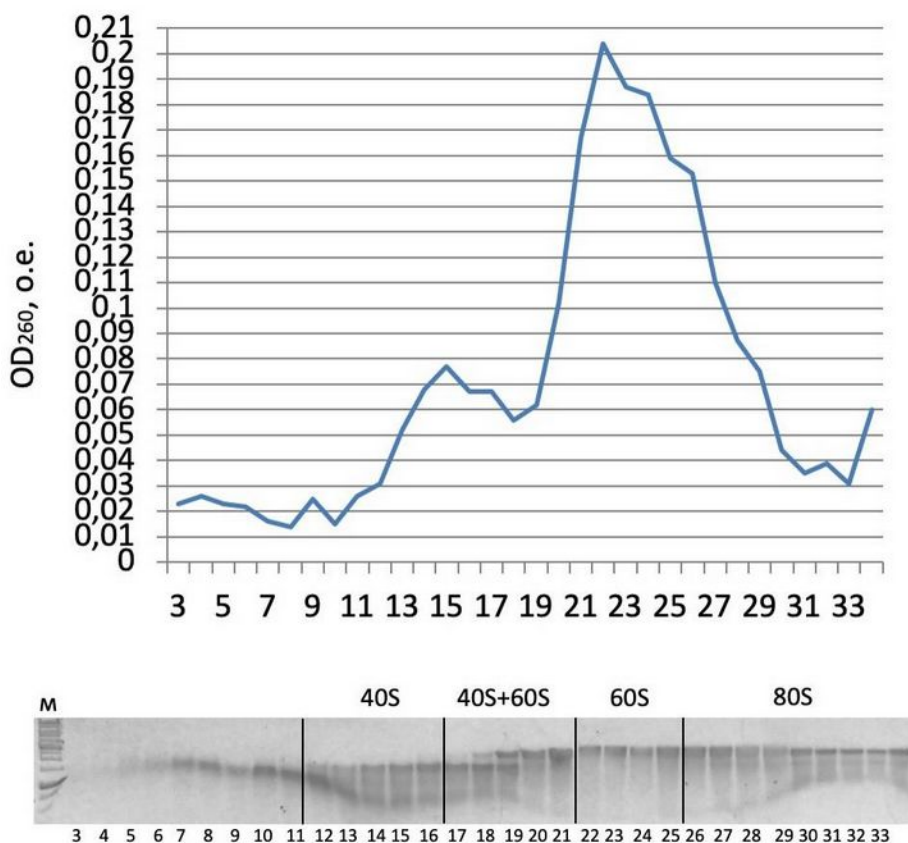


Рисунок 2-13. Выделение 40S и 60S субъединиц рибосом из клеток дрожжей. На верхней панели представлена кривая распределения рРНК в градиенте сахарозы. Цифры внизу обозначают номер отобранной фракции, подписи слева – значения плотности фракций, измеренных при длине волны 260 нм. На нижней панели продемонстрирован пример 1% агарозного электрофореза рРНК тех же фракций (указаны внизу панели). Вверху подписаны обозначения рибосомных субчастиц на основании размера рРНК – именно так они были распределены в градиенте сахарозы. М – 1 kb маркер.

Далее отбирали фракции, в которых содержатся только субчастицы 40S или 60S. На Рис.2-13 (нижняя панель) это фракции 12-16 и 22-25, соответственно. С выбранными фракциями работали либо по отдельности, либо сразу объединяли в одном растворе. Для дальнейшей работы требовалось сконцентрировать рибосомные субчастицы до рабочей концентрации примерно 5 пмоль/мкл. Собранные фракции разводили в 1 V буфера RSII (20 mM Tris-HCl pH 7,5; 2,5 mM MgCl₂; 2 mM DTT; 0,1 mM ЭДТА-КОН pH 8,0; 50 mM KCl; 0,25 M сахарозы) и концентрировали на центриконах с диаметром пор 100 кДа Amicon Ultra-15, 100K (по 5000 g, 20 мин и более, 4 °C) до 1 мл. Промывали 3 раза 1 V буфера RSII и концентрировали в центриконах Amicon Ultra-0,5, 100K до 100 мкл. У полученных готовых растворов рибосомных субчастиц измеряли плотность при длине волны 260 нм и получали значение в оптических единицах. Для рибосом человека 1 OE 80S = 20 пмоль/мкл, 1 OE 40S = 65 пмоль/мкл и 1 OE 60S – 29 пмоль/мкл. Мы использовали эти значения для оценки концентрации дрожжевых рибосом. Рибосомы расфасовали по 5 мкл, замораживали в жидком азоте и хранили при температуре -80 °C.

На следующем этапе мы нарабатывали рекомбинантные белки Sup35 и Sup45 в нативных условиях. Сверхэкспрессия полноразмерного белка Sup35 может приводить к образованию агрегатов за счет прионогенного N-домена, поэтому для исключения этого фактора мы получали С-концевые участки, которые являются необходимыми и достаточными для осуществления процесса терминации трансляции. Для этой цели требовалось получить экспрессионные конструкции, кодирующие С-домены белка Sup35 дикого типа и вариантов с аминокислотными заменами.

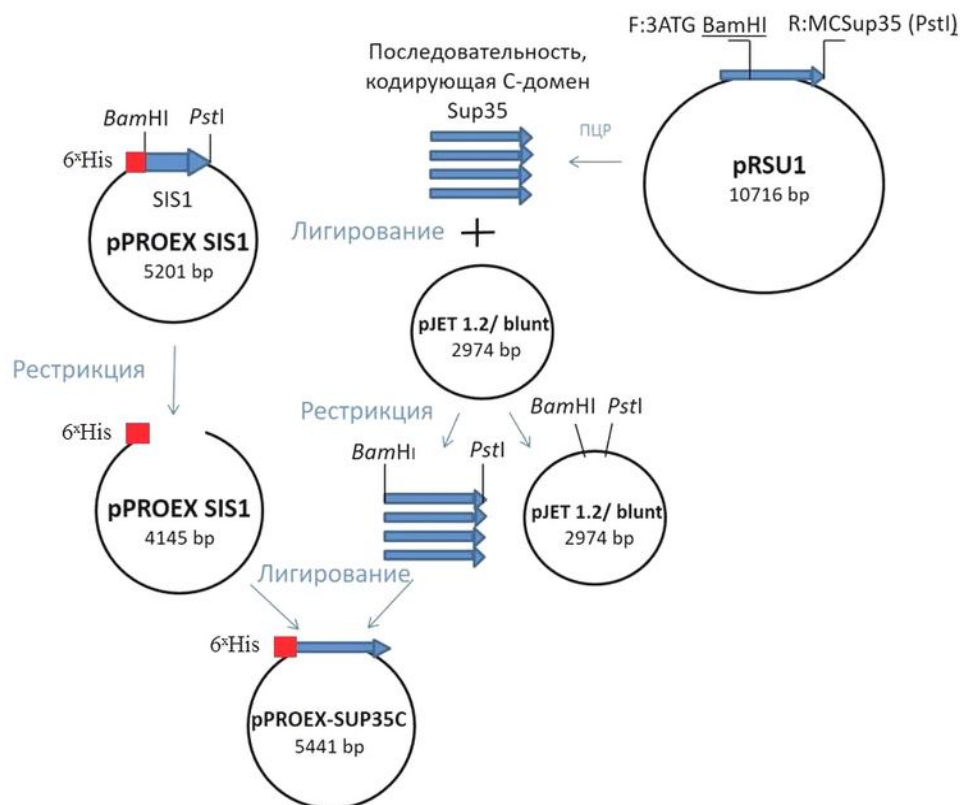


Рисунок 2-14. Схема конструирования серии плазмид pPROEX для наработки рекомбинантных белков Sup35C дрожжей *S. cerevisiae*. Ломаными линиями обозначены праймеры с сайтами рестрикции; вертикальными линиями – сайты рестрикции.

Для амплификации участков, кодирующих Sup35C, использовали серию плазмид pRSU1, несущих полноразмерные аллели *SUP35* или мутантные аллели *sup35-10*, *sup35-25*, *sup35-228*. Праймеры: 3ATGBamHIF (GAGGATCCATGTTTGGTGGTAAAGATCA) и MCSUP35R (AAACTGCAGTTACTCGGCAATTTTAAC). Для переклонирования аллелей *SUP35C* в вектор pPROEX, с которого проводили экспрессию целевого белка, использовали коммерческий набор CloneJET PCR Cloning Kit (Thermo Scientific). Исходно вектор pPROEX содержал последовательность гена *SIS1* и 6 гистидиновых кодонов в начале рамки считывания (Рис.2-14).

Готовые плазмиды pPROEX-SUP35C, pPROEX-SUP35-10C, pPROEX-SUP35-25C и pPROEX-SUP35-228C проверили секвенированием, которое осуществляли в ресурсном центре «Развитие молекулярных и клеточных технологий» СПбГУ. По результатам секвенирования плазмиды, несущие мутантные аллели *sup35-10C*, *sup35-25C* и *sup35-228C*, содержали последовательности с соответствующими заменами 1087 (GAT→ATT), 1133 (ACC→ATC) и 1115 (AGA→ATC). В последовательности, кодирующей Sup35C, замен не обнаружили.

Для наработки рекомбинантного полноразмерного белка Sup45 использовали вектор pET21b/Sup45 (Cosson et al., 2002).

Эффективная наработка рекомбинантных белков требует аккуратного подбора бактериального штамма, в котором будет осуществляться индукция экспрессии белка интереса, а также условия для его роста (температура, состав питательной среды, продолжительность инкубации и т.д.). Мы выбрали штаммы *E.coli* BL21(DE3), BL21(DE3)plyS, T7, Rossetta(DE3) и C41(DE3), у которых оценивали эффективность синтеза белков Sup45 и Sup35C с помощью аналитической индукции. Для этого сначала получали бактериальные трансформанты указанных штаммов методом с использованием CaCl₂. Одну свежую бактериальную колонию засеивали в 100 мл жидкой среды LB в колбу объемом 1 л. Выращивали культуру приблизительно 3 ч при температуре 37 °C при интенсивной аэрации 250–300 об./мин. Охлаждали культуру во льду и осаждали клетки в стерильных пробирках

объемом 50 мл центрифугированием при скорости 4000 об./мин при 4 °С в течение 10 мин. Сливали супернатант, ресуспендировали осадок клеток в 10 мл водного раствора 0,1 М CaCl₂ и инкубировали суспензию во льду 30 мин. Осаждали клетки при тех же условиях и сливали супернатант. Ресуспендировали клетки в 2 мл водного раствора 0,1 М CaCl₂. Распределяли суспензии по необходимому количеству микропробирок из расчёта 200 мкл на одну трансформацию, добавляли плазмидную ДНК (не более 10 мкл водного раствора), перемешивали и оставляли во льду на 30 мин. Затем микропробирки с трансформационной смесью инкубировали в водяной бане при температуре 42 °С в течение 90 с. После чего охлаждали во льду и добавляли к суспензии 800 мкл жидкой среды LB. Инкубировали при перемешивании при температуре 37 °С в течение 45–60 мин. Осаждали клетки центрифугированием при скорости 5000 об./мин в течение 5 мин. Сливали около 900 мкл супернатанта, ресуспендировали клетки в оставшемся объеме и высевали их на чашки с твердой селективной средой LВа.

Для проведения аналитической индукции, при которой подбирали оптимальные условия эксперимента и оценивали эффективность штаммов-продуцентов. Выросших трансформантов *E. coli*, несущих плазмиду с геном белка интереса под контролем lac-оперона, засеивали в жидкую среду LВа и растили ночь. Ночные культуры на следующий день при необходимости разбавляли свежей средой LВа и растили до экспоненциальной фазы роста, достигаемой при OD₆₀₀ = 0,6–0,8. Перед началом эксперимента отбирали контрольную пробу без индуктора объемом до 500 мкл. Добавляли в культуры раствор индуктора IPTG до конечной концентрации 1 mM. Далее каждый час отбирали пробы объемом до 500 мкл для последующего анализа количества белка интереса при помощи белкового фореа SDS-PAGE. Полученные полиакриламидные гели окрашивали раствором Кумасси (10% EtOH, 5% CH₃COOH, Кумасси 0,25%) для визуализации белковых полос (Рис.2-15).

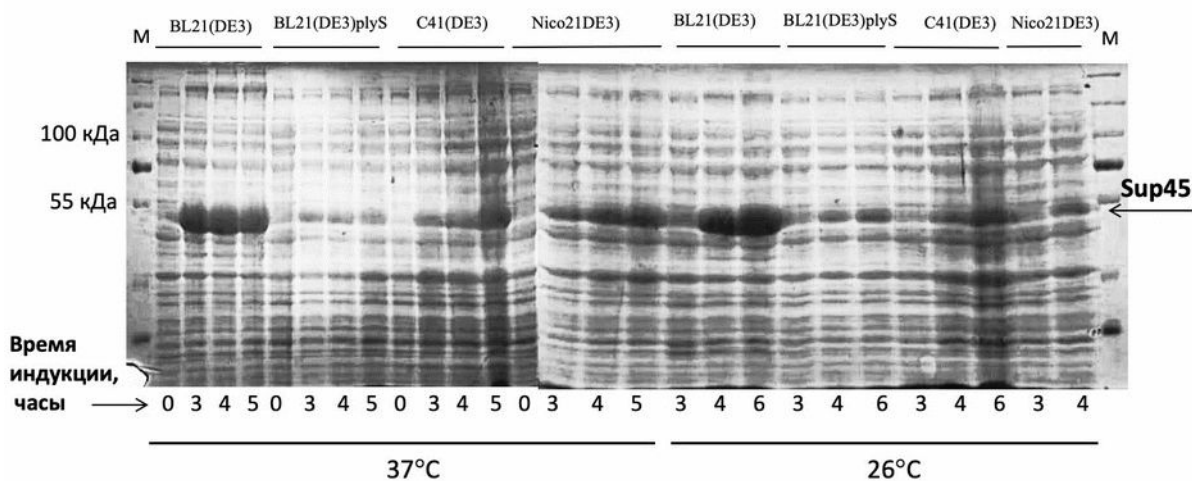


Рисунок 2-15. Подбор штамма *E. coli* и условий индукции для эффективной сверхпродукции рекомбинантного белка Sup45. Представлены фотографии полиакриламидных гелей после белкового фореа SDS-PAGE, покрашенных раствором Кумасси. Сверху указаны использованные штаммы *E. coli*, М – маркер молекулярного веса PAGE Ruler Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher) (от 10 до 250 кДа). Внизу указана продолжительность индукции и температура, при которой росли штаммы.

В результате аналитической индукции мы выявили штаммы, которые демонстрировали как сильную индукцию, так и умеренную. Мы также проверили, в какой форме находится рекомбинантный белок в бактериальных клетках, так как некоторые белки могут попадать в тельца включения и таким образом оказываться в нерастворимой фракции. Для этого отбирали пробы культуры по 500 мкл раз в час на протяжении всего выбранного срока индукции. Осаждали клетки и смешивали с 50 мкл буфера В0 (25 mM Tris HCl, pH 7,5, 200 mM KCl, 10 mM BME, 0,4% Triton X). Полученную суспензию озвучивали при помощи ультразвукового дезинтегратора Bandelin Sonopuls HD 2070/220 при 50% мощности 40 с и центрифугировали 1 мин при 13000 g. Отделяли супернатант и осадок, смешивали с буфером

для нанесения на SDS-PAGE и инкубировали пробы при 100 °С 5 мин. Полученные пробы снова центрифугировали 1 мин при 13000 g и использовали для проведения белкового фореа SDS-PAGE (Рис. 2-16).

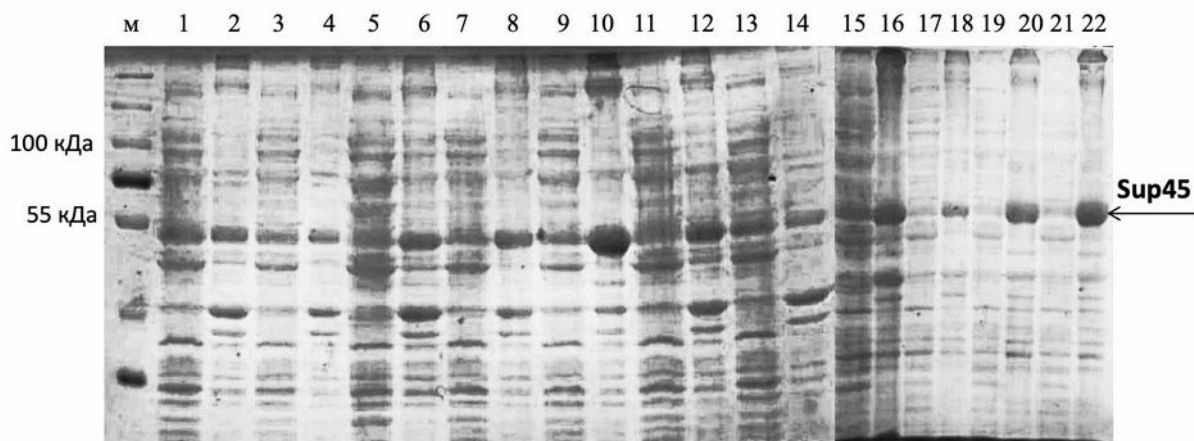


Рисунок 2-16. Проверка наличия растворимой формы Sup45 в лизате *E. coli*. Представлены фотографии полиакриламидных гелей после белкового фореа SDS-PAGE, покрашенных раствором Кумасси. М – маркер молекулярного веса PAGE Ruler Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher) (от 10 до 250 кДа), **1** – лизат Nico21, 26 °С, 6 ч; **2** – осадок Nico21, 26 °С, 6 ч; **3** – лизат BL21plys, 26 °С, 6 ч; **4** – осадок BL21plys, 26 °С, 6 ч; **5** – лизат C41, 37 °С, 3 ч; **6** – осадок C41, 37 °С, 3 ч; **7** – лизат Nico21, 37 °С, 3 ч; **8** – осадок Nico21, 37 °С, 3 ч; **9** – лизат BL21, 37 °С, 3 ч; **10** – осадок BL21, 37 °С, 3 ч; **11** – лизат Nico21, 37 °С, 5 ч; **12** – осадок Nico21, 37 °С, 5 ч; **13** – лизат Nico21, 26 °С, 4 ч; **14** – осадок Nico21, 26 °С, 4 ч; **15** – лизат C41, 37 °С, 5 ч; **16** – осадок C41, 37 °С, 5 ч; **17** – лизат BL21plys, 37 °С, 3 ч; **18** – осадок BL21plys, 37 °С, 3 ч; **19** – лизат BL21, 26 °С, 4 ч; **20** – осадок BL21, 26 °С, 4 часа; **21** – лизат BL21, 26 °С, 6 ч; **22** – осадок BL21, 26 °С, 6 ч; слева от снимка выборочно указаны размеры фрагментов маркера.

Штаммы, у которых наблюдалась сильная сверхпродукция белка Sup45, характеризовались наличием большей части наработанного белка в нерастворимой фракции. В связи с этим мы выбрали штамм, который демонстрировал умеренную наработку белка – BL21(DE3)plyS. Для него мы далее подбирали наиболее оптимальные условия индукции всех используемых конструкций.

В результате мы подобрали следующие условия для препаративной индукции: клетки бактерий *E. coli* BL21(DE3)plyS, несущих плазмиду с геном белков под контролем lac-оперона, засеивали 10 мл жидкой среды LBa в кровяные банки и растили ночь при температуре 37 °С. На следующий день культуры разводили до 100 мл свежей средой LBa, переносили в колбы 0,5 л и растили 2-4 часа до достижения оптической плотности $OD_{600} = 0,6-0,8$. Затем колбы с культурами охлаждали до 4 °С порядка 1 ч. Добавляли IPTG до конечной концентрации 1 mM и растили 18 часов при 18 °С. Индукцию проверили, проведя с отобранными пробами с каждого этапа белковый фореа SDS-PAGE (Рис. 2-17). Индукция проходила эффективно, при этом белок находился в основном в растворимой фракции (данные не представлены).

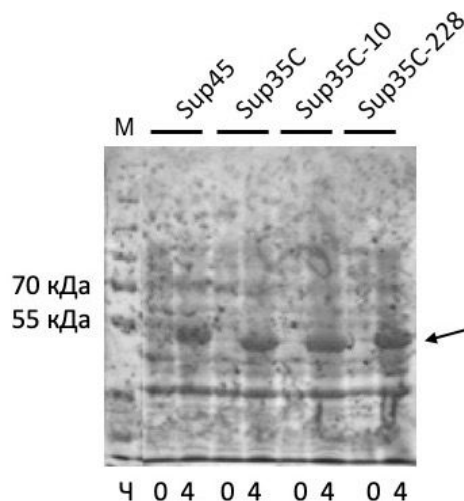


Рисунок 2-17. Препаративная наработка рекомбинантных белков Sup45 и Sup35C в бактериях *E.coli* BL21(DE3)plyS. Представлены фотографии полиакриламидных гелей после белкового электрофореза SDS-PAGE, покрашенных раствором Кумасси. Сверху указаны нарабатываемые рекомбинантные белки, Sup35-25 здесь не представлен. М – маркер молекулярного веса PAGE Ruler Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher) (от 10 до 250 кДа), слева от снимка выборочно указаны размеры фрагментов маркера. Внизу указана продолжительность индукции. Стрелка справа указывает на полосы наработанного белка Sup45 и Sup35C.

Далее с бактериальными культурами работали на льду. Клетки осаждали центрифугированием 5 мин 5 000 об./мин при 4 °С. Их использовали для очистки рекомбинантного белка или замораживали и хранили при температуре –80 °С.

При подборе условий для очистки белков Sup45 и Sup35C в нативных условиях мы ориентировались на литературные данные (Frolova et al., 2000), а также протоколы, которые любезно предоставила Е.З. Алкалаева.

Наработанные на предыдущем этапе клетки бактерий *E.coli* BL21(DE3)plyS при необходимости размораживали во льду и тщательно ресуспендировали с буфером IMAC (20 mM Tris HCl, pH 7,6, 0,2 mM NaCl, 6 mM β-меркаптоэтанол, 0,1% Triton X100, 5% глицерин, 5 mM имидазол) в соотношении 1 г клеточной массы к 10 мл буфера. К клеточной суспензии добавляли коктейль ингибиторов протеаз Sigma (2–4 мкл на 1 мл суспензии) и фермент лизоцим до конечной концентрации 1 мг/мл, ресуспендировали смесь и инкубировали во льду 30 мин на качалке, чтобы суспензия аккуратно перемешивалась. Далее разрушали клетки при помощи ультразвукового дезинтегратора Bandelin Sonopuls HD 2070/2200 при >50% мощности прибора. Озвучивание проводили в течение 2 мин, затем давали охладиться суспензии во льду. Количество циклов (в среднем около 5) подбиралось таким образом, чтобы на выходе получался гомогенный жидкий лизат без комочков клеток и нуклеиновых кислот. Лизат раскапывали в микропробирки по 2 мл и центрифугировали 15 мин 15000 об./мин при 4 °С. Отбирали в отдельную пробирку супернатант и использовали его для очистки из него рекомбинантного белка.

Очистку белков осуществляли с использованием жидкостной хроматографической системы NGC среднего давления (Bio-Rad) в два этапа. На первом этапе проводили афинную хроматографию на колонке HisTrap HP 5 мл (GE Healthcare). Белок наносили в буфере IMAC и элюировали в градиенте имидазола от 50 до 300 mM. Фракции проверяли на наличие белка интереса при помощи фореа SDS-PAGE (Рис. 2-18).

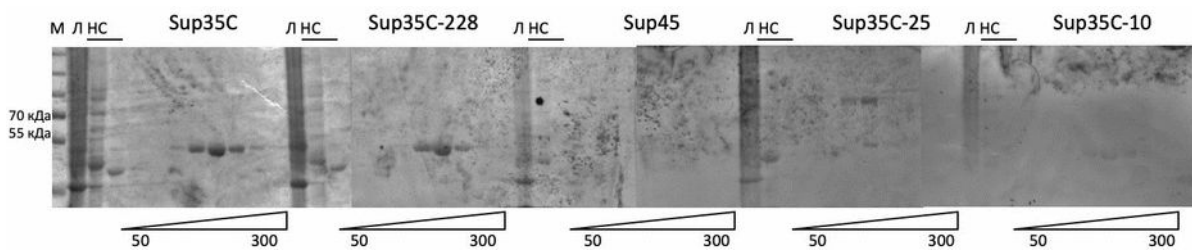


Рисунок 2-18. Пример очистки рекомбинатных белков Sup45 и Sup35C в нативных условиях методом афинной хроматографии. Представлены фотографии полиакриламидных гелей после белкового фореза SDS-PAGE, покрашенных раствором Кумасси. На гель были нанесены пробы, собранные в результате очистки фракций. М – маркер молекулярного веса PAGE Ruler Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher) (от 10 до 250 кДа), слева от снимка выборочно указаны размеры фрагментов маркера. Л – исходный лизат клеток *E. coli*, НС – промывочные фракции с не связавшимся с колонкой белком. Вверху указаны нарабатываемые рекомбинатные белки. Внизу – концентрация имидазола во фракциях от 50 до 300 мМ.

Элюированные фракции, в которых присутствовал белок интереса, объединяли и диализовали ночь при 4°C против буфера А100 для подготовки к ионнообменной хроматографии.

Далее белок очищали на колонке HiTrap Q HP 5 мл (GE Healthcare), проводя элюирование градиентом 100-500 мМ КСl в буфере А100. Собранные фракции также проверяли на белковом форезе SDS-PAGE, ориентируясь по хроматограмме, поскольку полосы белка на форезе могли плохо детектироваться. Фракции, содержащие белок интереса, объединяли и концентрировали их на центриконах Amicon Ultra-0,5, 100K до объема в среднем 100 мкл, а также промывали буфером А100, чтобы убрать излишек соли. Концентрацию белка измеряли с использованием спектрометра SmartSpec Plus Spectrophotometer (Bio Rad) при длинах волн 280, 260 и 320 нм (последняя нужна для корректировки: полученное значение плотности вычитается из значения, полученного при 280 нм) и доводили ее до порядка 5 пмоль/мкл. Для расчетов ориентировались на рассчитанные соотношения: при длине волны 280 нм 1 ОЕ Sup45-6His = 1,14 мкг/мкл, 1 мкг = 12,948 пмоль; 1 ОЕ Sup35C-6His = 1,15 мкг/мкл, 1 мкг = 20,467 пмоль. Таким образом подготавливали пробы белка для проведения ГТФазной реакции.

Очищенные белки дикого типа (Sup45, Sup35), а также мутантные белки будут в 2022 г использованы для измерения ГТФазной активности С-доменов Sup35 дикого типа и мутантных вариантов.

3. Характеристика генов, влияющих на терминацию трансляции. Продолжение изучения эффектов генов *GIC*, *MCM1*, *SFP1* и *TEF*, различными способами влияющих на терминацию трансляции.

3.1. Влияние генов *GIC1* и *GIC2* на процесс терминации трансляции.

Исследования, проведенные ранее в нашей лаборатории, показали, что сверхэкспрессия гена *GIC2* снижает частоту потери плазмиды с геном *SUP45* на фоне аллели *sup45-105* (Мурина О. А., неопубл). Изучение гена *GIC1*, паралога *GIC2*, тесно связано с изучением гена *GIC2*, так же взаимодействующим с активированной ГТФ-связанной формой белка Cdc42 *in vivo* (Brown et al., 1997), что позволяет предположить, что делеция данного гена может влиять на жизнеспособность клетки. Ранее в проведенных исследованиях было показано, что сверхэкспрессия гена *GIC1*, как и *GIC2*, так же приводит к снижению частоты потери плазмиды pRS316-SUP45 на фоне мутантной копии *sup45-105*. Изменение частоты потери центромерных плазмид также было обнаружено на фоне делеций гена *GIC1* и *GIC2*. Для этого ранее в лаборатории были получены штаммы с делецией генов *GIC1* и *GIC2*, на основе штаммов U-1A-D1628 и U-14-D1690 (Погоза, неопубл.): U-1A-D1628-g1d (*SUP45 gic1Δ*), U-1A-D1628-g2d (*SUP45 gic2Δ*), U-1A-D1628-g1g2dd (*SUP45 gic1Δgic2Δ*), U-

140D1690-g1d (*SUP35 gic1Δ*), U-140D1690-g2d (*SUP35 gic2Δ*), U-140D1690-g1g2dd (*SUP35 gic1Δgic2Δ*).

Дрожжевые клетки, несущие двойную делецию в генах *GIC1* или *GIC2*, являются температурочувствительными, и нежизнеспособны при температуре 37°C. Поэтому мы оценили частоты потерь центромерной плазмиды с аллелью дикого типа на фоне мутаций *sup45-105* и *sup35-218* в штаммах с различным сочетанием делеций генов *GIC*. Рост трансформантов оценивали при 26°C и 30°C на селективных средах без урацила и лейцина и среде без лейцина с 5FOA. В случае мутации *sup45-105* мы не обнаружили разницы в росте штаммов на среде с 5FOA при различных температурах. Однако, было обнаружено снижение частоты потери плазмиды pRSU2 у мутанта *sup35-218* при 26°C и 30°C (Рис. 3-1).

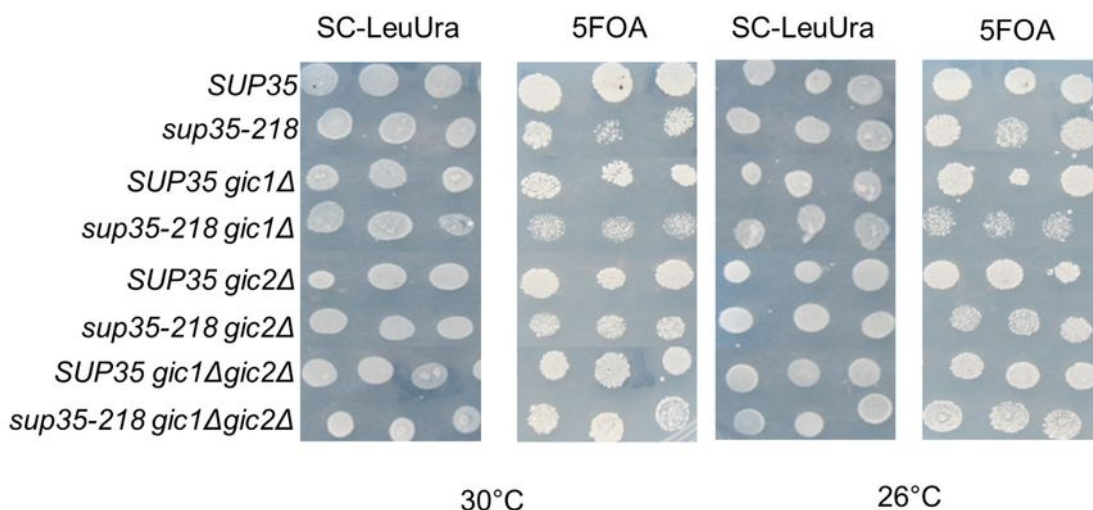
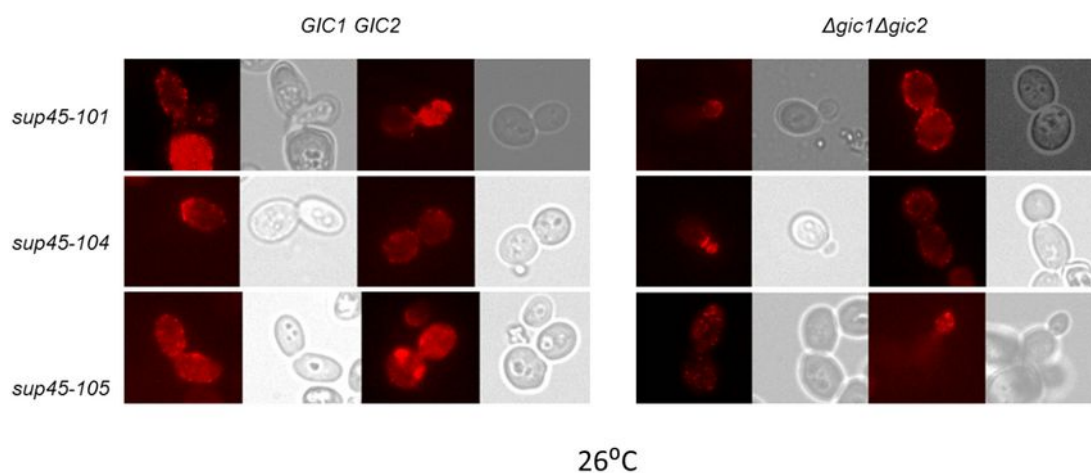


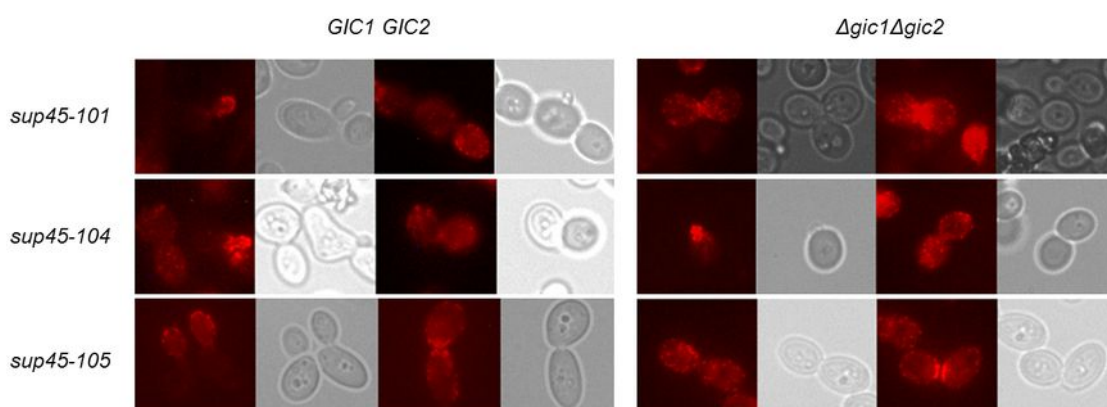
Рисунок 3-1. Снижение частоты потери плазмиды pRSU2 у мутанта *sup35-218* при 26°C и 30°C. Показан рост трансформантов штамма U-14-D1690 и 218U-14-D1690 плазмидами pRSU2/pRSU2-218 на селективных средах без лейцина и урацила (SC-LeuUra) и на среде с 5FOA.

Ранее мы не выявили существенного отличия в росте штаммов, а также распределение актина в штаммах с одиночными или двойной делецией генов *GIC1* и *GIC2* по сравнению со штаммом дикого типа при 26°C или при 30°C. На данном этапе мы проверили распределение актина в штаммах, несущих нонсенс-мутации в гене *SUP45* (*sup45-101*, *sup45-104*, *sup45-105*) на фоне двойной делеции генов *GIC1* и *GIC2* (Рис. 3-2).

Для этого штаммы выращивали в полной среде YEPD до стадии позднего логарифмического роста, разводили в свежей среде и отбирали клетки на стадии среднего логарифмического роста (через 4 часа). Клетки фиксировали в 4% формальдегиде, далее проводили окрашивание родамин фаллоидином для оценки распределения актина. Штаммы, содержащие мутации в гене *SUP45* характеризовались диффузным распределением актина при 26°C или при 30°C. Значительных отличий по этим характеристикам при исследуемых температурах обнаружить не удалось и в случае дополнительных делеций генов *GIC1* и *GIC2*.



26°C



30°C

Рисунок 3-2. Нарушение поляризации актина у штаммов, несущих двойную делецию генов *GIC1* и *GIC2* и нонсенс-мутацию в гене *SUP45*. Для визуализации актина клетки инкубировали с родамин фаллоидином.

На следующем этапе работы было проведено измерение относительного количества копий центромерной плазмиды в исследуемых штаммах с помощью ПЦР-РВ. Результаты представлены на рисунках 3-3 и 3-4. Диаграммы размаха соответствуют полученным данным, верхняя точка показывает максимальное значение, нижняя точка – минимальное, полужирная линия отображает медианный уровень. Оказалось, что делеции генов *GIC1* и *GIC2* не влияют на копийность плазмид, содержащих аллели дикого типа *SUP45* или *SUP35* (небольшая разница в случае лейциновых плазмид, вероятно, связана с разницей в числе плазмид с урациловым и лейциновым маркером, что было показано ранее). Далее мы провели ПЦР-РВ для штаммов с мутантными аллелями изучаемых генов и выяснили, что в случае мутации *sup45-105* делеция генов *GIC1* и *GIC2*, а также двойная делеция приводят к увеличению копий мутантной аллели гена *SUP45*. В случае мутации *sup35-218*, также как и для мутации *sup45-105*, наибольшее увеличение копийности происходит на фоне делеции гена *GIC1*. Делеция гена *GIC2* не влияет на копийность плазмиды, а двойная делеция лишь незначительно увеличивает число копий плазмиды pRSU1-218.

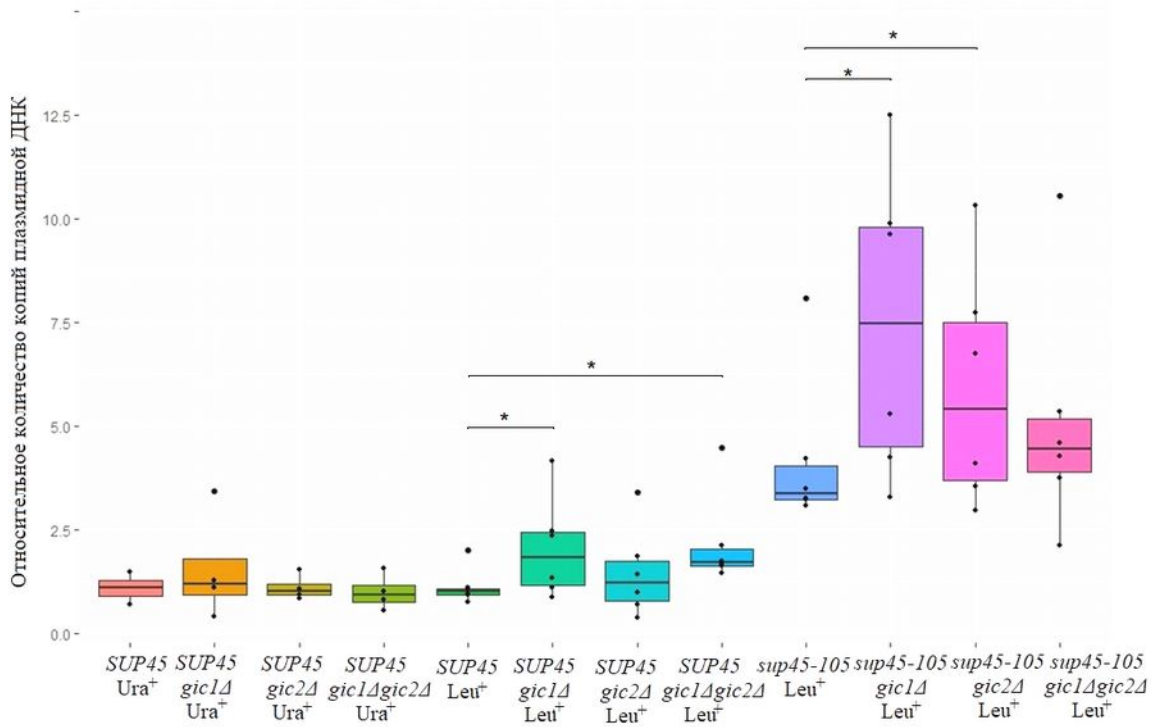


Рисунок 3-3. Результаты ПЦР-РВ с праймерами к гену *bla* для штаммов, несущих мутации *sup45*. За единицу принято число копий центромержной плазмиды в штамме U-1A-D1628 (*SUP45*). *bla* - ген, кодирующий β-лактамазу, расположен на плазмиде. Расшифровка р-критерия: * - $p < 0.05$.

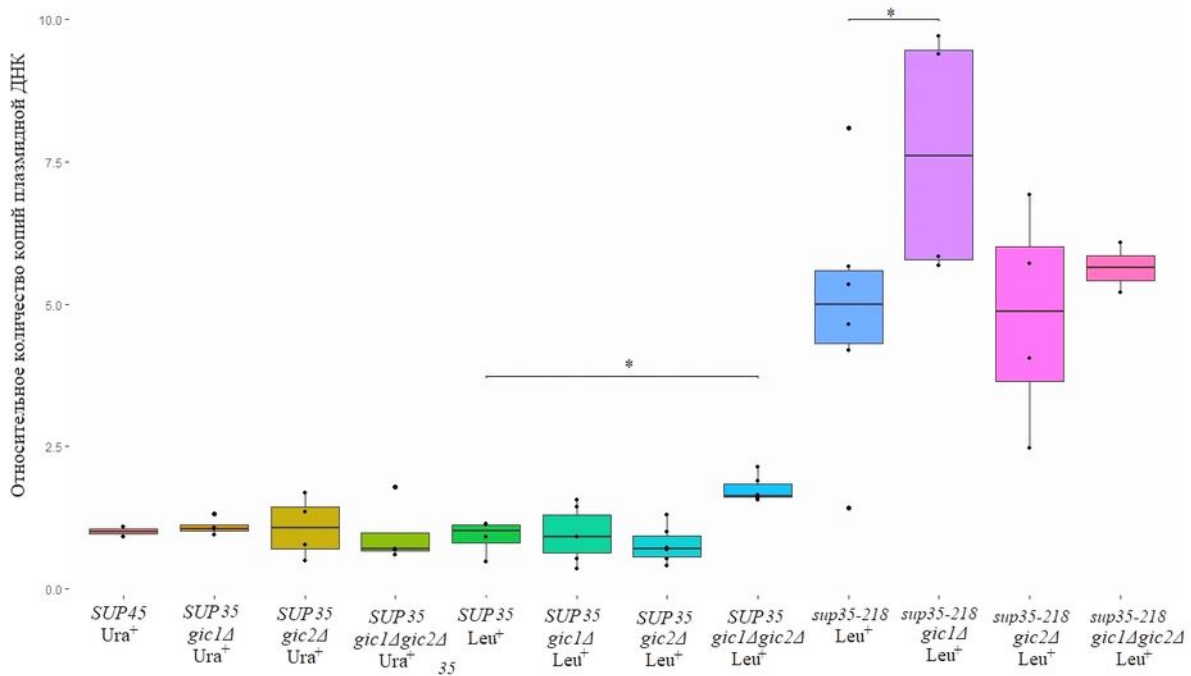


Рисунок 3-4. Результаты ПЦР-РВ с праймерами к гену *bla* для штаммов, несущих мутации *sup35*. За единицу принято число копий центромержной плазмиды в штамме U-14-D1690 (*SUP35*). *bla* - ген, кодирующий β-лактамазу, расположен на плазмиде. Расшифровка р-критерия: * - $p < 0.05$.

На основании всех полученных данных можно сделать вывод, что продукты генов *GIC1* и *GIC2* не оказывают влияния на процесс терминации трансляции у дрожжей.

Наблюдаемые эффекты, связанные с изменением частоты потери центромерной плазмиды, несущей ген дикого типа на фоне мутантных аллелей жизненно-важных генов *SUP45* и *SUP35*, по всей видимости, связаны с изменением числа копий данных плазмид, что, в свою очередь, влияет на частоту их потери. Данные предположения требуют дальнейшего доказательства, поскольку в настоящее время мы имеем лишь данные о влиянии делеций генов *GIC1* и *GIC2* на копийность плазмид, несущих нонсенс-мутации в генах *SUP45* и *SUP35*. Увеличение числа копий мутантных нонсенс-аллелей генов *SUP45* и *SUP35* является адаптивным механизмом выживания дрожжей, причем количество копий должно быть оптимальным в определенных условиях. Изучаемые в работе гены (*UPF1*, *PSH1*, *GIC1*, *GIC2*) могут оказывать влияние на копийность плазмид, что в свою очередь, влияет на жизнеспособность клеток. Данные предположения требуют дополнительного экспериментального подтверждения.

3.2. Завершение работы с транскрипционным регулятором Mcm1.

Ранее мы исследовали влияние потенциальных сайтов связывания Mcm1 в промоторе *SUP35* на нонсенс-супрессию. Чтобы проверить, влияет ли модификация этих сайтов на экспрессию гена *SUP35*, мы оценили уровень продукции белка Sup35 с помощью электрофореза белков и вестерн-блоттинга. В результате нам не удалось обнаружить различий в продукции Sup35 (Рис. 3-5). Однако, мы также проверили влияние модификаций сайта Sfp1 на уровень Sup35 и обнаружили значительное снижение уровня Sup35, при наличии как делеции данного сайта, так и мутации в нём (Рис. 3-5).

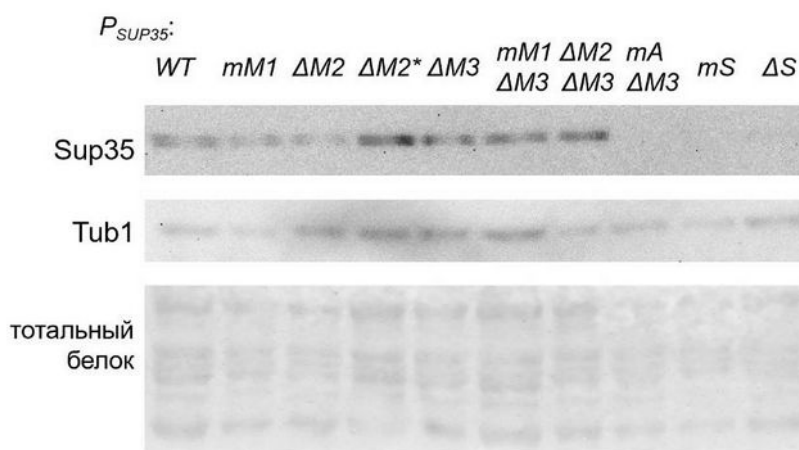


Рисунок 3-5. Результаты анализа уровня белка Sup35 с помощью вестерн-блоттинга. Варианты промоторов обозначены следующим образом: *WT* - дикий тип; *mM1* - *mutMcm1-1*, *ΔM2* - *ΔMcm1-2*, *ΔM2** - *ΔMcm1-2** (отличается от предыдущего дополнительной вставкой 1 нуклеотида в районе делеции), *ΔM3* - *ΔMcm1-3*, *mM1ΔM3* - *mutMcm1-1ΔMcm1-3*, *ΔM2ΔM3* - *ΔMcm1-2ΔMcm1-3*, *mAΔM3* - *mutAbf1ΔMcm1-3*, *mS* -, *mutSfp1*, *ΔS* - *ΔSfp1*.

Ранее мы показали, что в штаммах с модифицированным сайтом связывания Sfp1 не наблюдалось изменения уровня нонсенс-супрессии, что говорит о том, что данного снижения уровня Sup35 недостаточно для проявления нефункциональности аппарата терминации трансляции. Тем не менее, отсутствие сайта связывания Sfp1 может влиять на фенотип штаммов при повышенном уровне Sfp1. Для того чтобы проверить эту гипотезу мы сравнили влияние сверхэкспрессии *SFP1* на жизнеспособность штаммов с различными вариантами промотора *SUP35*. Действительно, в отсутствие сайта связывания Sfp1 или при наличии мутации в нём токсичность от сверхпродукции Sfp1 оказывается значительно слабее (Рис. 3-6А). Мы проверили, происходит ли изменение уровня Sup35 при сверхэкспрессии *SFP1*. В штамме с промотором дикого типа избыток Sfp1 приводил к существенному увеличению уровня Sup35, что соответствует полученным ранее данным (Matveenko et al., 2016). При

модификации сайта связывания Sfp1 такого увеличения уровня Sup35 не наблюдалось, даже несмотря на то, что белка Sup35 детектировалось значительно меньше (Рис. 3-6Б). Таким образом, можно сделать вывод о том, что Sfp1 физически связывается с промотором *SUP35*, способствуя активации его транскрипции. При обычных условиях это несущественно влияет на уровень нонсенс супрессии, хотя и сказывается на общем уровне белка, однако данная активация транскрипции может быть важна при определённых условиях, когда Sfp1 находится в избытке, или уровень других факторов, активирующих транскрипцию *SUP35*, оказывается снижен.

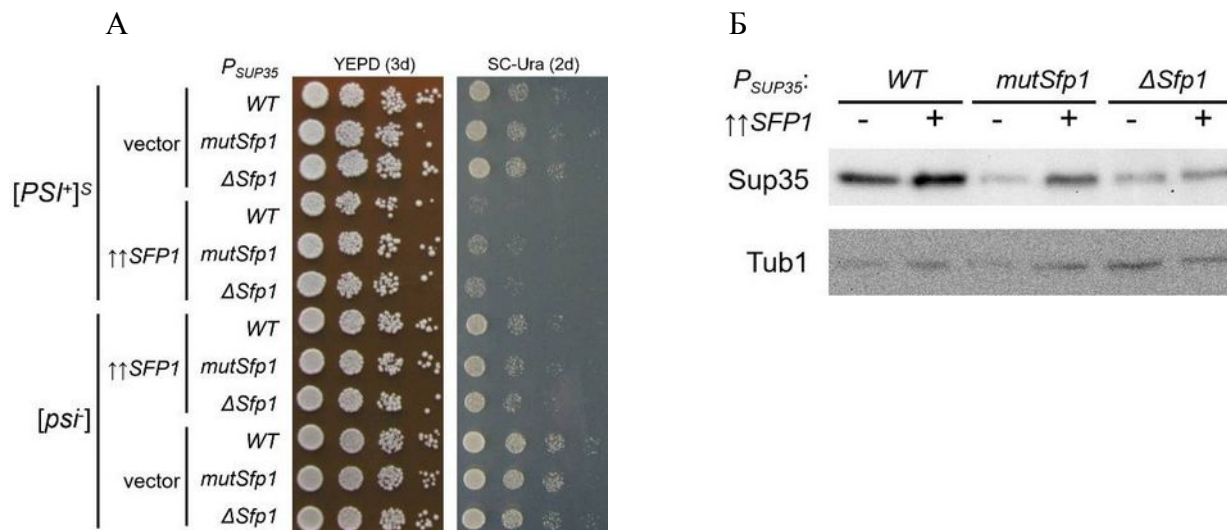


Рисунок 3-6. Влияние избытка Sfp1 на уровень Sup35 зависит от интактного сайта связывания Sfp1 в промоторе *SUP35*. А. Посевы с разведениями Б. Оценка уровней белка Sup35 с помощью вестерн-блоттинга.

Полученные на данный момент результаты свидетельствуют о том, что Mcm1 очень незначительно влияет на экспрессию гена *SUP35*. Небольшое усиление нонсенс-супрессии, которое возникает в штаммах [PSI⁺] при сверхэкспрессии *MCM1* может быть вызвано увеличением транскрипции *SUP35*, о чем свидетельствуют данные ПЦР-РВ. Однако увеличения продукции белка Sup35 мы не наблюдали. Это может быть связано с тем, что небольшое увеличение уровня Sup35 сложно продемонстрировать с помощью вестерн-блоттинга, который является менее точным количественным методом, чем ПЦР-РВ. Другое объяснение может состоять в том, что усиление нонсенс-супрессии происходит по другому, неизвестному механизму, но в таком случае усиление транскрипции *SUP35* вообще не должно влиять на продукцию соответствующего белка.

Поскольку мы наблюдали усиление транскрипции *SUP35* при сверхэкспрессии *MCM1*, мы задались вопросом, связывается ли Mcm1 напрямую с промотором *SUP35* или его действие опосредовано взаимодействием с другими факторами. Мы не обнаружили влияния мутаций и делеций в трёх потенциальных сайтах связывания Mcm1 на фенотип штаммов, как с прионом [PSI⁺], так и без него. Изменения уровня продукции белка Sup35 также не наблюдалось, что говорит о том, что нативный уровень продукции Mcm1 не влияет на продукцию Sup35 и, соответственно, на супрессорный фенотип. При этом сверхэкспрессия *MCM1* в штаммах [PSI⁺] с отсутствующими потенциальными сайтами связывания Mcm1 в промоторе *SUP35* по-прежнему приводила к усилению нонсенс-супрессии, что говорит о том, что эти сайты в промоторе *SUP35* не влияют на эффект от избытка Mcm1, а следовательно Mcm1 напрямую не активирует транскрипцию Sup35.

Противоположная ситуация наблюдается в отношении транскрипционного фактора Sfp1: отсутствие интактных сайтов его связывания в промоторах *SUP35* и *SUP45* приводит к снижению экспрессии этих генов. В случае *SUP45* это непосредственно вызывает усиление нонсенс-супрессии, хоть и слабое, но детектируемое фенотипически. В случае нарушения

сайта связывания Sfp1 в промоторе *SUP35*, усиления супрессорного фенотипа не наблюдается, однако уровень продукции Sup35 значительно снижается. Прионная токсичность, возникающая при избытке Sfp1 в штаммах [*PSI⁺*], менее выражена при нарушении сайта связывания Sfp1 в промоторе *SUP35*. Всё это позволяет сделать вывод о том, что Sfp1 активирует транскрипцию генов *SUP35* и *SUP45* напрямую, связываясь с выявленными нами сайтами.

3.3. Завершение работы с транскрипционным регулятором Sfp1.

Несмотря на то, что штаммы 74-D694 и U-1A-D1628 являются близкородственными, полногеномное секвенирование (Varbitoff et al., 2021) выявило отличия в последовательности гена *SFPI* в этих штаммах (Таблица 3-1). При этом, последовательность в штамме U-1A-D1628 не отличалась от референсной (аллель из штамма 74-D694 в дальнейшем обозначена как *SFPI⁷⁴*). Оба штамма являются потомками штаммов ПГЛ. Ранее в результате полногеномного секвенирования с помощью IonTorrent (Drozdova et al., 2016) были выявлены т.н. «Петергофские» мутации в гене *SFPI* (Таблица 3-1; соответствующая аллель из штамма 25-25-2V-P3982 в дальнейшем обозначена *SFPI^P*). Некоторые мутации *SFPI^P* и *SFPI⁷⁴* совпадают, однако, аллель, обнаруженная в штамме 74-D694, несет несколько миссенс-мутаций, эффекты которых ранее не исследовались, в частности, одна из замен находится на участке, выявленном как потенциальный прионный домен (cPrD) (Alberti et al., 2009). Наличие всех нуклеотидных вариантов в рамке считывания *SFPI* было подтверждено с помощью секвенирования по Сэнгеру.

Таблица 3-1. Нуклеотидные замены в различных аллелях *SFPI*, обнаруженные с помощью полногеномного секвенирования. Все замены синонимичные, кроме тех, где указаны замены аминокислот.

| Штамм | Нуклеотидные замены (относительно референсной последовательности) | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|-----------------------------|-----------|----------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------|-------------------------------|-----------------------------------|------------|--|----------------|------------|------------|
| U-1A-D1628 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 74-D694 (<i>SFPI⁷⁴</i>) | t98 с (F3 3S) | t22 1с (M 74 T) | g2 73a | | a40 4g (N 13 5S) | | t87 4g (S2 92 A) | | t11 02с (S3 68 P) | a12 47 g (N 41 6S) | t12 69с | | g1 85 7a | t18 87с | a19 32с |
| 25-25-2V-3982 (<i>SFPI^P</i>) | t98 с (F3 3S) | t22 1с (M 74 T) | | c32 2t (H 10 8Y) | a40 4g (N 13 5S) | t41 0с (I1 37 T) | c87 3t | c10 56t | | | | | c17 61t | | |

Для исследования влияния *SFPI* на жизнеспособность и нонсенс-супрессию, нами были сконструированы векторы для экспрессии *SFPI* под контролем различных промоторов, так как ранее было показано, что различные эффекты, которые вызывает данный ген, по-разному проявляются при различных уровнях его экспрессии. Поскольку мы планировали изучать агрегацию соответствующего белка, в том числе с помощью методов флуоресцентной микроскопии, необходимо было сконструировать векторы, в которых *SFPI* был слит с последовательностью гена флуоресцентного белка. В качестве предварительного этапа, мы проверили, влияет ли длина линкерной последовательности между *SFPI* и *GFP* на свойства *SFPI*. Для этого мы сконструировали несколько векторов, экспрессирующих под контролем сильного конститутивного промотора *GPD SFPI*, связанный с флуоресцентными белками через различные линкеры (Таблица 3-2).

Таблица 3-2. Векторы для экспрессии *SFP1*, под контролем промотора *GPD*.

| Вектор | Описание | Последовательность линкера | Длина линкера (а.к.) |
|-------------------------|--|----------------------------|----------------------|
| pR15GPD-SFP1-GFP | <i>CEN,LEU2,pTDH3-SFP1-GFP</i> | PR | 2 |
| pRS416GPD-SFP1-Cerulean | <i>CEN,LEU2,pTDH3-SFP1-Cerulean</i> | ACRNSISSL | 9 |
| pAG416GPD-SFP1-Cerulean | <i>CEN,LEU2,pTDH3-SFP1-Cerulean</i> | YPAFLYKVVMGCRNSISSL | 19 |
| pR16GPD-SFP1-GFP | <i>CEN,URA3,pTDH3-SFP1-GFP</i> | PR | 2 |
| pUGT-SFP1P-GFP | <i>CEN,URA3,pTDH3-SFP1^P-GFP</i> | ACRHASLRPRGSGSGS | 16 |

Поскольку известно, что сверхэкспрессия *SFP1* приводит к снижению жизнеспособности клеток, мы сравнили рост клеток, полученных при трансформации данными плазмидами. В результате выяснилось, что линкер длиной в 2 аминокислоты действительно существенно снижает эффект подавления роста, вызванный сверхэкспрессией *SFP1* (Рис. 3-7). Поэтому, далее мы использовали только векторы, в которых длина линкера Sfp1-GFP была не менее 10 аминокислот. Мы далее сконструировали векторы для экспрессии *SFP1-GFP* под контролем промотора *CUP1*, а также под контролем собственного промотора. Помимо вариантов *SFP1* из штаммов 74-D694 и 25-25-2V-P3982 мы также сконструировали плазмиду для экспрессии аллели *sfp1-1*, содержащей 7 аминокислотных замен в большинстве известных сайтов фосфорилирования Sfp1 (Lempiainen et al., 2009).

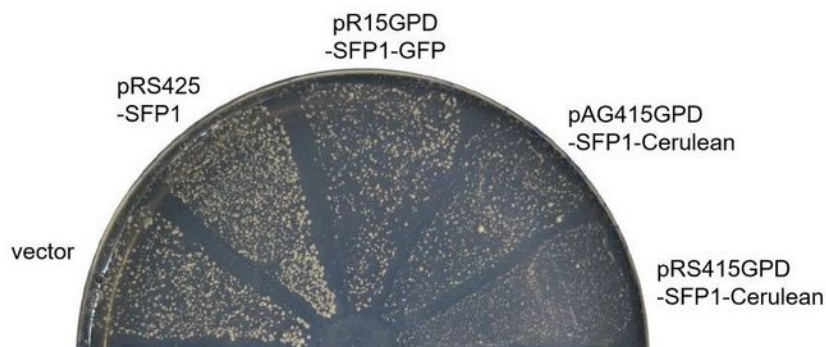


Рисунок 3-7. Сравнение эффектов длины линкера на подавление роста штаммов при сверхэкспрессии *SFP1*. Одинаковое количество клеток высеяно на селективную среду, рост оценивали после 6 дней инкубации.

Ранее мы показали, что избыток Sfp1 приводит к усилению токсичности приона [*PSI⁺*] (Matveenko et al., 2016). В ходе выполнения проекта в 2021г мы проверили влияние различных аллелей *SFP1*. Для этого мы экспрессировали варианты *SFP1* под контролем промотора *CUP1*, после чего анализировали рост колоний на твёрдой среде. В результате нам не удалось обнаружить различий между аллелями *SFP1* по их влиянию на токсичность приона (Рис. 3-8 А). Различий в уровне нонсенс-супрессии мы также не выявили (Рис. 3-8Б). Мы наблюдали, что аллель *sfp1-1* демонстрирует меньшую токсичность, что может говорить о том, что фосфорилирование Sfp1 может влиять либо на активацию транскрипции *SUP35*, либо на агрегацию Sup35.

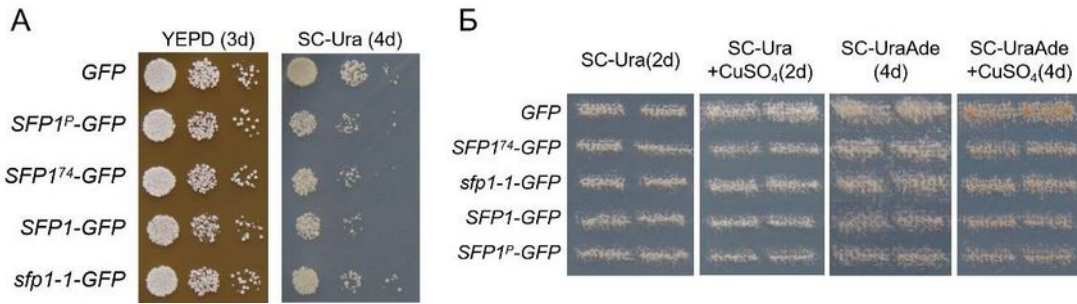


Рисунок 3-8. Анализ фенотипов штаммов $[PSI^+]$, сверхэкспрессирующих различные аллели *SFP1*. А. Посевы 10-кратных разведений трансформантов OT56 плазмидами для экспрессии соответствующих аллелей после инкубации на среде с 50 мкМ $CuSO_4$ в течение двух дней. Б. Отпечатки тех же трансформантов на селективные среды.

Для оценки жизнеспособности штаммов с делецией *SFP1*, компенсированной плазмидами с различными аллелями *SFP1* под контролем собственного промотора необходимо было получить различные конструкции с *SFP1* под контролем собственного промотора. Анализ компенсации делеции гена *SFP1* его различными аллелями будет завершён после получения недостающих конструкций.

Для анализа способности продуктов различных аллелей *SFP1* к формированию агрегатов с помощью флуоресцентной микроскопии, мы проверили, отличаются ли паттерны флуоресценции соответствующих агрегатов. Для этой цели клетки после временной экспрессии *SFP1-GFP* анализировали с помощью флуоресцентной микроскопии. Мы наблюдали агрегаты почти в 100% клеток во всех случаях. Паттерн флуоресценции также не отличался (Рис. 3-9). Таким образом, можно предположить, что мутации в *SFP1* в штаммах ПГЛ не влияют на способность белка к агрегации.

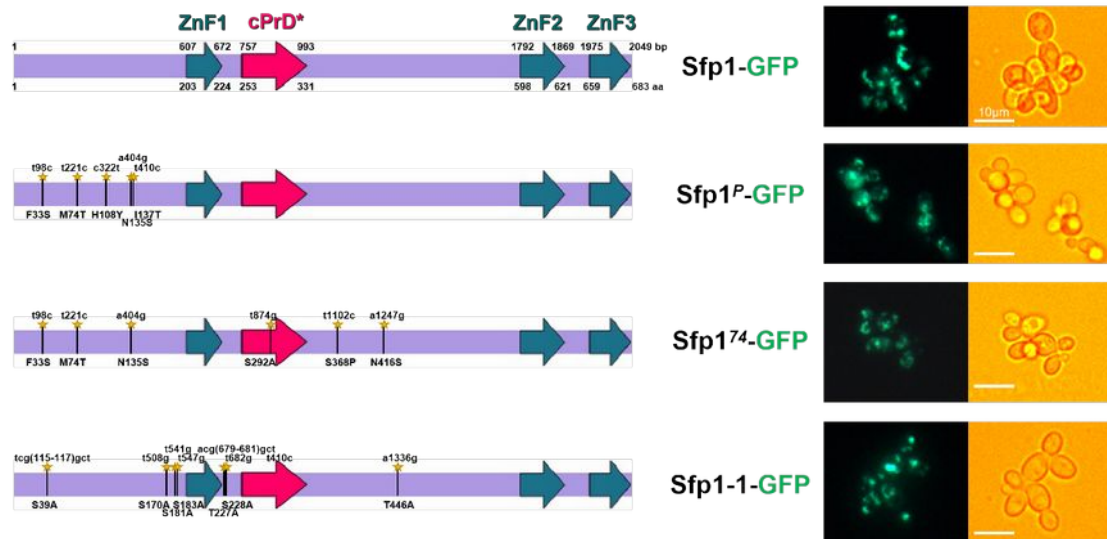
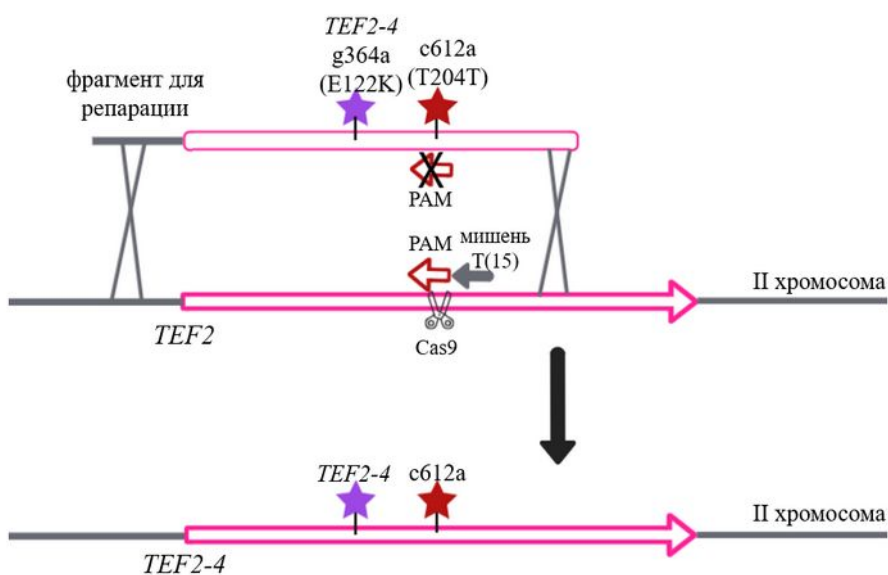


Рисунок 3-9. Флуоресцентная микроскопия клеток, экспрессирующих различные варианты *SFP1*. Справа показана флуоресценция репрезентативных групп клеток и тех же клеток при обычном освещении. Слева на схемах конструкций отмечены несинонимичные нуклеотидные и соответствующие им аминокислотные замены в соответствующем варианте белка. ZnF1-3 - домены цинковых пальцев, cPrD - потенциальный прионный домен по Alberti et al., 2009.

3.4. Завершение работы с генами *TEF1* и *TEF2*.

Ранее нами были получены штаммы [*PSI*⁺] (производные OT56) и [*psi*⁻] (74-D694), в которых ген *TEF1* был делетирован путем его замены на кассету устойчивости к антибиотику G418. Также были получены штаммы с делецией гена *TEF2*, у которых данный ген был заменен на кассету устойчивости к гигромицину Б. На основе этих штаммов нами были созданы две системы для получения мутантов по генам *TEF1* и *TEF2* *in vivo*. Первая система основана на введении мутантной хромосомной копии гена *TEF2* в геном штаммов с делецией гена *TEF1*. Вторая система основана на делеции хромосомных копий генов *TEF1* и *TEF2* и введении мутантных копий данных генов на плазмиде (Рис. 3-10).

А



Б

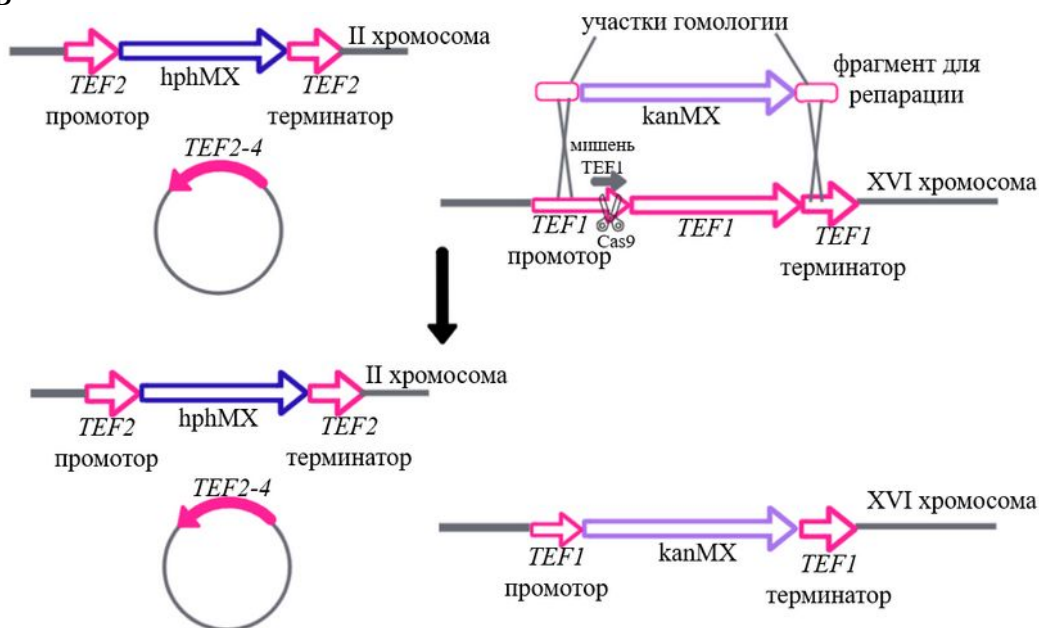


Рисунок 3-10. Схемы получения мутантов *TEF2-4*. А. Первый способ, позволяющий получить мутантные аллели в хромосоме. Б. Второй способ для получения штаммов, несущих мутантную аллель на плазмиде

Для обработки обоих методов мы использовали описанную ранее мутацию *TEF2-4*. Присутствие этой мутации можно удобно детектировать, так как она нарушает сайт *EcoRI* в гене *TEF2*. Мы сконструировали плазмиду *pRS315-tef2-4*, которую в дальнейшем использовали в качестве источника мутантной аллели. Для функционирования первой системы нами также была сконструирована плазмида *YEplac181GC9H-sgT(15)*, содержащая ген *Cas9* под контролем промотора *GPD*, а также кассету для экспрессии направляющей РНК (sgRNA), узнающей мишень Т(15), содержащейся в генах *TEF1* и *TEF2*, под контролем промотора *SNR52* (Рис.3-11).

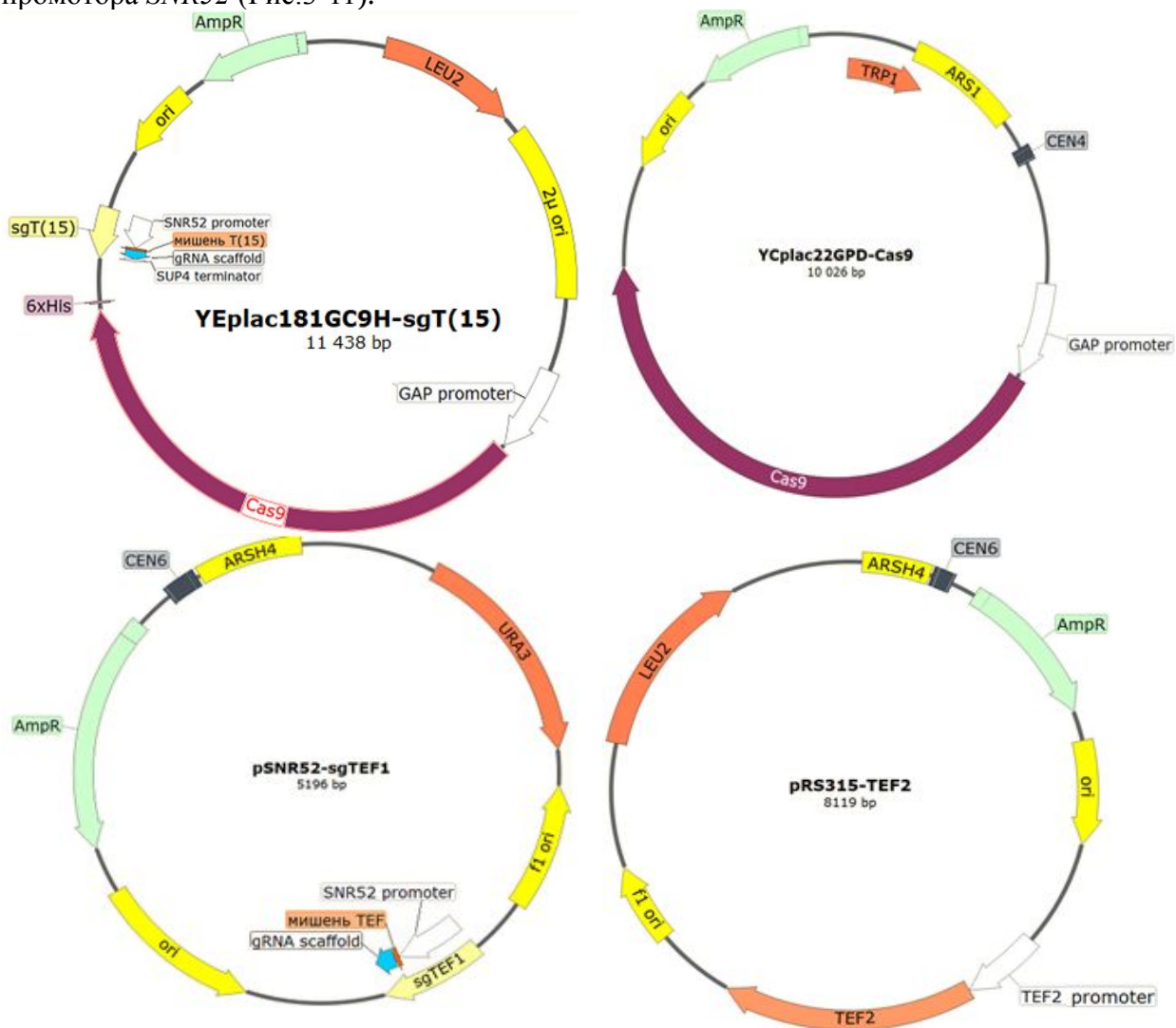


Рисунок 3-11. Физические карты плазмид использованных в работе. *ori* – бактериальный ориджин репликации; *f1 ori* – ориджин репликации бактериофага *f1*; *AmpR* – ген устойчивости к ампициллину; *CEN6* и *CEN4* – участки дрожжевых центромер; *ARS4* – дрожжевой ориджин репликации; *TRP1*, *LEU2* и *URA3* – дрожжевые селективные маркеры; *AmpR* – бактериальный ген устойчивости к ампициллину; *2μ ori* – ориджин репликации *2μ* ДНК; белыми стрелками изображены промоторы соответствующих генов.

Для получения хромосомных мутантов *TEF2-4* первым способом штаммы трансформировали плазмидой *YEplac181GC9H-sgT(15)* и фрагментом для репарации содержащим мутантную копию гена *TEF2*. Во фрагмент для репарации, также была встроена незначительная замена *s612a* (T204T), благодаря которой исчезает PAM *Cas9*, соответствующий мишени Т(15) (Рис.3-10А). Использование данной системы позволило нам отобрать штаммы, как [*PSI⁺*], так и [*psi⁻*], несущие мутацию *TEF2-4* вместе с заменой *s612a*. Аналогичным образом данная система должна позволить получать и мутантов по гену *TEF1*, если для трансформации использовать штаммы с делецией гена *TEF2*.

Получение мутантов *TEF2-4*, несущих мутантную аллель на плазмиде (второй способ) по исходной схеме (Рис.3-10Б) оказалось крайне неэффективным (нам удалось получить всего один клон [*psi*] с мутантной аллелью *TEF2-4* на плазмиде; ни одного клона [*PSI*⁺] получить не удалось). Поэтому мы модифицировали схему, используя ген *TEF2* дикого типа на плазмиде. Такая модификация позволяет получить штаммы с двойной делецией *tef1Δ tef2Δ*, из которых впоследствии можно будет получать мутантов с помощью плазмидного шаффлинга. В результате нескольких этапов по оптимизации схемы эксперимента мы пришли к следующей последовательности действий: сначала трансформировали штаммы с делецией гена *TEF2* плазмидами pSNR52-sgTEF1 и pRS315-TEF2, несущими направляющую РНК с мишенью к промотору гена *TEF1* и ген *TEF2-4*, соответственно (Рис. 3-11). Далее полученные штаммы мы трансформировали плазмидой YCplac22GPD-Cas9, несущей ген Cas9 (Рис. 3-11), и фрагментом для репарации, содержащим кассету устойчивости к G418, фланкированную последовательностями из промотора и терминатора гена *TEF1* (Рис.3-10Б). Таким образом нам удалось получить штаммы, как [*psi*], так и [*PSI*⁺] с делецией обоих генов *TEF1* и *TEF2*, несущих ген *TEF2* на плазмиде с лейциновым селективным маркером, далее мы заменили данную плазмиду с лейциновым селективным маркером на аналогичную плазмиду с урациловым, поскольку для данного маркера существует контрselectивная среда (содержащая 5-FOA). В дальнейшем данные штаммы можно будет использовать для получения мутантов *TEF1* или *TEF2* с помощью плазмидного шаффлинга.

В процессе отработки первого способа нами было отобрано 5 производных штамма 74-D694-T1k, которые предположительно демонстрировали небольшое повышение уровня нонсенс-супрессии. Как в исходном штамме, так и на фоне этих мутаций мы не наблюдали роста клеток на среде SC-Ade, однако, колонии демонстрировали более светлый оттенок на средах YEPD и 1/4YEPD (Рис.3-12). Среди отобранных мутантов один штамм (mut.1) также демонстрировал значительное снижение скорость роста. Важно заметить, что, поскольку цвет колоний не является надёжным свидетельством изменения уровня нонсенс-супрессии, то мы можем только предполагать, что супрессия усиливается.

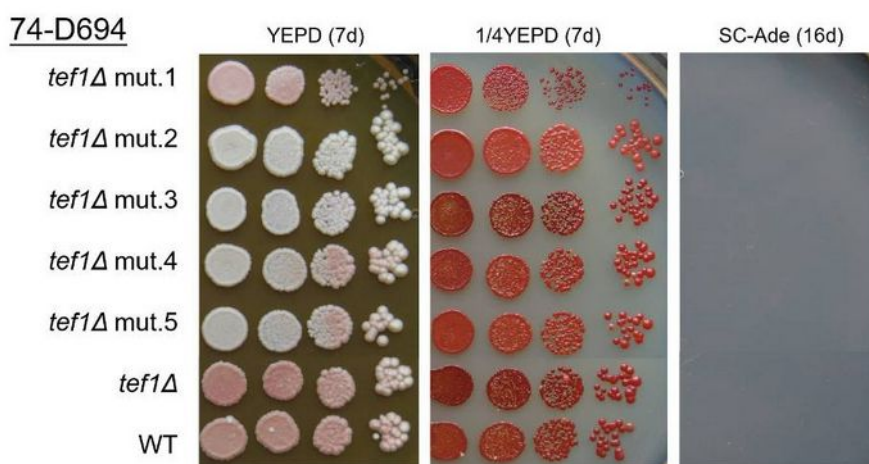


Рисунок 3-12. Сравнение фенотипов отобранных супрессорных мутантов. Представлены серии 10-кратных разведений на указанные среды.

Мы провели секвенирование гена *TEF2* в этих штаммах (Таблица 3-3). В четырёх штаммах действительно были найдены миссенс-мутации в гене *TEF2*, две из которых (mut.4 и mut.5) оказались идентичны. Интересно, что эта мутация (Glu122Ala) находится в том же кодоне, что и описанные ранее доминантные мутации *TEF2-4* (Glu122Lys) и *TEF2-10* (Glu122Gln) (Sandbaken & Culbertson, 1988). Светлый оттенок одного из клонов (mut.2) оказался не связан с мутацией в гене *TEF2*. Скорее всего, он возник из-за спонтанного формирования приона [*PSI*⁺], так как исчезал после пассирования штамма на среде с ГГХ.

Таблица 3-3. Замены нуклеотидов в гене *TEF2*, обнаруженные с помощью секвенирования по Сэнгеру.

| Штамм | Обнаруженные замены в рамке считывания <i>TEF2</i> (относительно референсной последовательности) | | | | | |
|---------------------------------|--|----------------------|-------|-------|-------|----------------------------------|
| 74-D694-T1k-mut.1 | | g391a (Gly190Ser) | t427c | | c612a | |
| 74-D694-T1k-mut.2 | | | | | c612a | |
| 74-D694-T1k-mut.3 | | | | | c612a | a646g (Thr216Ala) c762t c834t |
| 74-D694-T1k-mut.4 | a365c (Glu122Ala) | | | t567a | c612a | c762t c834t |
| 74-D694-T1k-mut.5 | a365c (Glu122Ala) | | | t567a | c612a | c762t c834t |
| 74-D694-T1k (исходный штамм) | | | | | | c762t c834t |

Данные Таблицы 3-3 показывают, что все замены синонимичны, кроме случаев, где также указаны замены аминокислот. Синонимичные мутации c762t и c834t присутствуют в исходном и в некоторых, но не во всех, отобранных штаммах, так как фрагмент для репарации был амплифицирован на матрице плазмиды pRS316-TEF2, содержащей референсную последовательность гена *TEF2* и, соответственно, не несущую данные замены.

Мы далее попробовали проанализировать свойства этих мутаций. Для этого трансформировали полученные штаммы центромерной плазмидой с геном *TEF2* дикого типа. В том случае, если отобранная мутация доминантная, мы ожидали ещё более светлую окраску колоний, а если рецессивная - возвращение тёмно-красного оттенка. В результате проведенного анализа mut.3 и mut.5 оказались доминантными, а mut.1, вероятно, может являться первой обнаруженной рецессивной супрессорной мутацией *tef2* (Рис. 3-13). Стоит отметить, что добавление копии гена *TEF2* дикого типа не только придавала колониям более красный оттенок, но и компенсировало медленный рост колоний с этой мутацией (Рис. 3-13), что говорит о том, что мутация обладает плейотропным эффектом, а такое снижение скорости роста также является рецессивным. Можно предположить, что данная мутация нарушает жизненно-важные функции *TEF2*, а именно доставку аминоксил-тРНК к А-сайту рибосомы в процессе элонгации трансляции или влияет на её ГТФазную активность.

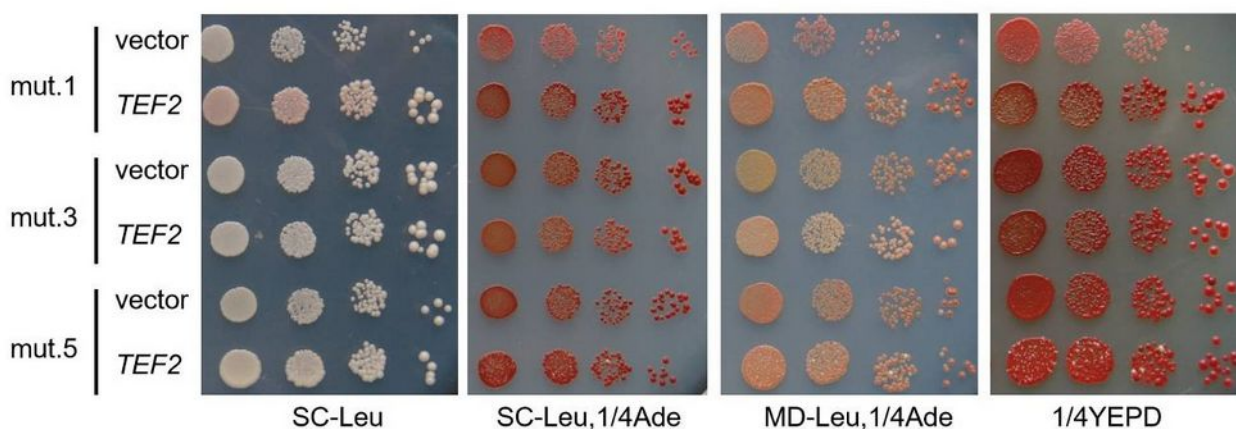


Рисунок 3-13. Проверка отобранных мутаций на доминантность/рецессивность. Показаны посевы с 10-кратными разведениями соответствующих трансформантов. Vector - pRS315, *TEF2* - pRS315-TEF2.

3.5. Анализ аминокислотного разнообразия белков Sup35 и Sup45 и взаимодействующих с ними белков у дрожжей-сахаромицетов.

Для анализа природной и лабораторной изменчивости белков Sup35 и Sup45 у представителей рода *Saccharomyces* мы провели поиск последовательностей этих белков в базе NCBI, а также взяли опубликованные в статье Peter *et al.* (Nature, 2018, <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0030-5>) последовательности, выложенные на сайте <http://1002genomes.u-strasbg.fr/files/>.

Хотя последовательность гена *SUP45* варьирует у штаммов вида *Saccharomyces cerevisiae*, однако все проанализированные замены в этом гене в пределах вида синонимичны. В белке Sup35 мы обнаружили 40 варьируемых аминокислотных позиций (Рис.3-14). Большая часть аминокислотных замен в Sup35 сосредоточена в N и M доменах и характерна для одиночных штаммов, однако в более консервативном C-концевом домене также наблюдаются варьируемые аминокислотные позиции, в том числе характерные для групп штаммов.

При сравнении последовательностей белков Sup35 и Sup45 у различных видов рода *Saccharomyces* нам удалось выявить небольшое количество межвидовых замен (Табл. 3-4). Варибельность Sup35 существенно больше, чем Sup45.

Таблица 3-4. Количество аминокислотных замен в белках Sup35 и Sup45 при сравнении референсного штамма *S. cerevisiae* S288c и других представителей рода *Saccharomyces*.

| Вид для сравнения | Количество замен в Sup35 | Количество замен в Sup45 |
|------------------------|--------------------------|--------------------------|
| <i>S. mikatae</i> | 42 | 1 |
| <i>S. paradoxus</i> | 17 | 2 |
| <i>S. kudriavzevii</i> | 45 | 6 |
| <i>S. bayanus</i> | 44 | 10 |

Мы сравнили найденные в Sup35 варьируемые позиции с известными мутациями в лабораторных штаммах (Рис. 3-14) Только одна известная лабораторная мутация находится в позиции, варьируемой в природных штаммах: в природном штамме YJM1387 наблюдается замена V413A по сравнению с остальными штаммами, а в лабораторном штамме 112-25V-P382 (Volkov *et al.*, 2002) замена V413L снижает эффективность терминации трансляции.

```

1  MSDSNQGNNQ QNYQYSQNG NQQQGNRYQ GYQAYNAQAQ PAGGYQYNYQ
51  GYSGYQGGY QQYNPDAGYQ QQYNPQGGYQ QYNPQGGYQQ QFNPGGGRGN
101 YKNFNYYNNL QGYQAGFQPQ SQGMSLNDFQ KQQQAAPKP KKTLLKLVSSS
151 GIKLANATKK VGTKPAESDK KEEKSAETK EPTKEPTKVE EPVKKEEKPV
201 QTEEKTEES ELPKVEDLKI SESTHNTNNA NVTADALIK EQEEVDEVD
251 VNDMFGGKDH VSLIFMGHVD AGKSTMGGNL LYLTGSVDKR TIEKYEREA
301 DAGRQGWYLS WVMDTNKEER NDGKTIEVGK AYFETEKRRY TILDAPGHKM
351 YVSEMIGGAS QADVGVLVIS ARKGEYETGF ERGGQTREHA LLAKTQGVNK
401 MVVWVKMDD PTVNWSKERY DQCVSNVSNF LRAIGYNIKT DVVFPVSGY
451 SGANLKDHDV PKECPWYTG PTLLEYLDTM HVDRHINAPF MLPAAKMKD
501 LGTIVEGKIE SGHIKKGQST LLMPNKTAVE IQNIYNETEN EVDAMCGEQ
551 VKLRIKGVVE EDISPGFVLT SPKNPIKSVT KFVAQIAIVE LKSIIAAGFS
601 CVMHVHTAIE EVHIVKLLHK LEKGTNRKSK KPPAFKKGGM KVIIVLETEA
651 PVCVETYQDY PQLGRFTLRD QGTTIAIGKI VKIAE

```

Рисунок 3- 14. Изменчивые позиции в последовательности белка Sup35 *Saccharomyces cerevisiae*.

Дана референсная последовательность белка (штамм S288c), цветами выделены домены белка. Жирным шрифтом указаны позиции, по которым получены мутации в лабораторных штаммах. Красным курсивом выделены позиции, изменчивые в природных штаммах; жирный красный курсив - позиции, изменчивые в более чем 1% рассмотренных природных штаммов.

Для проведения анализа белков, взаимодействующих с белками eRF1 и eRF3, нами

были взяты данные из открытой базы данных STRING для дрожжевых белков eRF1 и eRF3 (Sup45 и Sup35 соответственно) (Рис. 3-15, Рис. 3-16). Из анализа исключались взаимодействия, обнаруженные только в массовых (High Throughput) анализах с использованием только генетических систем (например, дрожжевая двугибридная система), так как в данных исследованиях наблюдается высокая доля ложно-положительных результатов.

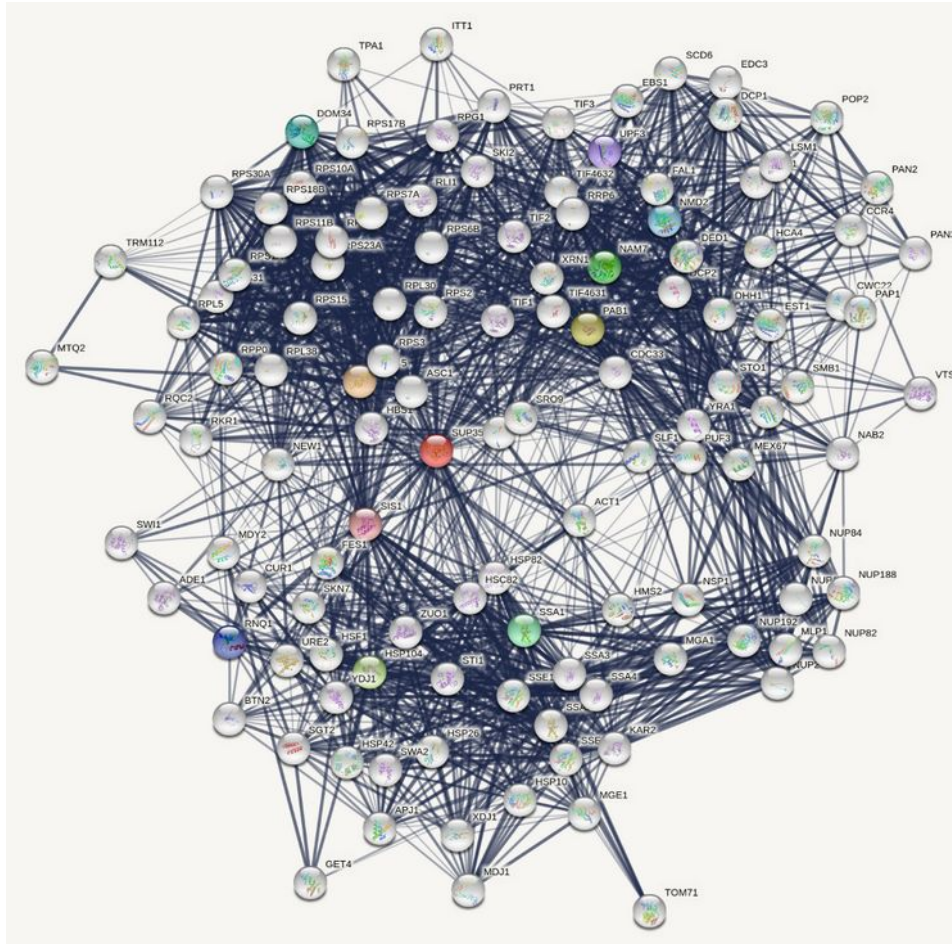


Рисунок 3-14. Карта белков, взаимодействующих с дрожжевым белком eRF3 (Sup35). На схеме представлены 100 белков, взаимодействия с которыми описаны наиболее детально.

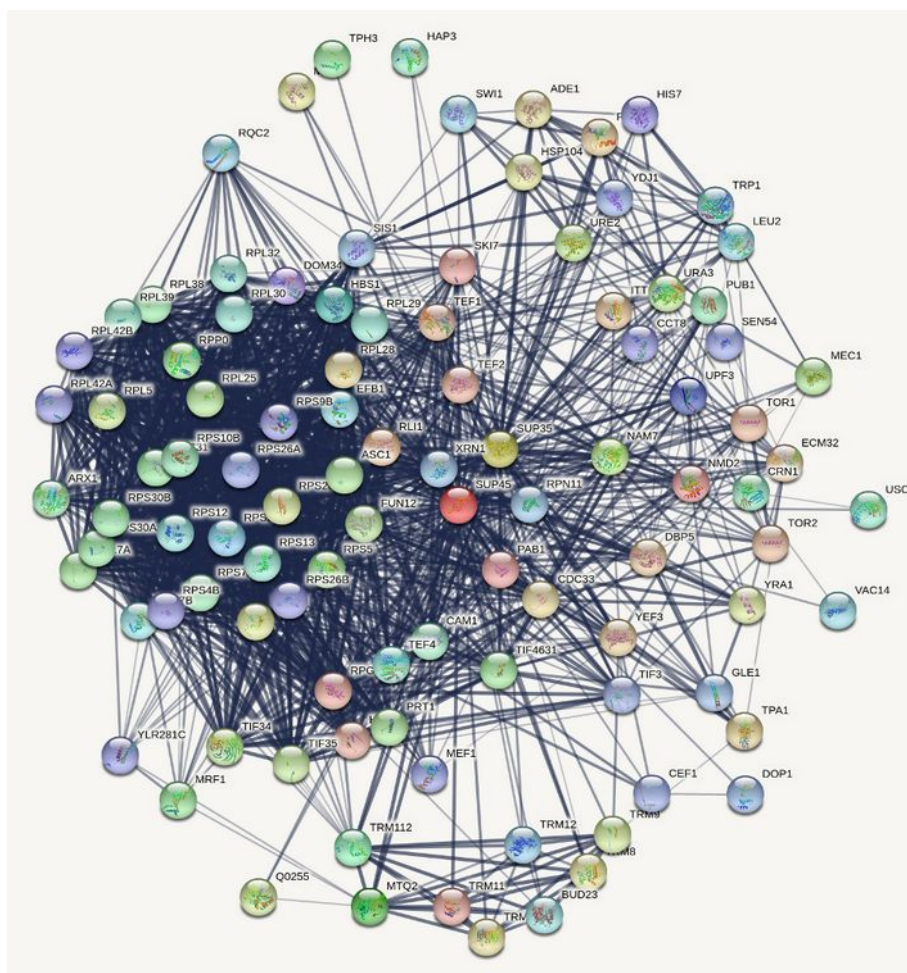


Рисунок 3-15. Карта белков, взаимодействующих с дрожжевым белком eRF1 (Sup45). На схеме представлены 100 белков, взаимодействия с которыми описаны наиболее детально.

Также из базы данных нами были извлечены ID белков, взаимодействующих с факторами eRF1 и eRF3 у модельных организмов (*Homo sapiens* и *Mus musculus*) (Таблица 3-5). В дальнейшем приведенный список белков планируется расширить для других модельных организмов, чтобы оценить вариабельность на более высоком таксономическом уровне.

Таблица 3-5. Сводная таблица, показывающая количество белков, взаимодействующих с факторами терминации трансляции у различных организмов.

| | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | <i>Homo sapiens</i> | <i>Mus musculus</i> |
|-------|---------------------------------|---------------------|---------------------|
| eRF1 | 139 | 78 | 9 |
| eRF3 | 336 | 81/65* | 18/18* |
| Dom34 | 33 | 82 | 4 |
| Hbs1 | 22 | 84 | 5 |

*У человека и мыши в случае eRF3 указано количество белков, взаимодействие которых аннотировано для паралогов Gspt1/Gspt2.

Далее в нашей работе мы решили сосредоточиться на компонентах системы трансляции, взаимодействующих с факторами терминации трансляции у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Для белка Sup45 – это Sup35, Upf1, Rli1, Dbp5, Tif35, Tif34; для белка Sup35 -- это Sup45, Upf1, Upf2, Upf3, Pab1 (используется дрожжевая номенклатура). Наиболее вариабельным среди всех представителей рода *Saccharomyces* оказался белок Upf3, а наименее - Upf2 (Таблица 3-6). Мы предполагаем, что на имеющейся таксономической выборке провести анализ коэволюции позиций не удастся, однако на более широкой выборке

это представляется возможным. В данный момент ведется анализ изменчивости указанных белков в пределах нескольких родов, родственных дрожжам-сахаромицетам, и в пределах класса млекопитающих.

Таблица 3-6. Количество аминокислотных замен при сравнении референсного штамма *S.cerevisiae* S288с и других представителей рода *Saccharomyces*.

| Вид для сравнения | Количество замен в | | | | | | | |
|------------------------|--------------------|--------------|-------------|-------------|-------------|-------------|--------------|--------------|
| | Upf1 971* | Upf2 1087 | Upf3 387 | Pab1 577 | Rli1 608 | Dbp5 482 | Tif35 347 | Tif34 274 |
| <i>S. mikatae</i> | 30 | 99 | 68 | 8 | 6 | 22 | 8 | 9 |
| <i>S. paradoxus</i> | 12 | 62 | 56 | 3 | 5 | 14 | 1 | 9 |
| <i>S. kudriavzevii</i> | 29 | 101 | 82 | 11 | 19 | 31 | 12 | 12 |
| <i>S. bayanus</i> | 35 | 102 | 93 | 13 | 23 | 35 | 16 | 17 |

* Под названием белка указана его длина в аминокислотах.

Используя полногеномные данные для 1011 штамма *Saccharomyces cerevisiae* (Peter *et al.*, 2018), мы попытались провести анализ коэволюции трех наиболее переменных белков из числа проанализированных (Upf1, Upf3 и Pab1) и белка Sup35 с помощью программы CAPS2 (Fares M.A., McNally D. Bioinformatics, 2006. doi: 10.1093/bioinformatics/btl493). Мы не обнаружили значимой корреляции на внутривидовом уровне между аминокислотными заменами ни в одной из трех пар белков. Тем не менее, мы планируем продолжить анализ на более широкой таксономической выборке.