

На правах рукописи

Максютенко Евгения Михайловна

**ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМОВ АДАПТАЦИИ
К НАРУШЕНИЯМ ПРОЦЕССА ТЕРМИНАЦИИ ТРАНСЛЯЦИИ У
ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE***

1.5.7 генетика

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва
2023

Работа выполнена в лаборатории физиологической генетики Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук

Научный руководитель: МОСКАЛЕНКО Светлана Евгеньевна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории физиологической генетики Санкт-Петербургского филиала Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук

Официальные оппоненты:

АГАФОНОВ Михаил Олегович – доктор биологических наук, руководитель группы геномного редактирования промышленных микроорганизмов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биохимии им. А.Н. Баха Российской академии наук

АЛКАЛАЕВА Елена Зиновьевна – кандидат биологических наук, заведующий лабораторией механизмов и контроля трансляции Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова НИЦ "Курчатовский институт"

Защита состоится « » _____ 2024 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета 24.1.088.01 (Д.002.214.01) в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук по адресу: 119991, Москва, ул. Губкина, 3. С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Института www.vigg.ru, тел. 8-499-135-14-31, e-mail: dissovet@vigg.ru.

Автореферат разослан «__» _____ 2024 года.

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор биологических наук

Горячева И.И

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования:

На сегодняшний день известно, что около трети наследственных болезней (например, мышечная дистрофия Дюшенна, цистозифиброз, мукополисахаридоз I типа, а также многие формы рака) обусловлены возникновением стоп-кодонов в кодирующих последовательностях различных генов. Тем не менее существование такого универсального механизма, как нонсенс-супрессия, позволяет нивелировать негативные последствия наличия преждевременных стоп-кодонов за счет прочитывания их как смысловых. Известно, что нонсенс-супрессия может возникать как за счет присутствия в клетке супрессорных тРНК, так и в результате нарушения процесса терминации трансляции. Одним из самых популярных модельных объектов современной биологии для изучения терминации трансляции и нонсенс-супрессии являются дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*. Адаптацию клеток к дефектам терминации трансляции можно изучать с использованием штаммов, несущих мутации в генах факторов терминации трансляции *SUP45* и *SUP35*.

Степень разработанности темы исследования:

Ранее было показано, что у эукариот существует два фактора терминации трансляции, eRF1 и eRF3. Гены *SUP45* и *SUP35*, кодирующие эти факторы у дрожжей, являются жизненно необходимыми: делеция любого из них приводит к гибели клеток дрожжей. Однако в нашей лаборатории были получены жизнеспособные штаммы с нонсенс-мутациями как в гене *SUP45* (Moskalenko *et al.*, 2003), так и в гене *SUP35* (Chabelskaya *et al.*, 2004). Показано, что данные мутации приводят к образованию укороченных белков и снижению уровня полноразмерных eRF1 и eRF3 соответственно. Данные мутации не являются летальными и могут поддерживать жизнеспособность дрожжей в штаммах с разным генетическим фоном, однако они приводят к термочувствительности и летальности аскоспор при мейозе у гетерозиготных диплоидов (Moskalenko *et al.*, 2003). Было выявлено, что в случае всех вышеперечисленных мутаций клетки остаются жизнеспособными благодаря нонсенс-супрессии. Тем не менее, количество белка, синтезируемое в результате нонсенс-супрессии, существенно снижено по сравнению с нормой. В связи с этим, можно предположить, что существуют дополнительные адаптивные механизмы, способствующие выживанию при нарушениях терминации трансляции.

Цель и задачи исследования:

Целью работы являлось изучение механизмов адаптации к нарушениям процесса терминации трансляции у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*.

В рамках поставленной цели были сформулированы следующие **задачи**:

- 1) Анализ данных полногеномного секвенирования штаммов Петергофской генетической коллекции, использованных в работе.
- 2) Выявление структурных изменений, происходящих в клетках дрожжей, в присутствии мутантных аллелей *sup45-n* и *sup35-n*, на фоне делеции генов *SUP45* и *SUP35*.
- 3) Сравнение уровня мРНК генов *SUP45* и *SUP35* у штаммов, несущих мутантные аллели *sup45-n* или *sup35-n*.
- 4) Исследование структурных изменений митохондриальной ДНК, а

- также её копийности, у нонсенс-мутантов *sup45-n* и *sup35-n*.
- 5) Анализ генетических вариаций, способствующих выживанию клеток дрожжей, несущих мутантные аллели *sup45-n* и *sup35-n* в качестве единственной хромосомной копии *SUP45* или *SUP35*.
 - 6) Изучение профиля экспрессии генов у штаммов, несущих мутантные аллели *sup45-n* и *sup35-n*, и выявление генов и биологических процессов, вовлеченных в адаптацию дрожжей к нонсенс-мутациям в генах *SUP45* и *SUP35*.

Научная новизна работы:

В рамках обсуждаемой диссертационной работы были впервые получены сборки геномов штаммов дрожжей U-1A-D1628, 74-D694, которые возможно использовать для дальнейшего изучения феномена жизнеспособных нонсенс-мутантов. В представленной работе впервые показано, что адаптация дрожжевых клеток к мутациям в генах факторов терминации трансляции происходит за счет увеличения количества плазмид, несущих мутантные аллели или в результате амплификации гена фактора терминации трансляции. Продемонстрировано, что присутствие нонсенс-мутаций в генах *SUP45* и *SUP35* в изучаемых штаммах приводит к изменению числа копий мтДНК. Впервые показано, что присутствие в клетках дрожжей нонсенс-мутаций в гене *SUP45* и *SUP35* приводит к увеличению экспрессии генов семейств *CLN*, *CLB*, а также *CDC28*, *SWI6*, когезинов *SMC3*, *IRR1* и генов *MOB1* и *MCD1*, снижению экспрессии *CDC20* и генов, кодирующих белки в составе комплекса APC/C (*APC9*, *CDC23*), которые являются ключевыми компонентами, обеспечивающими нормальное протекание клеточного цикла. Впервые предложена гипотеза, согласно которой адаптация дрожжей к мутациям жизненно важных генов факторов терминации трансляции, обусловлена замедлением клеточного цикла и задержкой перехода к делению.

Основные положения, выносимые на защиту:

- 1) Основным механизмом адаптации дрожжевых штаммов, имеющих делецию генов *SUP45* или *SUP35* и центромерную плазмиду, несущую нонсенс-аллель соответствующего гена, служит увеличение числа копий данных плазмид.
- 2) Увеличение числа копий плазмид, несущих мутантные аллели *sup45-105* или *sup35-218*, приводит к увеличению количества мутантных мРНК, кодируемых генами *SUP45* или *SUP35*, соответственно.
- 3) Присутствие нонсенс-мутаций в генах *SUP45* и *SUP35* в изучаемых штаммах приводит к увеличению числа копий мтДНК.
- 4) Присутствие мутантных аллелей в геноме большинства изученных штаммов в качестве единственной хромосомной копии *SUP45* или *SUP35* приводит к хромосомным перестройкам. Для мутаций *sup45-104*, *sup45-105*, *sup45-107* выявлена дисомия хромосомы II, для мутации *sup35-218* - дупликация участка хромосомы IV, что в итоге приводит к увеличению числа копий мутантного гена.
- 5) Присутствие в клетках дрожжей нонсенс-мутаций как в гене *SUP45*, так и *SUP35* приводит к увеличению экспрессии генов семейств циклинов и снижению экспрессии генов, кодирующих белки в составе комплекса APC/C, которые являются ключевыми компонентами, обеспечивающими нормальное протекание клеточного цикла.

Теоретическая и практическая значимость:

Данное исследование предоставляет дополнительный теоретический материал о модельном объекте современной генетики, дрожжах *S. cerevisiae*. Выявление у *S. cerevisiae* механизма адаптации к дефектам процесса терминации трансляции объясняет парадокс жизнеспособных нонсенс-мутантов по жизненно важным генам факторов терминации трансляции *SUP45* и *SUP35*. Изучение парадокса жизнеспособных нонсенс-мутантов имеет существенное значение для фундаментальных исследований в области взаимосвязи эукариотической терминации трансляции, контроля белкового синтеза и клеточного цикла. Полученная информация в дальнейшем может быть использована при исследованиях антибиотиков и различных синтетических молекул, способных модулировать эффективность терминации трансляции, а также при изучении и разработке терапевтических средств для заболеваний, связанных с возникновением преждевременных стоп-кодонов.

Степень достоверности и апробация работы:

Основные положения и результаты диссертации были представлены на 5 российских и международных конференциях и школах: BGRS/SB-2020 (Россия, Новосибирск 6-10 июля, 2020), 45th FEBS Congress (Словения, 3–8 июля, 2021), 3-ий Российский микробиологический конгресс (Россия, Псков 26 сентября – 1 октября 2021), III Объединенный научный форум физиологов, биохимиков и молекулярных биологов (Россия, Сочи, Дагомыс, 3–8 октября 2021), Пушкинская школа-конференция молодых учёных с Международным участием "Биология - наука XXI века" (Россия, Пушкино, 18-22 апреля 2022).

Публикации по теме исследования:

По теме исследования опубликовано 2 статьи в журналах, включенных в международные базы данных Scopus и Web of Science, а также 5 тезисов в сборниках российских и международных конференций, входящих в РИНЦ, Web of Science (Core Collection) и Scopus.

Личный вклад автора:

Материалы, вошедшие в данную работу, обсуждались и публиковались совместно с соавторами и научным руководителем. Лично автором были получены штаммы дрожжей, проанализированные в работе, производилось выделение геномной ДНК, РНК и получение кДНК, осуществлялась пробоподготовка для всех экспериментов, а также постановка ПЦР в реальном времени и обработка результатов, анализ данных полногеномного секвенирования и результатов секвенирования РНК.

Объём и структура работы:

Диссертация включает в себя следующие главы: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты», «Обсуждение результатов», «Выводы» и «Список использованной литературы». Полный объём диссертации составляет 132 страницы с 38 рисунками и 9 таблицами. Список литературы содержит 257 наименований.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Глава «Обзор литературы» диссертационной работы содержит два раздела, посвященных вариативности генома дрожжей и роли терминации трансляции в биосинтезе белка. Рассмотрены основные черты эволюции дрожжевого генома и адаптивная роль структурных изменений в геномах различных представителей дрожжей. Представлена информация о механизме терминации трансляции и основных его участниках у эукариот, а также отдельно описаны особенности структуры и функций факторов терминации трансляции у дрожжей *S. cerevisiae*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Штаммы и условия культивирования

Для полногеномного секвенирования были использованы штаммы *S. cerevisiae*, U-1A-D1628 (*MAT α ade1-14(UGA) trp1-289 (UAG) his3 lys2 ura3-52 leu2-3,112 sup45::HIS3MX* [pRS316-SUP45] [*psi*⁻] [*PIN*⁺]) (Barbitoff *et al.*, 2021) и 74-D694 (*MAT α ade1-14(UGA) trp1-289(UAG) ura3-52 his3- Δ 200 leu2-3,112* [*psi*⁻] [*PIN*⁺]) (Chernoff *et al.*, 1995). Для изучения механизма адаптации штаммов дрожжей к дефектам процесса терминации трансляции, помимо штамма U-1A-D1628, был использован штамм U-14-D1690 (*MAT α ade1-14(UGA) trp1-289(UAG) his3- Δ 200 lys2 ura3-52 leu2-3,112 SUP35::HIS3MX* [pRSU2-SUP35]) (Maksiutenko *et al.*, 2021.). На основе этих двух штаммов методом замещения плазмид были получены штаммы, несущие в составе центромерных плазмид нонсенс-мутантные аллели *sup35-n* и *sup45-n*. Также, для изучения парадокса жизнеспособных мутантов по генам факторов терминации трансляции, использовали штамм 1B-D1606 генотипа (*MAT α ade1-14(UGA) his7-1(UAA) lys9- Δ 21(UAA) trp1-289(UAG) ura3-52 leu2-3,112 gal10-1B*), несущий мутантные аллели генов *SUP45* и *SUP35* в качестве единственной хромосомной копии соответствующего гена. Для амплификации плазмид использовали штамм DH5 α *Escherichia coli* (Hanahan, 1985). Для культивирования дрожжей и бактерий и анализа фенотипа дрожжей использовали стандартные среды (Захаров и др., 1984, Kaiser *et al.*, 1994) с необходимыми модификациями. Используются стандартные методы генетики дрожжей (Захаров и др., 1984, Kaiser *et al.*, 1994, Gietz *et al.*, 1992) и генетической инженерии (Sambrook *et al.*, 1989) с необходимыми изменениями.

Полногеномное секвенирование

Выделение ДНК из клеток дрожжей проводили согласно опубликованным методикам (Kaiser *et al.*, 1994; Lada *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2013). Концентрацию и качество ДНК оценивали с помощью спектрофотометра NanoDrop (Thermo Scientific). Секвенирование генома штаммов 74-D694 (600-кратное покрытие) и U-1A-D1628 (800-кратное покрытие) проводилось А.В. Предеусом и А.Я. Белявской с использованием секвенатора Oxford Nanopore MinION с проточными ячейками 9.4.1 и набора реактивов SQK-LSK109. Для штаммов 74-D694 и U-1A-D1628 также осуществляли секвенирование при помощи коротких прочтений Illumina на платформе Illumina HiSeq 2500 в режиме парных прочтений с длиной считывания либо 2*130, либо 2*150 п.н. Для штаммов, несущих мутантные аллели *sup45-n* и *sup35-n* на плазмиде и в качестве единственной хромосомной копии, секвенирование библиотек ДНК

также осуществляли на платформе Illumina HiSeq 2500 в режиме парных прочтений с длиной считывания 2*150 п.н.

Анализ изменений в геномах штаммов, несущих различные аллели *sup45-n* или *sup35-n*

Число копий генов *COX3* (праймеры COX3_F - TTGAAGCTGTACAА ССТАСС; COX3_R - CCTGCGATTAAGGCATGATG), *SUP45* (праймеры SUP45_F - CGATCCAAGACTAGCATGTAAG; SUP45_R - СТТГААСАТАС ТТГАСАТТGGC), *SUP35* (праймеры SUP35_F - АСААСААGGТААСААС АГАТАСС; SUP35_R - GGATTGAATTGCTGCTGATAAC) в ДНК, выделенной из клеток дрожжей, несущих различные аллели *sup35-n* или *sup45-n*, анализировали с помощью ПЦР в реальном времени с использованием смеси EVA Green 2,5X PCR (Syntol) в соответствии с инструкциями производителя, с использованием амплификатора CFX96 (Bio-Rad, Hercules, Калифорния, США). Для оценки числа копий плазмид (праймеры bla_F - АТАААТСТGGAGCCGGTGAG; bla_R - СТАСГАТАСGGGAGGGCTТА) и мтДНК использовали *ACT1* (праймеры ACT1-F - ТААСGGTTCTGGTATG TGТААAGC; ACT1-R - GCTTCATCACCААСGТАGGAGTC), для сравнения количественной оценки мРНК использовали *ADH1* (праймеры F-ADH1-RT - САAGTCGTСАAGTCCATCTC; R-ADH1-RT - GTAGАСАAGCCGАСААССТ). Для каждой биологической повторности проводили три технические повторности количественной ПЦР. Для расчета итоговых значений критического цикла три технические повторности, в составе одной биологической, объединяли и вычисляли среднее, после чего использовали метод $\Delta\Delta C_T$ (Livak & Schmittgen, 2001).

Секвенирование РНК и анализ экспрессии генов

Выделение РНК проводили с использованием коммерческих реактивов согласно указаниям производителя. Подготовку библиотек для секвенирования осуществляли с использованием секвенатора HiSeq2500 и наборов NEBNext Ultra II Directional, NEBNext для мультиплексирования библиотек с комплектом из 96 пар праймеров с двойными индексами №2 для платформы Illumina. Секвенирование полученных библиотек проводили с использованием прибора Illumina HiSeq 2500 в режиме парных прочтений длиной 100 нуклеотидов. Секвенирование проводили сотрудники Ресурсного центра СПбГУ «Развитие молекулярных и клеточных технологий». Затем проводили анализ дифференциальной экспрессии с последующей аннотацией списка дифференциально экспрессированных генов. В качестве референса использовали последовательность генома штамма S288C (R64-3-1), а также его аннотацию.

Статистическая обработка результатов

Для сравнения двух независимых выборок с непрерывной функцией распределения использовали критерий Вилкоксона-Манна-Уитни. Для оценки корреляции полученных результатов использовали коэффициент корреляции Пирсона.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Сборка геномов штаммов U-1A-D1628 и 74-D694

Для выявления изменений, происходящих в геномах дрожжей при адаптации к нарушениям терминации трансляции, были просеквенированы геномы двух референсных штаммов Петергофской генетической коллекции — 74-D694 и U-1A-D1628. В предыдущих работах нашей лаборатории были созданы черновые сборки геномов штаммов ПГК при помощи данных секвенирования на основе коротких прочтений, полученных на платформе Ion Torrent (Drozdova *et al.*, 2016a). Для получения полных (хромосомного уровня) сборок геномов изучаемых штаммов и уточнения их последовательности в нашей лаборатории было проведено секвенирование генома U-1A-D1628 и 74-D694 при помощи как длинных (с использованием Oxford Nanopore MinION), так и коротких (Illumina) прочтений. Мы использовали ряд различных стратегий и программ для сборки генома (canu (Koren *et al.*, 2017), Flye (Kolmogorov *et al.*, 2019), Shasta (Shafin *et al.*, 2020)). Сравнение точности нуклеотидной последовательности сборок (Таблица 1) проводили на основании среднего количества нуклеотидных различий по сравнению с S288C и числе универсальных однокопийных ортологов (Benchmarking Universal Single-Copy Orthologs (BUSCO)) (Simão *et al.*, 2015) класса *Saccharomycetes*. Такой анализ показал высокую степень точности всех полученных сборок; в то же время, для дальнейшего анализа были использованы сборки при помощи программы canu ввиду большего числа обнаруженных цельных универсальных однокопийных ортологов (2124 для U-1A-D1628 и 2125 для 74-D694).

Таблица 1. Основные показатели качества полученных сборок геномов штаммов ПГК в сравнении с референсным геномом *S. cerevisiae*.

Сборка	Число контигов	N50 (т.п.н.)	Число отличий от S288C (на 100 т.п.н.)		Число цельных универсальных однокопийных ортологов
			SNV	инделы	
1A-D1628 (Shasta)	118	539	224.74	199.38	1812
74-D694 (Shasta)	191	651	263.21	216.23	1801
1A-D1628 (Flye)	19	837	230.18	56.33	2098
74-D694 (Flye)	20	763	265.39	68.28	2088

1A-D1628 (canu, финальная)	32	825	257.3	36.00	2124
74-D694 (canu, финальная)	29	808	294.8	41.60	2125
S288C (референс)	17	924	0*	0*	2126

* - ожидаемый результат при сравнении идентичных последовательностей

2. Выявление структурных изменений, происходящих в клетках дрожжей в присутствии мутантных аллелей *sup45-n* и *sup35-n* на фоне делеции генов *SUP45* или *SUP35*

В нашей лаборатории с помощью технологии Illumina было произведено полногеномное секвенирование и получены парные прочтения для 100 штаммов дрожжей *S. cerevisiae*, 10 из которых были отобраны в результате замещения исходной плазмиды с аллелью *SUP45* или *SUP35* дикого типа на аналогичную аллель, а остальные 90 — в результате замещения аллели дикого типа на мутантную аллель соответствующего гена.

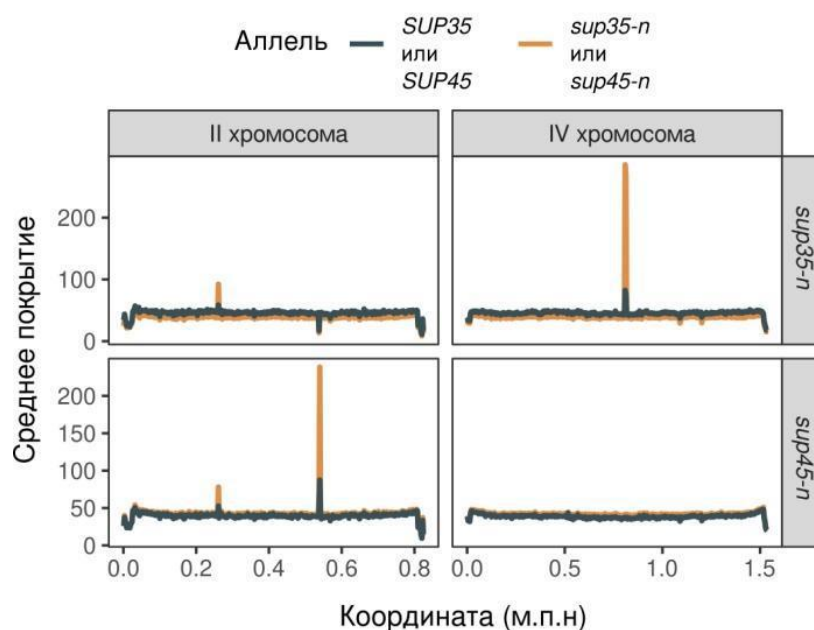


Рисунок 1. Средние профили покрытия прочтениями хромосом II и IV для штаммов, несущих аллели дикого типа и мутантные аллели *SUP45* (левая половина) или *SUP35* (правая половина). Данные о покрытии были получены с помощью программы qualimap.

В результате биоинформатического анализа данных полногеномного секвенирования штаммов, несущих различные нонсенс мутантные аллели *sup45-n* (101, 102, 104, 105, 107) и *sup35-n* (21, 74, 218, 240), было выявлено, что происходит увеличение покрытия в регионах (**рис. 1**), в которых расположены гены *SUP45* и *SUP35* (у клеток, несущих мутантные аллели *sup45-n* и *sup35-n*,

соответственно). На основе этого факта было выдвинуто предположение о том, что в штаммах, несущих мутантные гены *sup45-n* и *sup35-n*, может происходить увеличение числа копий плазмид pRS315-*sup45-n* (в штамме L-1A-D1628) и pRSU1-*sup35-n* (в штамме L-14-D1690) соответственно.

Для количественной оценки изменений копийности плазмид были использованы штаммы U-14-D1690 и U-1A-D1628 с делецией *SUP45* или *SUP35*, компенсированной копией этого гена на плазмиде, несущей маркер *URA3*. Этот штамм трансформировали либо плазмидой, содержащей селективный маркер *LEU2* и аллель дикого типа гена *SUP45* или *SUP35*, либо плазмидами, содержащими мутантную аллель *sup45-n* или *sup35-n* (2 стадия на **рис. 2**). Впоследствии штаммы, содержащие две плазмиды, выращивали на среде, содержащей 5-FOA, для потери плазмиды с маркером *URA3*, несущей аллель дикого типа *SUP45* или *SUP35* (3 стадия на **рис. 2**).

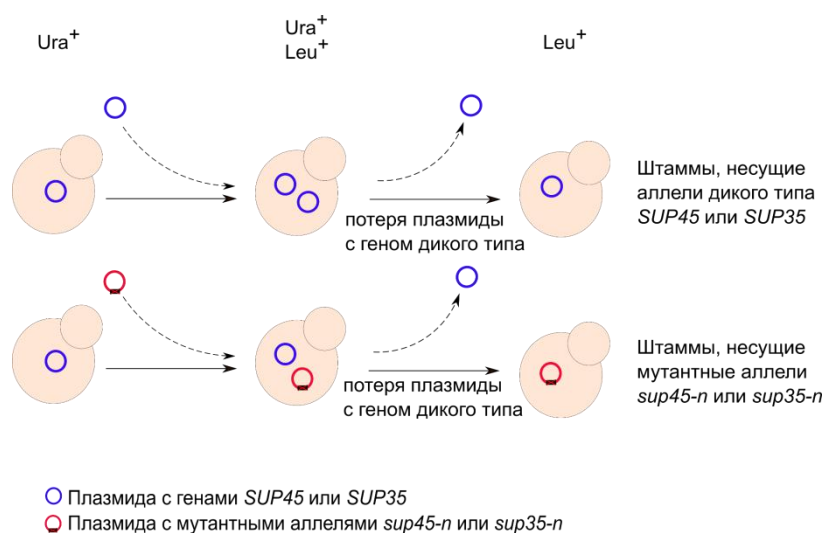


Рисунок 2. Схема эксперимента. На каждой стадии также присутствовал контроль — клетки, несущие исключительно плазмиду/ы с аллелью *SUP35*, *SUP45* дикого типа. Подписи Ura⁺, Ura⁺ Leu⁺ и Leu⁺ отражают фенотип клеток.

Затем мы выделяли геномную ДНК из штаммов и использовали ее для проведения серии количественных ПЦР в реальном времени. Мы провели сравнительный анализ числа копий плазмиды у штаммов, несущих аллели *sup45-n* и *sup35-n*, по данным полногеномного секвенирования и количественной ПЦР-РВ. Для оценки количества копий плазмиды на 3 стадии с использованием данных WGS и финальной версии сборки генома был использован метод, основанный на оценке покрытия в областях, специфичных для плазмидной ДНК, по сравнению со средним покрытием дрожжевого генома. Количество копий плазмид варьировало от 1,8 до 7,8 для мутантов *sup45-n* и от 4,3 до 11,7 в случае присутствия *sup35-n* (**рис. 3А**).

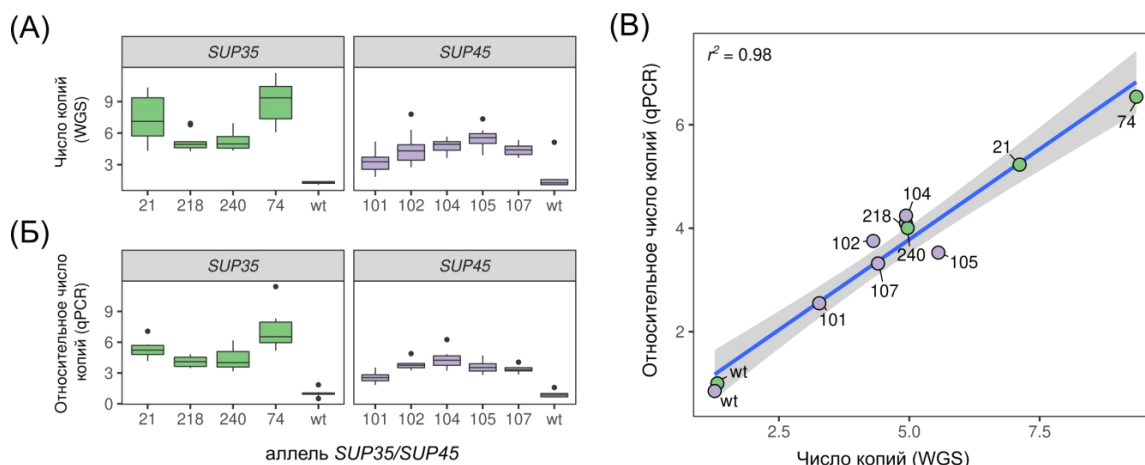


Рисунок 3. Количество копий плазмиды, оцененное с использованием данных WGS (А) и количественной ПЦР (ПЦР-РВ) с праймерами к гену *bla* (Б). (В) Диаграмма рассеяния, показывающая соответствие между числом копий плазмид по данным WGS и ПЦР-РВ. Цифры соответствуют аллелям *SUP35* и *SUP45*. Сплошная линия представляет собой линию линейной регрессии; серая область соответствует доверительному интервалу линейной регрессии.

Количество копий плазмиды в штаммах, несущих различные аллели *sup35-n* и *sup45-n* определяли при помощи праймеров, специфичных для гена β -лактамазы, расположенного на плазмиде (*bla*) (рис. 3Б). В качестве референсного гена использовали *ACT1*. Результаты количественной ПЦР-РВ показали сходные тенденции в увеличении числа копий плазмид для изученных мутантных аллелей, а количество копий плазмиды варьировало от 3,3 до 11,4 для *sup35-n* и от 1,8 до 6,2 для *sup45-n*.

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. 3В) между данными, полученными с использованием полногеномного секвенирования и количественной ПЦР (рис. 3А и 3Б).

Для выяснения того, оказывает ли увеличение количества копий плазмиды какой-либо эффект на уровне экспрессии мутантных аллелей соответствующих генов, мы провели анализ экспрессии генов *SUP45* и *SUP35* на уровне мРНК с помощью ПЦР-РВ (рис. 4).

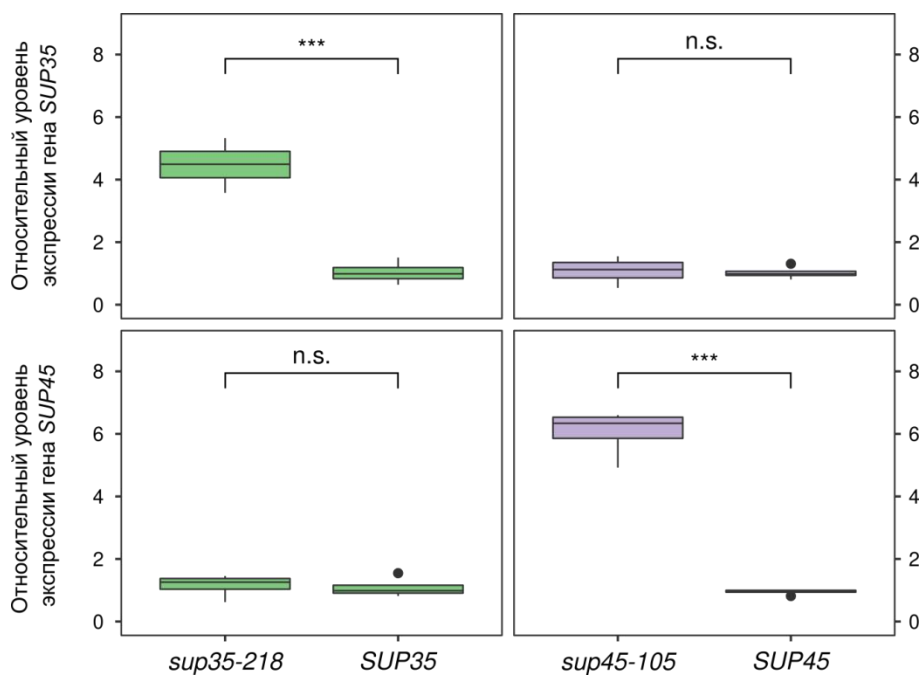


Рисунок 4. Уровни экспрессии генов *SUP45* и *SUP35* увеличены в клетках, содержащих мутантные аллели *sup45-105* и *sup35-218* на плазмиде. Относительные уровни экспрессии соответствующих генов оценивали с использованием метода $\Delta\Delta C_T$. В качестве референсного гена во всех случаях использовали *ADHI*. n.s. - $p > 0,05$; *** - $p < 0,001$ по критерию Вилкоксона-Манна-Уитни.

Для этого анализа были выбраны мутантные аллели *sup45-105* и *sup35-218*. В обоих случаях мы наблюдали устойчивое и значительное увеличение уровня экспрессии мутантных аллелей. Важно отметить, что не было обнаружено изменений в экспрессии аллели *SUP35* дикого типа в клетках, несущих аллели *sup45-105* и аллели *SUP45* дикого типа в клетках, несущих аллели *sup35-218*.

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

3. Количественный анализ митохондриальной ДНК у нонсенс-мутантов *sup45-n* и *sup35-n* дрожжей *S. cerevisiae*

Предварительная работа с клетками дрожжей, содержащими нонсенс-мутации *sup45-n* и *sup35-n*, выявила у данных штаммов частичную дыхательную некомпетентность. Для изучения изменений, происходящих на фоне присутствия в клетках дрожжей плазмид, несущих нонсенс-мутации, мы провели количественный анализ митохондриальной ДНК (мтДНК) у данных штаммов. Была проведена серия ПЦР-РВ с праймерами к гену *COX3*, который является одним из стандартных маркеров, используемых для оценки числа копий мтДНК. Для каждого образца было взято минимум по 3 биологические повторности. Мы обнаружили увеличение копийности исследуемого нами гена

COX3 у клеток дрожжей, несущих мутантные аллели *sup45-n* и *sup35-n* (рис. 5).

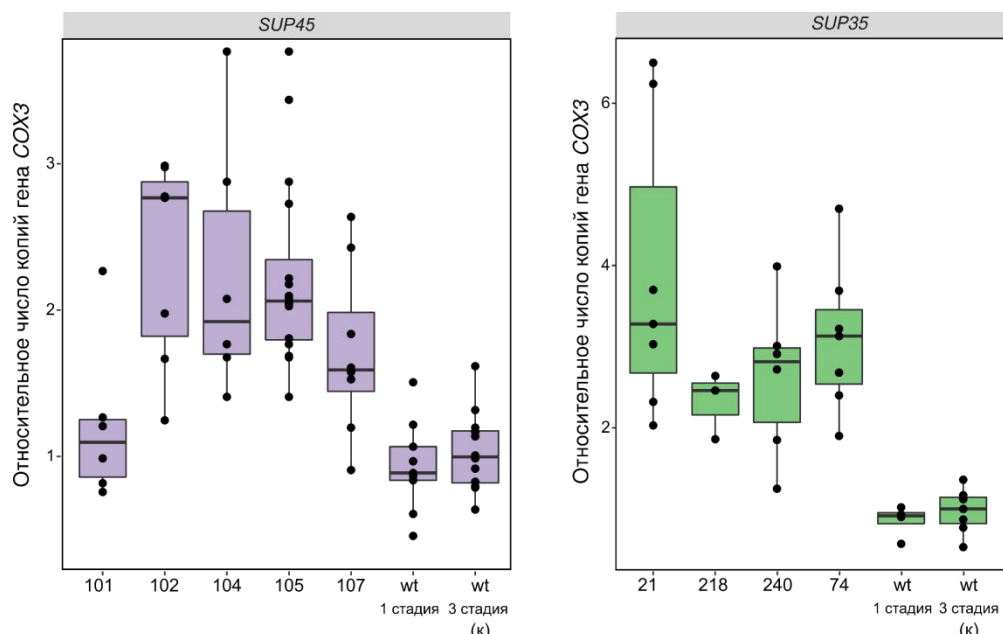


Рисунок 5. Нонсенс-мутации в генах *SUP45* и *SUP35* приводят к увеличению числа копий гена *COX3*. Контроли (к), на протяжении всего эксперимента содержали только плазмиды с аллелью дикого типа.

Мы проанализировали корреляцию между данными, полученными при оценке копийности центромерных плазмид, несущих мутации *sup45-n* и *sup35-n*, и копийностью мтДНК в изучаемых штаммах. Статистический анализ показал высокую степень корреляции ($r^2 = 0.829$) между изменениями числа копий плазмиды и мтДНК у разных мутантов *sup45-n* и *sup35-n* (рис. 6).

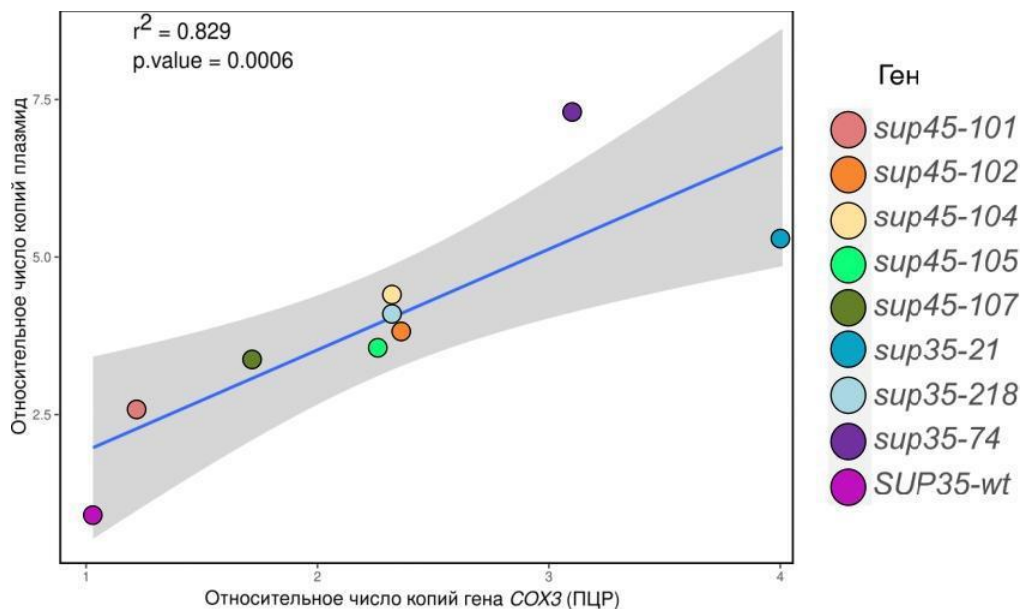


Рисунок 6. Изменение копийности центромерных плазмид, несущих мутантные аллели *sup35-n* и *sup45-n*, и изменение числа копий мтДНК в изучаемых штаммах имеют высокую степень корреляции. Сплошная линия представляет собой линию линейной регрессии; серая область соответствует доверительному интервалу линейной регрессии.

4. Анализ генетических факторов, способствующих выживанию клеток дрожжей, несущих мутантные аллели *sup45-n* и *sup35-n* в качестве единственной хромосомной копии *SUP45* или *SUP35*.

Первоначально мутации в генах *SUP45* и *SUP35* были получены с использованием штамма 1B-D1606 (Moskalenko *et al.*, 2003; Chabelskaya *et al.*, 2004). В данном штамме гены, кодирующие факторы терминации трансляции, расположены на хромосоме. Парадокс увеличения жизнеспособности клеток дрожжей, за счет амплификации числа копий гена, обнаруженный у штаммов U-1A-D1628 ($\Delta SUP45$ pRS316-SUP45) и U-14-D1690 ($\Delta SUP35$ pRSU2) стимулировал вернуться к исходному штамму и охарактеризовать геномы дрожжей, несущих мутантные аллели генов *SUP45* и *SUP35* в качестве единственной хромосомной копии соответствующего гена. Для выяснения механизмов адаптации таких штаммов к нарушениям терминации трансляции нами была выделена геномная ДНК из клеток дрожжей 1B-D1606, несущих мутации *sup45-n* (101, 102, 104, 105, 107) и *sup35-n* (203, 218, 244, 240, 260). 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. 7).

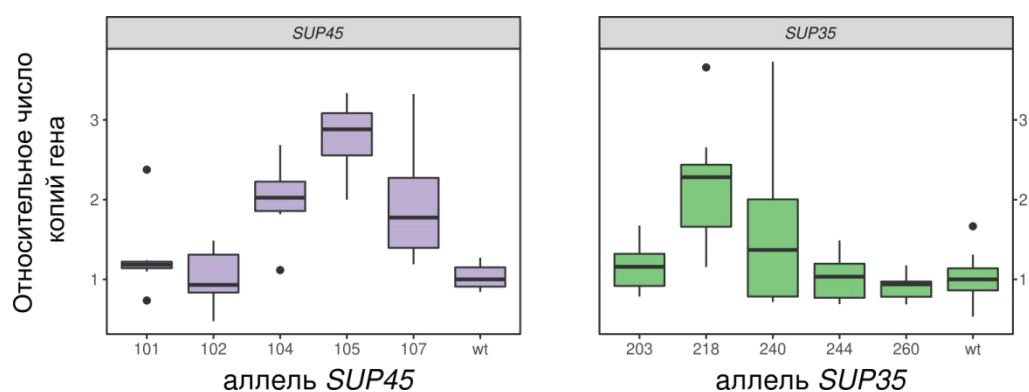


Рисунок 7. Количество копий некоторых мутантных аллелей *sup45-n* и *sup35-n* увеличено в клетках штамма 1B-D1606. На рисунке представлены графики, показывающие число копий аллелей *sup45-n* (слева) и *sup35-n* (справа) относительно штамма дикого типа 1B-D1606 (wt), определенное при помощи ПЦР-РВ. Относительное 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. Мы наблюдали двукратное увеличение количества копий для аллелей *sup45-104* и *sup45-107* и *sup35-218*. В случае *sup45-105* число копий было увеличено почти в три раза, хотя различия между *sup45-105* и *sup45-104* или *sup45-107* не имели статистической значимости ($p > 0,05$; оценено при помощи теста Вилкоксона-Манна-Уитни). В случае аллели *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. 7). Таким образом, для выяснения механизмов адаптации таких штаммов к мутациям в генах факторов терминации трансляции было необходимо провести полногеномное секвенирование этих штаммов.

С использованием технологии Illumina, было проведено полногеномное секвенирование различных штаммов n-1B-D1606, 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 1B-D1606 дикого типа. В соответствии с результатами ПЦР-РВ, в некоторых штаммах мы наблюдали увеличение покрытия в регионах, где расположены гены *SUP45* и *SUP35* (рис. 8).

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*.

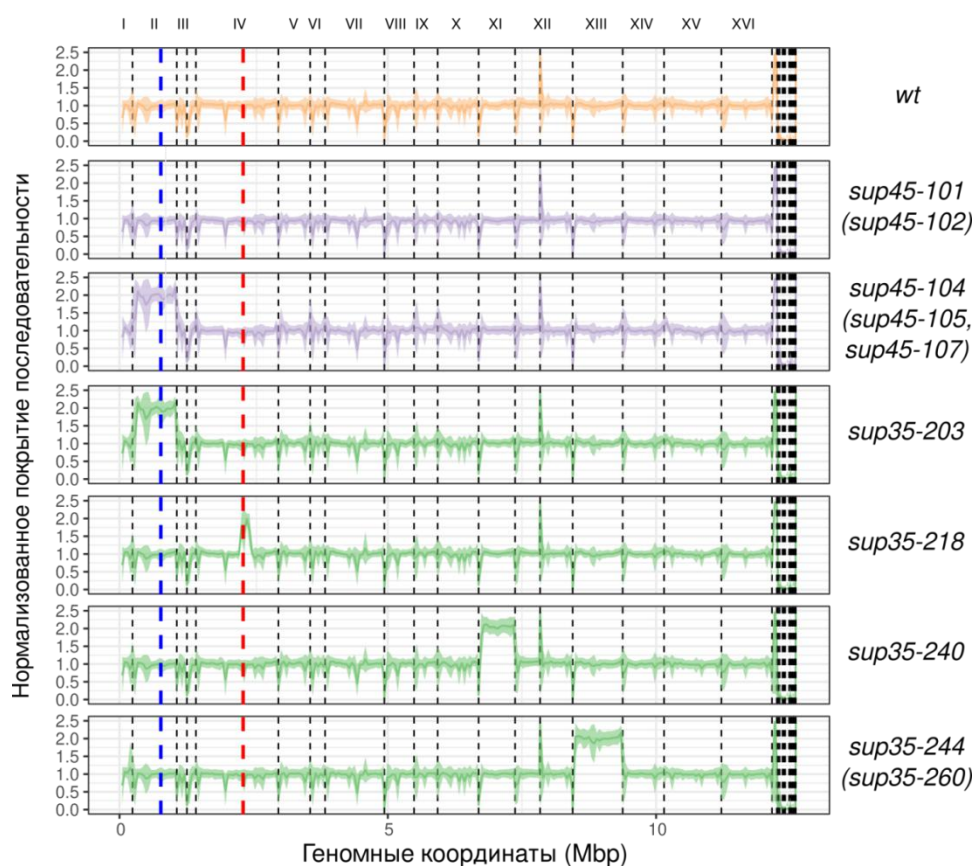


Рисунок 8. Визуализация результатов полногеномного секвенирования штаммов n-1B-D1606, содержащих мутантные аллели *sup45-n* и *sup35-n* в геноме. На рисунке представлены нормализованные профили покрытия относительно последовательности генома U-1A-D1628. Черные пунктирные линии соответствуют границам контигов. Синяя пунктирная линия соответствует расположению гена *SUP45* на II хромосоме. Красная пунктирная линия соответствует расположению гена *SUP35* на IV хромосоме. Показаны

репрезентативные профили покрытия для указанных наборов аллелей; штаммы с аналогичными профилями покрытия указаны в скобках.

Было обнаружено несколько случаев, в которых мутантные штаммы несли дисомию 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 244-1B-D1606 и 260-1B-D1606 мы обнаружили дисомию по хромосоме XIII. Таким образом, полученные результаты показывают, что адаптация к нонсенс мутациям в генах факторов терминации в штаммах 1B-D1606 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.

5. Анализ ответа дрожжевых клеток на присутствие мутантных аллелей *sup35-n* и *sup45-n* на уровне транскриптома

Все ранее полученные результаты, как для клеток дрожжей, несущих нонсенс-мутантные аллели генов *SUP45* и *SUP35* на плазмиде, так и для клеток содержащих *sup45-n* и *sup35-n*, в качестве единственной хромосомной копии, показали наличие единого механизма адаптации к нарушениям в работе факторов терминации трансляции. Отдельный интерес в этом вопросе представляли особенности метаболизма и основных клеточных процессов у таких дрожжей. Поэтому на следующем этапе были проанализированы изменения, происходящие на транскрипционном уровне. Мы использовали метод высокопроизводительного секвенирования транскриптома, RNA-Seq, который позволяет более полно описать транскрипционные изменения, происходящие в ходе клеточной адаптации. В ходе работы мы провели секвенирование 30 образцов с различными комбинациями аллелей *SUP45/sup45-105* и *SUP35/sup35-218* на плазмиде: 1 стадия (клетки, несущие с плазмиду с аллелью дикого типа) — 7 образцов, 2 стадия (клетки с двумя плазмидами) — 8 образцов (только для *SUP45/sup45-105*), 3 стадия (клетки после потери плазмиды, несущей аллель дикого типа) — 15 образцов. В связи с высокой гетерогенностью результатов для образцов несущих аллели *SUP45/sup45-105*, более подробную дальнейшую аннотацию осуществляли для данных, полученных при анализе клеток с аллелью *sup35-218*. При интерпретации эффектов дифференциально экспрессированных генов на жизнедеятельность клеток учитывали данные, полученные с образцов, несущих как аллель *sup35-218*, так и *sup45-105*.

На первом этапе мы проанализировали совокупные различия профилей экспрессии генов между образцами, несущими мутантные аллели и аллели дикого типа *SUP35* на разных стадиях эксперимента. Для этого использовали полученные в ходе анализа исходных прочтений табличные данные, содержащие количественную оценку уровней экспрессии каждого из генов дрожжей в каждом из изученных образцов.

При проведении анализа таких данных методом главных компонент для набора образцов, несущих различные аллели гена *SUP35* (рис. 9А), мы наблюдали разделение образцов на 3 группы, соответствующие клеткам, несущим только мутантные аллели *sup35-n* (3 стадия), а также клеткам дикого типа (на 1 и 3 стадиях). Четкое разделение образцов на группы в плоскости первых двух главных компонент указывает на наличие воспроизводимых различий профилей экспрессии генов в изучаемых образцах.

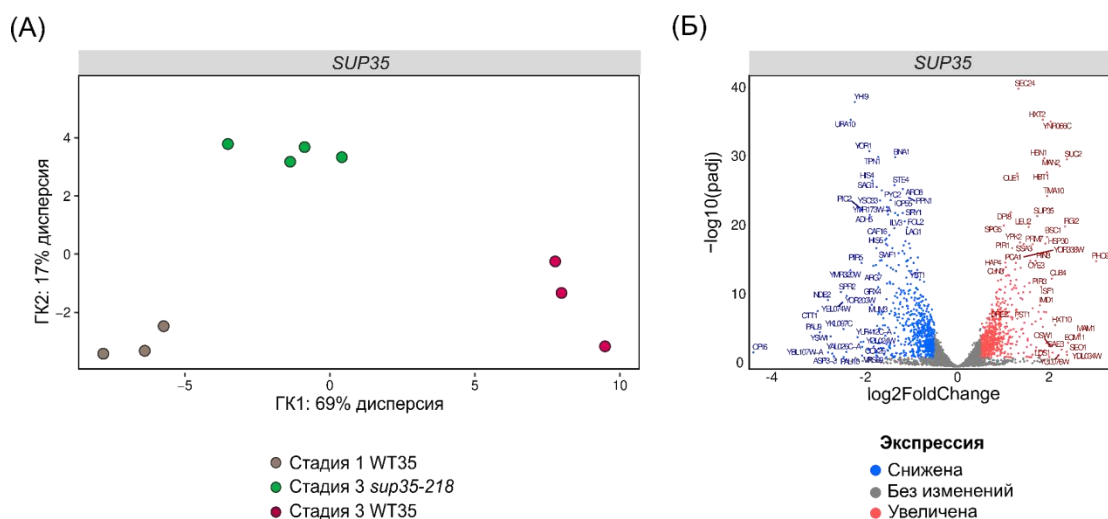


Рисунок 9. Анализ транскриптомов дрожжей. А) Анализ методом главных компонент (ГК). Диаграмма рассеяния 10 образцов, несущих различные комбинации аллелей гена *SUP35* (1,3 стадия), по первым двум главным компонентам. Б) Результаты анализа дифференциальной экспрессии генов в клетках на 3 стадии эксперимента, несущих аллели *sup35-218* по сравнению с клетками, несущими аллели дикого типа соответствующих генов. На диаграмме представлен логарифм кратного изменения экспрессии (ось абсцисс) и обратный логарифм скорректированного р-значения (ось ординат). Гены, у которых изменения экспрессии незначимы, показаны серым цветом. Значимо дифференциально экспрессирующиеся гены ($FDR < 0,05$) представлены красными точками (повышенная экспрессия) и синими точками (сниженная экспрессия).

На следующем этапе нами был проведен анализ дифференциальной экспрессии генов. Ввиду существенных различий в ДЭГ между 1 и 3 стадией, (что, вероятно, объясняется различиями в составе питательной среды для клеток, несущих плазмиды с разными селективными маркерами), анализ проводили исключительно между клетками на 3 стадии. На фоне присутствия аллели *sup45-105* экспрессия 126 генов была двукратно повышена, 19 — более чем двукратно снижена, а в случае наличия мутации *sup35-218* было выявлено 147 генов с двукратно повышенной экспрессией, 216 — с двукратно сниженной (рис. 9Б).

После первоначального отбора ДЭГ мы проанализировали молекулярные процессы, которые они регулируют. Для этого был применен метод анализа обогащения наборов генов с использованием базы данных Gene Ontology (<http://geneontology.org/>). Анализ полученных результатов для клеток, несущих аллель *sup35-218*, показал обогащение набора генов с повышенной экспрессией генами, участвующими в контроле клеточного цикла, а также генами, продукты которых активны в клеточной стенке и в составе циклин-зависимых

протеинкиназных комплексов (рис. 10 А,Б). Среди генов со сниженной экспрессией была обнаружена перепредставленность генов-участников различных процессов биосинтеза, в том числе синтеза аминокислот (рис. 10В).

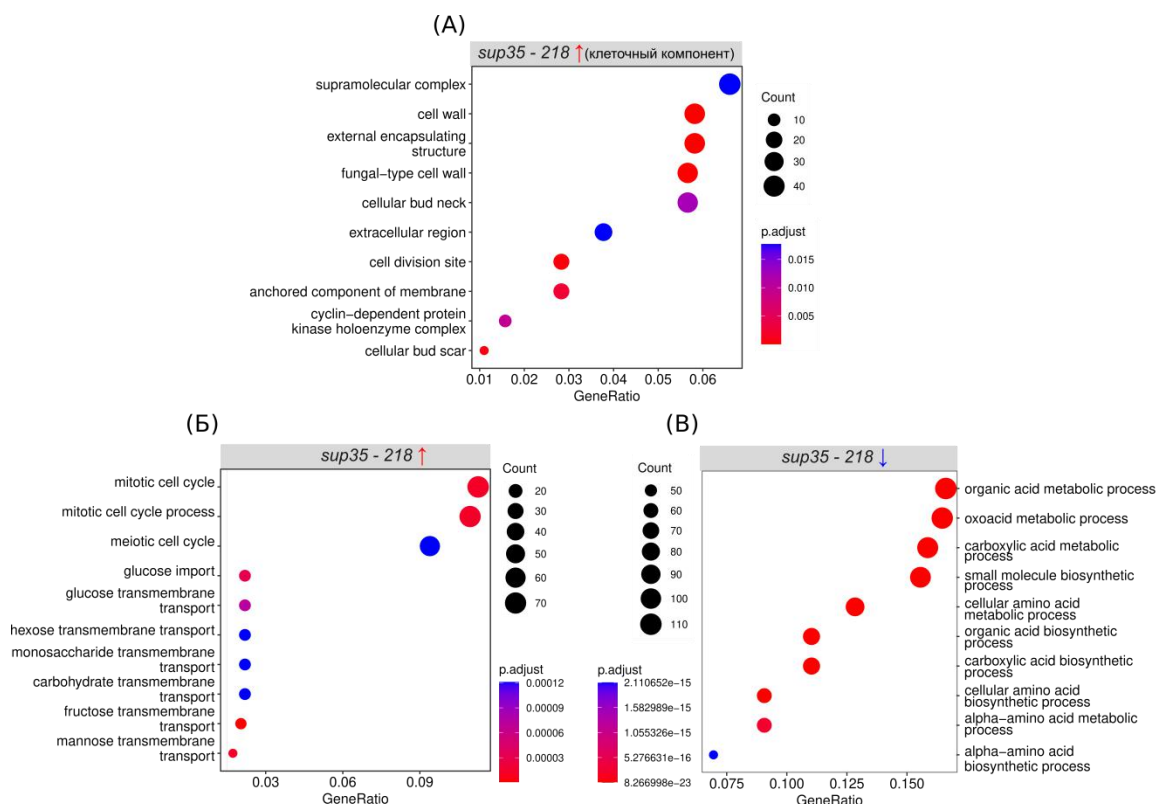


Рисунок 10. Анализ обогащения дифференциально экспрессированных генов по терминам Gene Ontology, произведенный при помощи пакета ClusterProfiler. Размер точки пропорционален соотношению обогащения, а цветовой градиент отображает скорректированный уровень значимости. А) Повышенная экспрессия *sup35-218* (клеточный компонент) Б) Повышенная экспрессия *sup35-218* (биологические процессы) В) Сниженная экспрессия *sup35-218* (биологические процессы).

Для более подробного изучения влияния генов с повышенной экспрессией на клеточный цикл была использована Киотская энциклопедия генов и геномов (<https://www.genome.jp/kegg/kegg2.html>). Энциклопедия метаболических путей KEGG PATHWAY позволяет визуализировать положение и взаимодействие изучаемых генов в схеме конкретного процесса. Мы воспользовались этим методом для того, чтобы проанализировать, какие именно гены, отвечающие за регуляцию клеточного цикла, характеризуются измененной экспрессией у клеток, несущих мутантную аллель *sup35-218*. Было обнаружено, что у клеток дрожжей в присутствии аллели *sup35-218* (рис. 11А) наибольшее число белков, кодируемых генами с повышенной экспрессией, наблюдалось в стадиях G1, S и G2. В первую очередь мы отметили увеличение уровней транскрипции важнейшего регулятора клеточного цикла *CDC28*, кофактора транскрипции *SWI6* и участвующих в репликации ДНК *MCM2* и *ORC2*. Помимо этого была выявлена повышенная экспрессия генов, кодирующих циклины семейства CLN, CLB и субъединицы когезинового комплекса *SMC3* и *MCD1*. В целом, на фоне увеличения экспрессии генов, преимущественно вовлеченных в синтез ДНК,

было отмечено снижение транскрипции генов, участвующих в метафазно-анафазном переходе (*CDC23*, *APC9*), а также изменения в активности когезинов и конденсинов. Интересно, что несмотря на низкое качество полученных данных в клетках, несущих аллель *sup45-105*, также была обнаружена увеличенная экспрессия циклина (*CLB4*), субъединицы когезинового комплекса (*IRR1*) и гена *MOB1*, вовлеченного в цитокинез. Также экспрессия гена *CDC23* - одного из основных компонентов комплекса, стимулирующего анафазу, была снижена как в случае *sup45-105*, так и в случае присутствия в клетках аллели *sup35-218*.

На основе вышеописанных результатов нами была выдвинута гипотеза замедления клеточного цикла. Предположительно, в результате замещения аллелей дикого типа на мутантные аллели генов факторов терминации трансляции *sup45-n* или *sup35-n* происходят нарушения в синтезе белков, нормальном течении клеточного цикла и деления.

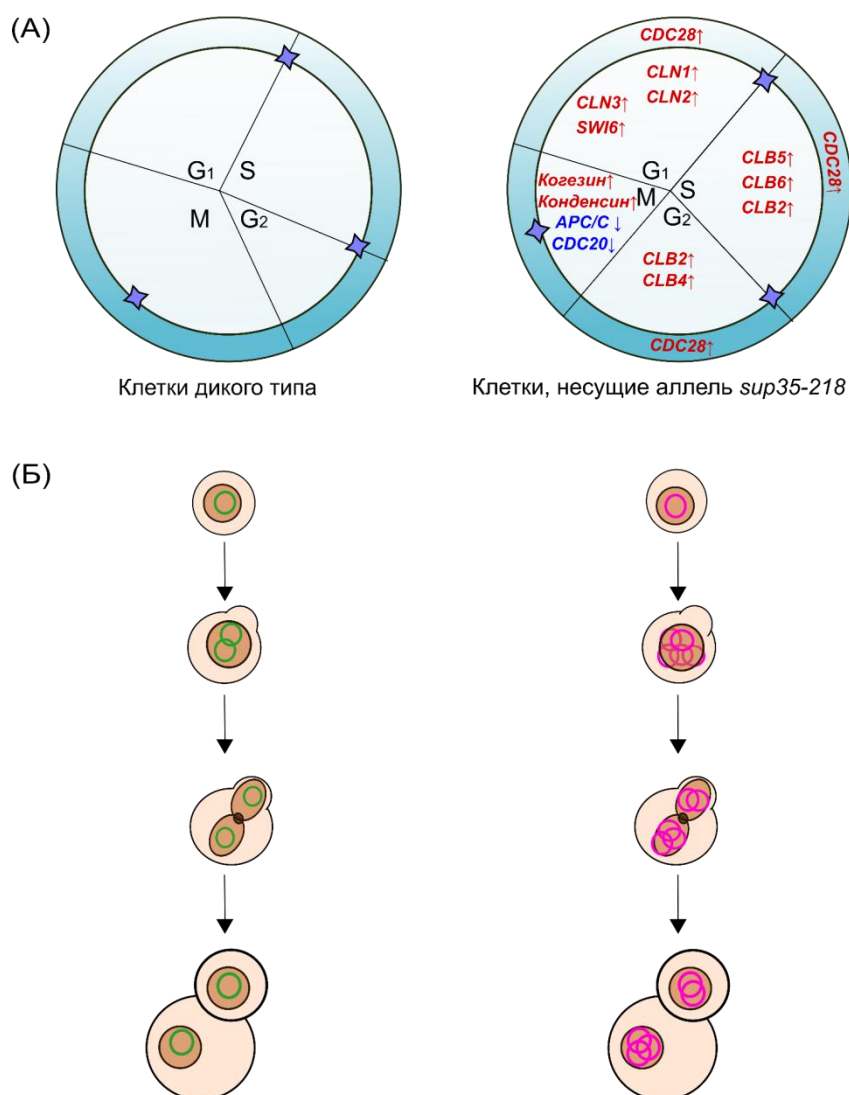


Рисунок 11. Изменения в клеточном цикле у клеток, несущих мутацию *sup35-218*. А. Предположительные изменения в протекании фаз клеточного цикла в клетках, несущих аллель *sup35-218* (справа) по сравнению с клетками несущими аллель *SUP35* (слева). Фиолетовыми звездочками отмечены контрольные точки в регуляции клеточного цикла. Гены с повышенной экспрессией изображены красным цветом и отмечены стрелкой вверх, гены со

сниженной экспрессией изображены синим и отмечены стрелкой вниз. Б. Схема изменений, происходящих репликации и сегрегации плазмид в клетках несущих аллель *sup35-218* (справа) по сравнению с клетками несущими аллель *SUP35* (слева).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты данной работы демонстрируют, что адаптация клеток к нонсенс-мутациям в генах, кодирующих факторы терминации трансляции, осуществляется за счет амплификации мутантной аллели, расположенной на центромерной плазмиде (рис. 11Б) или на хромосоме (рис. 7,8). Мы наблюдали увеличение экспрессии циклинов (на стадиях G1, S и G2), регулируемых транскрипционно и снижение экспрессии компонентов комплекса, стимулирующего анафазу. С учетом имеющихся литературных данных, обнаруженные изменения позволяют выдвинуть предположение о том, что амплификация, вероятно, возникает за счет замедления клеточного цикла, дефектов и задержки в синтетической фазе, что позволяет интенсивно реплицировать плазмиды и накапливать различные белки. Наблюдаемое в клетках увеличение числа копий мтДНК, вероятно, является побочным явлением, связанным с нарушением клеточного цикла. В то же время, нарушения в работе факторов терминации приводят к избытку аминокислот в связи с дефектами в процессах синтеза белков, что, в свою очередь, по принципу обратной связи ведет к снижению экспрессии генов, отвечающих за биосинтез аминокислот. Эти процессы могут также влиять на задержку перехода к делению, что позволяет клетке накопить достаточное количество плазмид с мутантной аллелью *sup45-n* или *sup35-n*. Согласно нашей гипотезе снижение эффективности работы комплекса APC/C и Cdc20 в свою очередь приводит к нарушениям в расхождении хромосом и сегрегации плазмид. Интересно, что в статьях последних лет продемонстрированы свидетельства того, что замедление клеточного цикла, в частности задержка при переходе G2/M может стабилизировать геном (Vinton and Weinert, 2017). В данной работе у изучаемых штаммов мы обнаруживаем геномную нестабильность, что возможно свидетельствует о нарушении протекания или укорочении G2-M фаз. В результате вышеописанных изменений, возникают клетки, у которых увеличено число копий мутантной аллели *sup45-n* или *sup35-n*, что позволяет им эффективнее поддерживать “оптимальный” для данной аллели уровень нонсенс-супрессии, что повышает их жизнеспособность и дает селективное преимущество.

ВЫВОДЫ

1. Секвенирование и сборка геномов штаммов U-1A-D1628, 74-D694, а также сравнение их с референсным штаммом S288C показало, что качество полученных сборок позволяет использовать их для дальнейшего изучения феномена жизнеспособных нонсенс-мутантов по генам *SUP45* и *SUP35*.
2. Впервые обнаружено, что основным механизмом адаптации дрожжевых штаммов, имеющих делецию генов *SUP45* или *SUP35* и центромерную плазмиду, несущую нонсенс-аллель соответствующего гена, служит увеличение числа копий данных плазмид.
3. Увеличение числа копий плазмид, несущих мутантные аллели *sup45-105* или *sup35-218*, приводит к увеличению количества мутантных мРНК, кодируемых генами *SUP45* или *SUP35*, соответственно.
4. Присутствие нонсенс-мутаций в генах *SUP45* и *SUP35* в изучаемых штаммах приводит к увеличению числа копий мтДНК.
5. Присутствие мутантных аллелей в геноме большинства изученных штаммов в качестве единственной хромосомной копии *SUP45* или *SUP35* приводит к хромосомным перестройкам. Для мутаций *sup45-104*, *sup45-105*, *sup45-107* выявлена дисомия хромосомы II, для мутации *sup35-218* - дупликация участка хромосомы IV, что в итоге приводит к увеличению числа копий мутантного гена. В случае мутаций *sup35-203*, *sup35-240*, *sup35-244* и *sup35-260* обнаружены перестройки в хромосомах, которые не содержат ген *SUP35*.
6. Присутствие в клетках дрожжей нонсенс-мутаций как в гене *SUP45*, так и *SUP35* приводит к увеличению экспрессии генов семейств циклинов и снижению экспрессии генов, кодирующих белки в составе комплекса APC/C, которые являются ключевыми компонентами, обеспечивающими нормальное протекание клеточного цикла. Выдвинута гипотеза, согласно которой, адаптация дрожжей к мутациям в жизненно важных генах факторов терминации трансляции, вероятно, обусловлена замедлением клеточного цикла и перехода к делению.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ:

Статьи в журналах рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ

- 1) Barbitoff Y.A, Matveenko A.G, Matiiv A.B, Maksiutenko E.M, Moskalenko S.E, Drozdova P.B, Polev D.E, Beliavskaia A.Y, Danilov L.G, Predeus A.V, Zhouravleva G.A. Chromosome-level genome assembly and structural variant analysis of two laboratory yeast strains from the Peterhof Genetic Collection lineage. // G3 (Bethesda). – 2021 – Vol. 11. – № 2 – P. 715–720.
- 2) Maksiutenko, E.M.; Barbitoff, Y.A.; Matveenko, A.G.; Moskalenko, S.E.; Zhouravleva, G.A. Gene Amplification as a Mechanism of Yeast Adaptation to Nonsense Mutations in Release Factor Genes. // Genes – 2021 – Vol. 12.–№ 12:2019