

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ

ИНСТИТУТ ОБЩЕЙ ГЕНЕТИКИ им. Н.И. ВАВИЛОВА

РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи

Максютенко Евгения Михайловна

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

1.5.7 генетика

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Руководитель: к.б.н, с.н.с.

Москаленко Светлана Евгеньевна

Москва

2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ	5
Актуальность темы исследования	5
Степень разработанности темы	5
Научная новизна	6
Теоретическая и практическая значимость работы	7
Методология и методы исследования	7
Вклад автора	8
Основные положения, выносимые на защиту	8
Степень достоверности и апробация результатов	8
Апробация работы	9
Публикации по теме исследования	9
Объем и структура работы	9
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	10
1.1 ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ ГЕНОМА ДРОЖЖЕЙ	10
1.1.1 Отдельные представители дрожжей и их роль в экологии и жизни человека	10
1.1.2 Изучение генома дрожжей	11
1.1.3 Основные черты эволюции дрожжевого генома	14
1.1.4 Адаптивная роль структурных изменений в геноме дрожжей.	16
1.1.4.1 Хромосомные перестройки и анеуплоидии	16
1.1.4.2 Амплификация генов	18
1.1.4.3 Нарушение сегрегации плазмид	19
1.1.4.4 Изменение числа копий митохондриальной ДНК	21
1.2 ТЕРМИНАЦИЯ ТРАНСЛЯЦИИ И ЕЕ ОСОБЕННОСТИ У ДРОЖЖЕЙ	24
<i>S. CEREVISIAE</i>	24
1.2.1 Рибосома как ключевой компонент трансляционного аппарата клетки	24
1.2.2 Общая схема трансляции	26
1.2.3 Факторы терминации трансляции, структура, механизмы функционирования, особенности	26
1.2.3.1 Структура и функции факторов терминации у прокариот	27
1.2.3.2 Механизм функционирования прокариотических факторов терминации трансляции	29
1.2.3.3 Структура и функции факторов терминации у эукариот	30
1.2.3.4 Механизм функционирования эукариотических факторов терминации трансляции	33
1.2.3.5 Особенности структуры и функций факторов терминации трансляции у дрожжей <i>S. cerevisiae</i>	37
1.2.3.6 Специфика взаимодействия факторов терминации трансляции у дрожжей с другими белками	39
1.2.3.7 Мутанты по генам <i>SUP45</i> и <i>SUP35</i> , кодирующим факторы терминации трансляции, как модель для изучения вариабельности генома дрожжей	41
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	45

2.1. Штаммы микроорганизмов.	45
2.2. Среды и условия культивирования	47
2.3. Плазмиды	47
2.4. Генетические и микробиологические методы	48
2.5. Анализ инвазивного роста	49
2.6. Молекулярно-биологические методы	49
2.6.1. Праймеры, использованные в работе	49
2.6.2. ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ)	51
2.6.3. Выделение геномной ДНК из клеток дрожжей с помощью смеси фенола и хлороформа	52
2.6.4. Полногеномное секвенирование	53
2.6.5. Выделение РНК из клеток и получение кДНК	55
2.6.6. Секвенирование транскриптома (RNA-seq)	55
2.7. Биоинформатический анализ данных	56
2.7.1. Сборка геномов штаммов U-1A-D1628 и 74-D694	56
2.7.2. Анализ генетических различий в штаммах, несущих различные аллели <i>sup45-n</i> или <i>sup35-n</i>	56
2.7.3. Анализ дифференциальной экспрессии генов	57
3. РЕЗУЛЬТАТЫ	59
3.1. Сборка геномов штаммов U-1A-D1628 и 74-D694	59
3.2. Сравнительный анализ генома штамма U-1A-D1628, 74-D694 и референсного штамма дрожжей S288C	62
3.3. Анализ однонуклеотидных вариаций в клетках, несущих мутантные аллели <i>sup45-n</i> и <i>sup35-n</i>	68
3.4. Оценка изменений копийности плазмид, несущих мутантные аллели <i>sup45-n</i> и <i>sup35-n</i>	71
3.5. Количественный анализ митохондриальной ДНК у нонсенс-мутантов <i>sup45-n</i> и <i>sup35-n</i> дрожжей <i>S. cerevisiae</i>	80
3.6. Анализ генетических факторов, способствующих выживанию клеток дрожжей, несущих мутантные аллели <i>sup45-n</i> и <i>sup35-n</i> в качестве единственной хромосомной копии <i>SUP45</i> или <i>SUP35</i>	83
3.7. Анализ ответа дрожжевых клеток на присутствие мутантных аллелей <i>sup45-n</i> и <i>sup35-n</i> на уровне транскриптома	86
4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ	99
4.1. Адаптивная роль амплификации генов факторов терминации трансляции	99
4.2. Адаптивная роль изменений генома, не затрагивающих гены <i>SUP45</i> и <i>SUP35</i> .	102
4.3. Потенциальные механизмы возникновения адаптивных изменений числа копий генов <i>SUP45</i> и <i>SUP35</i>	104
5. ВЫВОДЫ:	111
6. СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	112
БЛАГОДАРНОСТИ	132

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ПТЦ - пептидил трансферазный центр

ONT - Oxford Nanopore Technology

мтДНК - митохондриальная ДНК

ORF - открытая рамка считывания

ПД - полногеномные дубликации

CNV - (от англ. Copy Number Variation) вариация числа копий

SNP - (от англ. Single Nucleotide Polymorphism), однонуклеотидные вариации

ПГК - Петергофская генетическая коллекция

DDR - (от англ. DNA Damage Response), постоянный ответ на повреждение ДНК

RNR - комплекс рибонуклеотид редуктазы

aa-тРНК - аминоксил-тРНК

ПТЦ - пептидилтрансферазный центр

крио-ЭМ - криоэлектронная микроскопия

RF/eRF - (Release Factor/eukariotic Release фактор) - фактор терминации трансляции/эукариотический фактор терминации трансляции

ФОК - фторооротовая кислота

ДЭГ - дифференциально экспрессируемые гены

dNTP - дезоксинуклеотиды

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

В настоящее время медицина тесно связана с достижениями биологии и смежных с ней областях знаний. Одним из важных направлений современной генетики является изучение причин и механизмов наследственных заболеваний человека. На сегодняшний день известно, что около трети наследственных болезней (например, мышечная дистрофия Дюшенна, цистозифброз, мукополисахаридоз 1 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 *SUP45* и *SUP35*.

Степень разработанности темы

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.

Целью работы явилось 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

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 числа копий 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.

Теоретическая и практическая значимость работы

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, аминогликозидов 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.

Методология и методы исследования

В данной работе использована комбинация классических микробиологических, генетических и молекулярно-биологических методов, а также к биоинформатический и статистический анализ данных.

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.

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.

Степень достоверности и апробация результатов

Основные результаты диссертационной работы были доложены и обсуждены на 5 российских и международных конференциях и опубликованы в 2 статьях в рецензируемых научных изданиях.

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), Пущинская школа-конференция молодых учёных с Международным участием "Биология - наука XXI века" (Россия, Пущино, 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

- 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

Объем и структура работы

Диссертация состоит из введения, пяти глав. Полный объём диссертации составляет 132 страницы с 38 рисунками и 9 таблицами. Список литературы содержит 257 наименований.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ ГЕНОМА ДРОЖЖЕЙ

1.1.1 Отдельные представители дрожжей и их роль в экологии и жизни человека

Дрожжи — одноклеточные представители царства грибов, повсеместно распространенные в биосфере. Они способны осваивать широкий спектр экологических ниш, используя разнообразные субстраты и могут быть как мутуалистами, так и паразитами и другими симбионтами [Tsai, 2022]. Эти организмы играют разнообразные и важные роли в экосистемах: участвуют в разложении органического вещества, образовании биомассы, минерализации питательных веществ, круговороте азота и серы, а также служат источником питательных веществ для других организмов [Segal-Kischinevzky et al., 2022]. Многочисленные полезные свойства дрожжей на протяжении многих веков использовались человеком в производстве ферментированных напитков (пиво, вино) и различных продуктов питания, таких как хлеб [Aouizerat et al., 2019].

Наибольшее количество научных исследований сосредоточено на модельном организме - пекарских дрожжах *Saccharomyces cerevisiae*. Это один из наиболее широко используемых микроорганизмов для изучения эукариотической функциональной геномики, метаболических путей, старения, исследования белковых взаимодействий, а также в качестве биопродукторов широкого спектра химических веществ. В природе *S. cerevisiae* можно обнаружить повсеместно, например в лесах, тропиках и садах, на поверхности фруктов, а также некоторых насекомых [Liti, 2015; Wang et al., 2012]. Биотехнологии дрожжи успешно применяются в биохимическом производстве большого количества продуктов, таких как этанол, органические кислоты, аминокислоты, ферменты и белки, используемые в терапии различных заболеваний [Nandy, Srivastava, 2018]. Ближайший родственник *S. cerevisiae* - *Saccharomyces paradoxus*, преимущественно обитает в дикой природе, а предки большинства штаммов были обнаружены на деревьях рода *Quercus*. Штаммы *S. paradoxus* из разных географических субпопуляций генетически хорошо дифференцированы благодаря частичной репродуктивной изоляции, в связи с чем этот вид является удачной моделью

для филогенетических исследований, изучения экологии и эволюционной биологии [Replansky et al., 2008]. Среди иного широко известного рода *Candida* присутствуют одни из немногих видов дрожжей, способных вызывать заболевания у людей. Так, *Candida albicans* (наряду с *Candida glabrata*) является вторым по частоте возбудителем грибковых инфекций, а *Candida auris* является возбудителем с множественной лекарственной устойчивостью [Rhodes, Fisher, 2019].

Обширное природное разнообразие дрожжей, широкий спектр их возможного применения, а также проникновение в различные области жизни человека привели к расширению исследований в области биогеографии, экологии, жизненных циклов и геномов этих организмов [Tsai, 2022].

1.1.2 Изучение генома дрожжей

Пекарские дрожжи *S. cerevisiae* стали объектом генетиков в середине XX века, намного позже *Drosophila melanogaster*, *Neurospora crassa* и растений. Количество и размеры их хромосом долгое время оставались неизвестными, поскольку последние были едва различимы под микроскопом. В первоначальных исследованиях в области генетики дрожжей основную роль сыграло изучение полового размножения, получение мутантов и составление генетических карт дрожжевых хромосом. Впервые описание полового процесса у дрожжей было выполнено Ойвиндом Винге из лаборатории Карлсберг в Копенгагене в результате наблюдения за процессом копуляции клеток и формированием новых гибридов. Используя данный подход, он показал, что некоторые виды *Saccharomyces* способны чередовать гаплоидную и диплоидную фазы [Szybalski, 2001]. В то же время в США Карл и Гертруда Линдегрэн начали работу по картированию дрожжевых хромосом. К 1959 году была опубликована первая карта, содержащая 9 хромосомных плеч *S. cerevisiae* [Lindgren et al., 1959], а к 1964 году было идентифицировано уже 12 хромосом [Hwang et al., 1964]. В дальнейшем в период с 1960 по 1995 год Роберт Мортимер из Калифорнийского университета продолжил изучение генома дрожжей, используя различные модификации тетрадного анализа. Данный метод основан на одновременном изучении генотипов всех четырёх гаплоидных продуктов мейоза отдельной диплоидной клетки. Он опубликовал двенадцать обновлений генетической карты для штамма дрожжей S288C, в том числе используя данные, полученные “дрожжевым” сообществом по всему миру [Dujon, 2015; Szymanski et al., 2019].

В 90х годах началась программа секвенирования генома дрожжей. Поскольку дрожжи имеют небольшие геномы, именно они находились в авангарде омиксных исследований и разработок новых методов. Так, при помощи метода секвенирования первого поколения - секвенирования по Сэнгеру, к 1996 году международным консорциумом исследователей, работавших в 94 лабораториях из 19 стран, была определена последовательность всех 16 хромосом генома *S. cerevisiae* [Goffeau et al., 1996]. Этот геном стал первым полностью законченным эукариотическим геномом, а позже именно дрожжи стали первым эукариотическим организмом, чей геном был секвенирован в популяционном масштабе — штаммы были изолированы с самых разных субстратов и географических областей [Liti et al., 2009]. Возникновение технологий высокопроизводительного секвенирования ДНК (технологии второго поколения), таких как Illumina, позволяли секвенировать геном с относительно высокой скоростью и точностью за счет коротких прочтений (50-300 нуклеотидов), совмещая это с невысокой стоимостью. При помощи этих методов сравнивали геномы почти всего подотдела *Saccharomycotina*, а также создавали новые и скорректированные эталоны полных геномов [Macías et al., 2019; Peter et al., 2018; Shen et al., 2018]. Появившиеся чуть позже технологии секвенирования третьего поколения от Pacific Biosciences и Oxford Nanopore (ONT) за счет длинных прочтений (более 10000 нуклеотидов) обеспечили возможность сборки хромосом без значительных пробелов, с правильно разрешенными сложными участками, что было особенно важно при характеристике крупномасштабных структурных вариантов [Chen et al., 2022; Istace et al., 2017; Yue et al., 2017].

На сегодняшний день известно, что геном гаплоидного лабораторного эталонного штамма (S288C), *S. cerevisiae*, состоит из 16 линейных хромосом, размер которых варьирует от 200 до 2000 тысяч пар нуклеотидов (т.п.н). Общий размер генома составляет 12 миллионов пар оснований. Помимо хромосомной ДНК, дрожжи содержат 85 т.п.н. митохондриальной ДНК (мтДНК), она состоит в основном из некодирующей АТ-богатой последовательности и организована либо в виде кольцевых мономеров, либо в виде тандемно-повторяющихся линейных структур «голова к хвосту». МтДНК *S. cerevisiae* содержит восемь генов, кодирующих три субъединицы комплекса АТФ-синтазы (*ATP6*, *ATP8*, *ATP9/OL11*), апоцитохром Б (*COB*), три субъединицы комплекса цитохром-С-оксидазы (*COX1—3*) и рибосомный белок (*VARI/RPS3*). В дополнение к восьми каноническим белок-кодирующим генам,

митохондриальный геном *S. cerevisiae* содержит дополнительные функциональные элементы, которые включают две рибосомные РНК (*rnl* и *rns*), 24 тРНК и несколько репликативно-подобных ориджинов [De Chiara et al., 2022]. Также в геноме дрожжей могут присутствовать эписомальные плазмиды размером 6,3 т.п.н. — 2-мкм плазмиды, которые являются наиболее изученным представителем семейства автономно реплицирующихся кольцевых ДНК-плазмид. Стоит отметить, что 2-мкм плазида наследуется с эффективностью, близкой к хромосомной, в то время как ее присутствие не дает очевидных преимуществ дрожжевому хозяину. Сохранение 2-мкм плазмиды объясняется комбинированным действием механизмов деления плазмиды и контроля количества копий [Chan et al., 2013; McQuaid et al., 2017].

У референсного штамма S288C было идентифицировано 6604 открытых рамок считывания (ORF), 79% из них верифицированы, 11% не охарактеризованы и 10% расценены как сомнительные. 1786 ORF все еще аннотированы как кодирующие белки с неизвестными функциями. По оценкам ученых, не менее 31% генов дрожжей имеют гомологов в геноме человека. В геноме дрожжей присутствуют 428 генов РНК: 299 тРНК, 77 малых ядрышковых, 27 рРНК, 18 некодирующих РНК, 6 малых ядерных РНК и одна теломеразная РНК [Belda et al., 2019].

Гаплоидный геном *S. paradoxus* также состоит из 16 линейных хромосом, длина генома составляет примерно 12 миллионов пар оснований, общее число идентифицированных генов около 6,5 тысяч. Геном высоко консервативен, кодирующие области на 90% идентичны *S. cerevisiae*, а межгенные - на 80%. Однако, межвидовые гибриды между *S. paradoxus* и *S. cerevisiae* почти полностью стерильны, за редким исключением, поэтому эти виды все чаще используются как для проверки обобщенных экологических и эволюционных гипотез, так и для понимания процессов видообразования. Хотя было секвенировано и собрано большое количество ядерных геномов *S. paradoxus*, данные, касающиеся митохондриального генома фрагментированы, и получены из разных штаммов. Размер мтДНК оценивается в 67 т.п.н., а последовательности известны только для генов, участвующих в синтезе белка, для генов *COX1* и *COB*, кодирующих субъединицу цитохромоксидазы I и цитохром B соответственно, а также для *ATP8* и *ATP9* [Procházka et al., 2012].

1.1.3 Основные черты эволюции дрожжевого генома

С появлением высокопроизводительных технологий секвенирования полное описание генетической изменчивости, происходящей в популяциях, стало потенциально реализуемой задачей. Ландшафт генетической изменчивости формируется множеством эволюционных процессов, включая мутации, дрейф генов, рекомбинацию, поток генов, естественный отбор. Поскольку экологические ниши и эволюционная история *S. cerevisiae* были тесно связаны с деятельностью человека, а многие штаммы были непосредственно получены с пивоваренных заводов, пекарен и даже клинических пациентов, этот большой диапазон схем отбора может существенно влиять на эволюцию генома *S. cerevisiae*. Использование дрожжей в широком спектре областей способствовало смешению и скрещиванию штаммов *S. cerevisiae* из разных географических мест и экологических ниш, что привело к появлению многих мозаичных штаммов со смешанным генетическим фоном. Для *S. paradoxus*, в отличие от большинства других видов *Saccharomyces*, напротив, нет никаких доказательств того, что они были одомашнены людьми. Их биогеография отмечена естественными процессами, такими как ограниченная миграция [Нума, Fay, 2013], периоды обледенения [Charron et al., 2014] и адаптация к изменениям климата [Leducq et al., 2014]. Выделено не менее четырех генетически и фенотипически различных популяций *S. paradoxus*, соответствующих основным географическим регионам: Европа (включая Западную Сибирь), Дальневосточная Азия (Япония, Восточная Сибирь), Северная Америка (восточное и западное побережья Северной Америки) и Северо-Восточная Америка [Нума, Fay, 2013; Leducq et al., 2014; Liti et al., 2009].

В контексте эволюции геномов дрожжей нельзя не упомянуть про такое явление, как полногеномные дупликации (ПД) — редкие эволюционные события с глубокими последствиями. Они удваивают генетический состав организма, мгновенно создавая репродуктивный барьер между ним и его предками и предоставляя основу для расхождения функций генов между паралогами. Почти все последовательности эукариотического генома несут свидетельства существования древних ПД, но причины этих событий и время промежуточных этапов определить трудно. Одна из наиболее охарактеризованных ПД произошла в линии, ведущей к пекарским дрожжам *S. cerevisiae*. Также было показано, что вместо простого удвоения ДНК одного предка, полногеномная дупликация у дрожжей, вероятно, включала спаривание между двумя

разными предковыми видами с последующим удвоением генома для восстановления фертильности [Wolfe, 2015].

В целом, совместное действие разных наборов эволюционных факторов может повлечь за собой возникновение различных эффектов как в пределах одного генома, так и между видами, что приводит к различным моделям эволюционной динамики. Тем не менее, одно из недавних исследований выявило основные тенденции в эволюции генома штаммов лабораторных дрожжей *S. cerevisiae*, а именно: (1) быстрое накопление несбалансированных структурных перестроек, таких как новые вставки, делеции и дубликации (в отличие от сбалансированных инверсий, реципрокных транслокаций и транспозиций у диких дрожжей *S. paradoxus*); (2) быстрая перетасовка эктопических (находящихся вблизи концов хромосом) хромосомных последовательностей; и, как следствие, (3) более быстрая (по сравнению с *S. paradoxus*) молекулярная эволюция в субтеломерных областях [Yue et al., 2017]. Учитывая, что субтеломерные гены очень богаты функциями, опосредующими взаимодействие с внешней средой (например, реакция на стресс, поглощение питательных веществ и транспорт ионов) заманчиво предположить, что ускоренная эволюция субтеломерных областей отражает отбор на способность эволюционировать, т.е. реагировать и адаптироваться к изменяющимся условиям [Kirschner, Gerhart, 1998].

В работе Питера и соавторов в 2018 году была собрана коллекция из 1011 изолятов *S. cerevisiae*, с максимально расширенным экологическим и географическим происхождением. Всего в этих геномах было обнаружено 1 625 809 однонуклеотидных вариаций (SNP), 125 701 коротких вставок и делеций (до 50 п.н.). Практически для всех открытых рамок считывания был обнаружен, по крайней мере, один штамм с вариацией числа копий (CNV). Варианты со значительным изменением числа копий затрагивали лишь небольшую часть открытых рамок считывания, а крайние случаи (> 20 копий) включали в себя 2-мкм плазмидные ORF, митохондриальный геном и рибосомную ДНК. Это исследование дало важную информацию о преобладании различных типов структурных вариантов в диких штаммах *S. cerevisiae*, включая широко распространенную потерю гетерозиготности, а также критическую роль CNV в фенотипическом разнообразии [Peter et al., 2018].

Особый интерес представляют паттерны эволюции в отдельных генетических коллекциях дрожжей. Одна из таких коллекций была сформирована в России в 1972

году на базе лаборатории физиологической генетики Санкт-Петербургского государственного университета (бывшего ЛГУ). На данный момент в этой коллекции представлено более 300 штаммов пекарских дрожжей *S. cerevisiae* разнообразие которых, позволяет изучать аппарат терминации трансляции, клеточный цикл, а также применять их в биотехнологии и генетической токсикологии [Самсонова и др., 1994; Andrianova et al., 2003]. Это большой лабораторный фонд штаммов *S. cerevisiae*, которые были изолированы независимо от эталонных линий S288C, хотя некоторые штаммы ПГК были скрещены со штаммами линии S288C несколько раз при получении штаммов коллекции. Полногеномное секвенирование нескольких основных штаммов ПГК с использованием технологий секвенирования второго поколения позволило получить новое представление о разнообразии геномов коллекции, включая анализ анеуплоидий, а также идентификацию функционально значимых мутаций в генах, связанных с флокуляцией (обратимой агрегацией или агглютинацией дрожжевых клеток) [Drozdova et al., 2016a]. Однако, поскольку секвенирование было реализовано с использованием технологии на основе коротких прочтений, сведений о структурных вариантах и хромосомных перестройках у штаммов ПГК не было получено.

Можно предположить, что с увеличением количества последовательностей геномов в базе данных и дальнейшим совершенствованием молекулярно-генетических методов, дрожжи, вероятно, будут играть важнейшую роль в анализе взаимосвязей между генотипом и фенотипом в условиях изменяющейся окружающей среды. Уже сейчас большой интерес для исследователей представляет феномен адаптации дрожжей к различным условиям среды, в особенности генетические механизмы такой адаптации.

1.1.4 Адаптивная роль структурных изменений в геноме дрожжей.

1.1.4.1 Хромосомные перестройки и анеуплоидии

Еще более 40 лет назад Сусуму Оно предположил, что дупликация генов может являться движущей силой возникновения новых функций генов за счет ослабления контроля над последовательностью и эволюцией одной или даже обеих копий генов [Ohno, 1970]. Геномная эра в значительной степени подтвердила эту гипотезу, и во многих исследованиях охарактеризованы результаты полной и частичной амплификации генома [Jaillon et al., 2009]. Непосредственные последствия дупликаций проявляются в увеличении экспрессии затронутых генов, а в некоторых случаях

повышенная экспрессия может также обеспечивать преимущество в определенных условиях (например устойчивость к инсектицидам, антибиотикам) [Chang et al., 2013; Nose et al., 2015].

Существует также предположение, что анеуплоидия — это быстрый путь к фенотипической эволюции. Однако у сложных многоклеточных организмов довольно часто анеуплоидия сопровождается аномалиями развития и снижением жизнеспособности. Наиболее известный пример такого случая — синдром Дауна у человека [Antonarakis et al., 2004]. В тоже время, для одноклеточных эукариот в условиях крайне неблагоприятных для эуплоидных клеток, именно анеуплоидные варианты часто обладают большим потенциалом адаптации, приобретая необходимые качества за счет фенотипических изменений, вызванных изменениями числа копий хромосом [Pavelka et al., 2010].

Крупномасштабные изменения, связанные с удвоением хромосом, такие как транслокации или анеуплоидии, наблюдали во время краткосрочных эволюционных экспериментов в популяциях дрожжей [Dhar et al., 2011; Gresham et al., 2010]. Например, в исследовании восьми штаммов дрожжей *S. cerevisiae*, выделенных после 100–500 поколений роста в хемостатах с ограниченным содержанием глюкозы, три эволюционировавших штамма имели амплификацию в области IV хромосомы, которая включала участок, кодирующий высокоаффинный переносчик гексоз [Dunham et al., 2002]. Помимо изменений, наблюдаемых в экспериментальных популяциях, высокий уровень полиморфизма длины хромосом был выявлен и у винных дрожжей. Этот полиморфизм преимущественно возникал за счет незаконной рекомбинации, опосредованной транспозонами *Tu* или субтеломерными повторяющимися последовательностями. Обнаружено, что аллель *SSUI-R*, придающая дрожжевым клеткам устойчивость к сульфиту, является продуктом реципрокной транслокации между хромосомами VIII и XVI за счет неравного кроссинговера, опосредованного микрогомологией между очень короткими последовательностями на 5'-концах генов *SSUI* и *ECM34*. Также показано, что эта транслокация присутствует только у штаммов винных дрожжей, что предположительно является следствием роли сульфитов в качестве консерванта в виноделии на протяжении тысячелетий. Это первый случай, когда было зафиксировано, что большие хромосомные перестройки участвуют в адаптивной эволюции *S. cerevisiae* [Pérez-Ortín et al., 2002].

В случае других видов дрожжей, таких как клинические изоляты патогенных

Candida spp., крупномасштабные хромосомные перестройки также играют важную роль в развитии устойчивости к лекарственным препаратам. Например, анеуплоидия и образование изохромосом увеличивает количество копий и экспрессию критических генов устойчивости к флуконазолу у *Candida* [Selmecki et al., 2008; Selmecki et al., 2006]. В другой работе, с родственным организмом *Candida glabrata*, возникновение сегментных дупликаций и образование новых хромосом также было коррелировало с устойчивостью к флуконазолу [Poláková et al., 2009]. В совокупности все эти исследования показывают, что крупномасштабные изменения позволяют дрожжам быстро адаптироваться к изменяющимся условиям.

1.1.4.2 Амплификация генов

Известно, что изменение числа копий гена может вызвать значительные фенотипические последствия. Амплификация гена — процесс, в результате которого число копий гена (или геномной области) увеличивается в два или более раз. Это явление может быть как частью нормальных процессов развития, таких как амплификация гена хориона во время оогенеза у *Drosophila melanogaster* [Claycomb et al., 2004], так и реакцией организма на стрессовое воздействие, вызванное голоданием или снижением уровня продукта гена [Hastings et al., 2004].

В работе связанной с исследованием гистонов H2A-H2B у *S. cerevisiae* [Libuda, Winston, 2006], было выявлено, что в случае делеции локуса *HTA1-HTB1* происходит амплификация второго локуса — *HTA2-HTB2*, как части небольшой кольцевой хромосомы. Предположительно, это событие происходило в ответ на одно из двух взаимосвязанных изменений: пауза/замедление вилок репликации ДНК или снижение транскрипции гистонов H3-H4. В рамках генетического скрининга для выявления мутаций, которые изменяют частоту возникновения амплификации *HTA2-HTB2*, было идентифицировано несколько генов, кодирующих факторы, участвующие в репликации ДНК. Мутации в этих генах приводили к задержке в работе вилки репликации. Это было подтверждено данными, полученными в результате обработки штаммов дрожжей гидроксимочевинной (химическим веществом, замедляющим репликацию ДНК). Это воздействие также стимулировало амплификацию *HTA2-HTB2*. Таким образом, было доказано, что амплификация *HTA2-HTB2* является частью клеточного ответа, который возникает в результате изменений в условиях окружающей среды, нарушении репликации хроматина и правильной стехиометрии гистонов. К тому же эффекту

приводила делеция локуса *HHT2-HHF2* (гистона H3-H4), в этом случае тоже происходила амплификация генов, кодирующих гистоны *HTA2-HTB2* [Libuda, Winston, 2010].

1.1.4.3 Нарушение сегрегации плазмид

Репликация и сегрегация хромосомной ДНК жестко регулируется белками, участвующими в клеточном цикле, и ошибки в данных процессах могут иметь катастрофические последствия для жизнеспособности клеток. Однако число копий плазмидной ДНК часто можно регулировать без подобных эффектов. В лабораторных условиях для работы с *S. cerevisiae* обычно используют два типа плазмид: плазмиды, содержащие центромеру (*CEN*), и 2-мкм плазмиды [Christianson et al., 1992; Sikorski, Hieter, 1989]. Оба варианта содержат селективные маркерные гены, обеспечивающие отбор клеток, содержащих плазмиду, в различных условиях селективного роста. Плазмиды *CEN* также содержат последовательность центромерной ДНК, необходимой для правильного процесса сегрегации плазмиды в соотношении 1:1 (в материнскую и дочерние клетки) и автономно реплицирующуюся последовательность (*ARS*), необходимую для репликации плазмиды один раз за клеточное деление синхронно с репликацией хромосом [Sikorski, Hieter, 1989]. Эти особенности центромерной плазмиды гарантируют, что плаزمида остается в среднем на уровне одной копии на дрожжевую клетку, хотя стоит отметить, что тем не менее скорость митотической потери центромерных плазмид в 1000 раз превышает скорость потери хромосом [Hegemann et al., 1988; Hieter, 1985]. 2-мкм плазмиды, используемые для генетических манипуляций у дрожжей, содержат последовательность ДНК, полученную из эндогенных 2-мкм колец, обнаруженных в ядре дрожжевых клеток. Эта последовательность содержит точку начала репликации и гены, кодирующие белки Rep1 и Rep2, в сочетании с локусом *STB* (также называемым *REP3*), необходимые для разделения плазмид между дочерними клетками [Ahn et al., 1997; Liu et al., 2014]. Последовательность 2-мкм плазмид также содержит систему амплификации, позволяющую этим плаздам сохранять высокую копийность (10–30 копий на клетку) равномерно по всей популяции, несмотря на случаи неправильной сегрегации [Christianson et al., 1992].

В исследовании Метцгера и соавторов в 2017 году было обнаружено, что убиквитинлигаза, Psh1, необходима для правильной сегрегации как центромерных, так

и 2-мкм плазмид. Предположительно, в клетках дрожжей с делецией гена *PSH1* (рис. 1 А,Б), выращенных в условиях селективного давления, повышается содержание плазмидной ДНК за счет повторяющегося неравномерного распределения плазмид между дочерней и материнской клеткой (2:0).

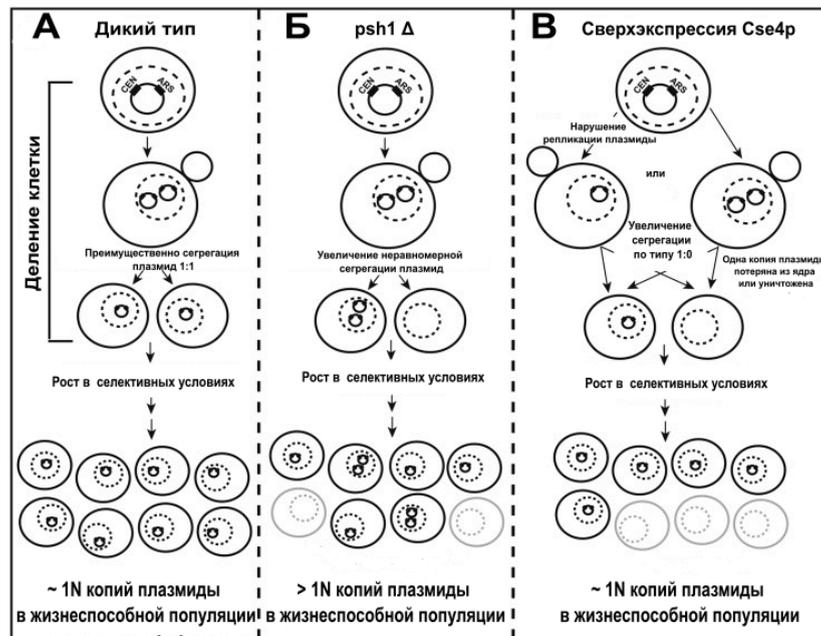


Рисунок 1. Модели различных механизмов неправильной сегрегации плазмиды в гаплоидном штамме *psh1Δ* и в клетках, где сверхпродуцирован белок Cse4. (А) В клетках дикого типа дрожжевые плазмиды, содержащие CEN/ARS, обычно точно реплицируются и разделяются в соотношении 1:1 во время клеточного деления и, таким образом, имеют низкую частоту потери. (Б) В гаплоидных клетках *psh1Δ* плазмиды реплицируются, но имеют склонность к неправильной сегрегации. Одна клетка может получить две копии плазмиды, а другая не получает ни одной. В условиях селективного роста клетки без плазмиды нежизнеспособны. Дрожжи с одной или несколькими копиями плазмиды будут жизнеспособны и продолжат делиться, что приведет к общему увеличению содержания ДНК (>1N) в популяции через поколения роста. Показана модель простейшей неправильной сегрегации плазмиды (2:0), но другие механизмы неправильной сегрегации (т.е. 4:0, 3:1 и т. д.) также становятся возможными после возникновения одного события неправильной сегрегации. (В) В клетках, где сверхпродуцирован белок Cse4, наблюдается увеличение частоты сегрегации плазмид по типу 1:0. Это может произойти из-за того, что плазида не реплицируется должным образом, или если одна копия плазмиды потеряна из ядра или деградировала после репликации. На (А–В) пунктирной линией обозначена ядерная оболочка.

Таким образом, в клетках *psh1Δ* центромерная плаزمида, вероятно, правильно реплицируется, но поскольку во время митоза наблюдается повышенная неправильная сегрегация, это, в свою очередь, приводит к увеличению в клетках уровня плазмидной ДНК (**рис. 1В**). Интересно, что избыточная продукция гистонового варианта Cse4, необходимого для сборки кинетохор и сегрегации хромосом — единственной известной мишени Psh1 — приводит к еще большей частоте потери плазмиды, чем *psh1Δ*, однако механизмы этих явлений разные. Поскольку при увеличенной продукции белка Cse4 не происходит значительного увеличения уровня плазмидной ДНК даже в условиях селективного давления, это предполагает преобладание сегрегации по механизму 1:0 (**рис. 1Б**), что происходит, когда плазмиды или не могут реплицироваться до митоза или одна копия реплицированной плазмиды теряется из ядра или разрушается [Metzger et al., 2017].

1.1.4.4 Изменение числа копий митохондриальной ДНК

Большая часть современных знаний о том, как работают митохондрии, была первоначально получена с использованием *S. cerevisiae*, поскольку способность дрожжей использовать брожение в качестве источника энергии позволяла им выживать как при наличии митохондриальной дисфункции, вызванной различными мутациями, так и в случае полного отсутствия мтДНК. И у дрожжей, и у человека мтДНК кодирует небольшую часть из ~ 1000 белков, функционирующих в митохондриях [Sickmann et al., 2003]. У *S. cerevisiae* мтДНК кодирует компоненты митохондриального аппарата трансляции, а также белковые субъединицы дыхательных комплексов III, IV и V [Contamine, Picard, 2000]. Эти белки находятся во внутренней митохондриальной мембране, где они участвуют в дыхании и формировании электрохимического потенциала через мембрану. Однако ядерный геном кодирует остальные субъединицы комплексов III, IV и V [Tzagoloff, Dieckmann, 1990] и белки, необходимые для всех других аспектов митохондриальной функции [Sickmann et al., 2003]. На ядерно-митохондриальные коммуникации косвенно влияют структура хроматина и эпигенетические механизмы, которые регулируют доступность ДНК и контролируют транскрипцию генов [Staneva et al., 2023]. Также было выявлено, что структура хроматина влияет на число копий мтДНК, поскольку было показано, что неправильная сборка хроматина или снижение экспрессии основных гистонов у *S. cerevisiae* способствует увеличению числа копий мтДНК, окислительному фосфорилированию,

синтезу АТФ, потреблению кислорода и экспрессии генов, кодирующих ферменты цикла трикарбоновых кислот [Galdieri et al., 2016]. Хотя имеются данные об эволюционно консервативных путях и механизмах, контролирующих количество копий мтДНК [Göke et al., 2020], глубокое знание этих механизмов остается не до конца изученным.

В свою очередь у *S. cerevisiae* потеря мтДНК может приводить к нестабильности ядерного генома. Корреляция между анеуплоидиями и изменениями числа копий мтДНК была обнаружена в работе 2009 года [Veatch et al., 2009]. Штаммы с более значительным отклонением от диплоидного состояния были чрезмерно представлены среди *rho0* колоний, в которых не обнаруживается мтДНК [Puddu et al., 2019]. Степень связи между потерей мтДНК и анеуплоидией может отражать дефекты формирования железо-серных кластеров, необходимых для нормального функционирования митохондрий [Veatch et al., 2009].

В исследовании 2020 года был проведен анализ мтДНК у коллекции нокаутов, который выявил 130 штаммов с дизрупциями различных генов, связанных с повышенным числом копий мтДНК (*rho++*). Интересно, что этот набор генов был обогащен факторами, связанными с репарацией ДНК и метаболизмом, а не с биологией митохондрий. Предположительно дефекты репарации ДНК могут привести к *rho++* фенотипу через постоянный ответ на повреждение ДНК (DDR - **DNA Damage Response**). Активация DDR за счет агента, повреждающего ДНК, у штаммов дикого типа запускала увеличение числа копий мтДНК. Увеличение числа копий мтДНК могло быть вызвано сверхэкспрессией генов, кодирующих компоненты комплекса рибонуклеотид редуктазы (RNR) [Taylor et al., 2005], которые находятся под контролем DDR [Huang et al., 1998]. Нокауты транскрипционных репрессоров генов *RNR* (*RFX1, TUP1, CYC8*) приводили к увеличению числа копий мтДНК. Кроме того, из 16 *rho++* штаммов, отобранных для анализа, 9 проявляли индукцию RNR, 6 проявляли спонтанное фосфорилирование Rad53 (еще один маркер активации DDR), а 13 были гиперчувствительны к гидроксимочевине, ингибитору RNR, вызывающему репликативный стресс. Сравнение содержания мтДНК с систематическим анализом уровня Rnr3 (минорная изоформа большой субъединицы рибонуклеотид-дифосфатредуктазы) показал, что многие штаммы с делециями в генах, обеспечивающих стабильность генома, демонстрируют повышенный уровень Rnr3 и *rho++* фенотип. Соответственно, сверхпродукция субъединицы RNR - Rnr3 и, в

меньшей степени, Rnr1, повышала уровни мтДНК. Известно, что сверхэкспрессия Rnr1/Rnr3 повышает уровень dNTP [Sabouri et al., 2008], эти результаты свидетельствуют о том, что повышенная продукция dNTP увеличивает число копий мтДНК, возможно, путем стимуляции репликации мтДНК [Puddu et al., 2019].

Несмотря на наличие к настоящему моменту только косвенных доказательств того, что изменение числа копий мтДНК является адаптационным механизмом, было показано, что наличие мтДНК играет важную роль в адаптации эукариотических клеток к различным стрессовым факторам, включая воздействие фунгицидов, солевой стресс, дефицит питательных веществ и критические температуры. Так, сравнение термоустойчивости митохондриальных *rho*-мутантов (как *rho0*, так и *rho-*) и клеток дикого типа (*rho+*) шести видов дрожжей: *Candida glabrata*, *S. bayanus*, *S. cerevisiae*, *S. eubayanus*, *S. paradoxus* и *S. pastorianus* выявило, что все мутанты *rho*-характеризовались термочувствительностью, а кратковременное воздействие на клетки *S. cerevisiae* (до 3,5 часов) непермиссивных температур (45 °C и 50 °C) приводило к более быстрой гибели *rho0* и *rho-* клеток по сравнению с клетками дикого типа. Таким образом, наличие мтДНК может являться фактором, способствующим адаптации к повышенной температуре в ходе эволюции [Zubko, Zubko, 2014].

В совокупности за последние годы было опубликовано огромное количество исследований геномов *S. cerevisiae*, которые выявили высокий уровень генетического разнообразия и изменчивости у этого вида. Рассмотренные выше примеры иллюстрируют адаптивную роль различных изменений генома дрожжей. В то же время, в нашей лаборатории был обнаружен феномен адаптации дрожжей к дефектам процесса терминации трансляции, изучение которого стало основой нашей работы.

1.2 ТЕРМИНАЦИЯ ТРАНСЛЯЦИИ И ЕЕ ОСОБЕННОСТИ У ДРОЖЖЕЙ *S.*

CEREVISIAE

Открытие двойной спирали ДНК привело к становлению матричного принципа как символа биологии XX века. Матричные процессы (репликация, транскрипция, трансляция) имеют общие характеристики. Так, все они происходят в три этапа — инициация, элонгация и терминация [Inge-Vechtomov, 2003]. Трансляция — это заключительный процесс реализации генетической информации; в отличие от других матричных процессов, в ней также выделяют четвертую — рециклинг рибосом [Dever, Green, 2012; Rodnina, Wintermeyer, 2009]. На каждом этапе трансляции участвуют белковые факторы, обеспечивающие точность и эффективность данного процесса.

1.2.1 Рибосома как ключевой компонент трансляционного аппарата клетки

Трансляция в клетках осуществляется при помощи рибосом — молекулярных машин на основе РНК и белков, которые используют мРНК в качестве матрицы для синтеза белка. Рибосома (**рис. 2**) состоит из двух субъединиц, которые выполняют различные роли в процессе трансляции. Малая субъединица отвечает за процесс декодирования, при котором аминоксил-тРНК (aa-тРНК) подбирается в соответствии с последовательностью мРНК. Ее основными функциональными участками являются следующие: канал, по которому мРНК проходит во время трансляции, центр декодирования, отвечающий за распознавание кодона, и сайты связывания тРНК. В составе как малой, так и большой субчастиц рибосомы выделяют три участка: А, Р и Е, представляющие полости внутри рибосомы для попадания тРНК и факторов трансляции. А-сайт служит для связывания аминоксил-тРНК, когда она входит в рибосому во время синтеза белка, Р-сайт содержит пептидил-тРНК, несущую синтезированную полипептидную цепь, а сайт Е — это участок, где деацилированная тРНК выходит из рибосомы.

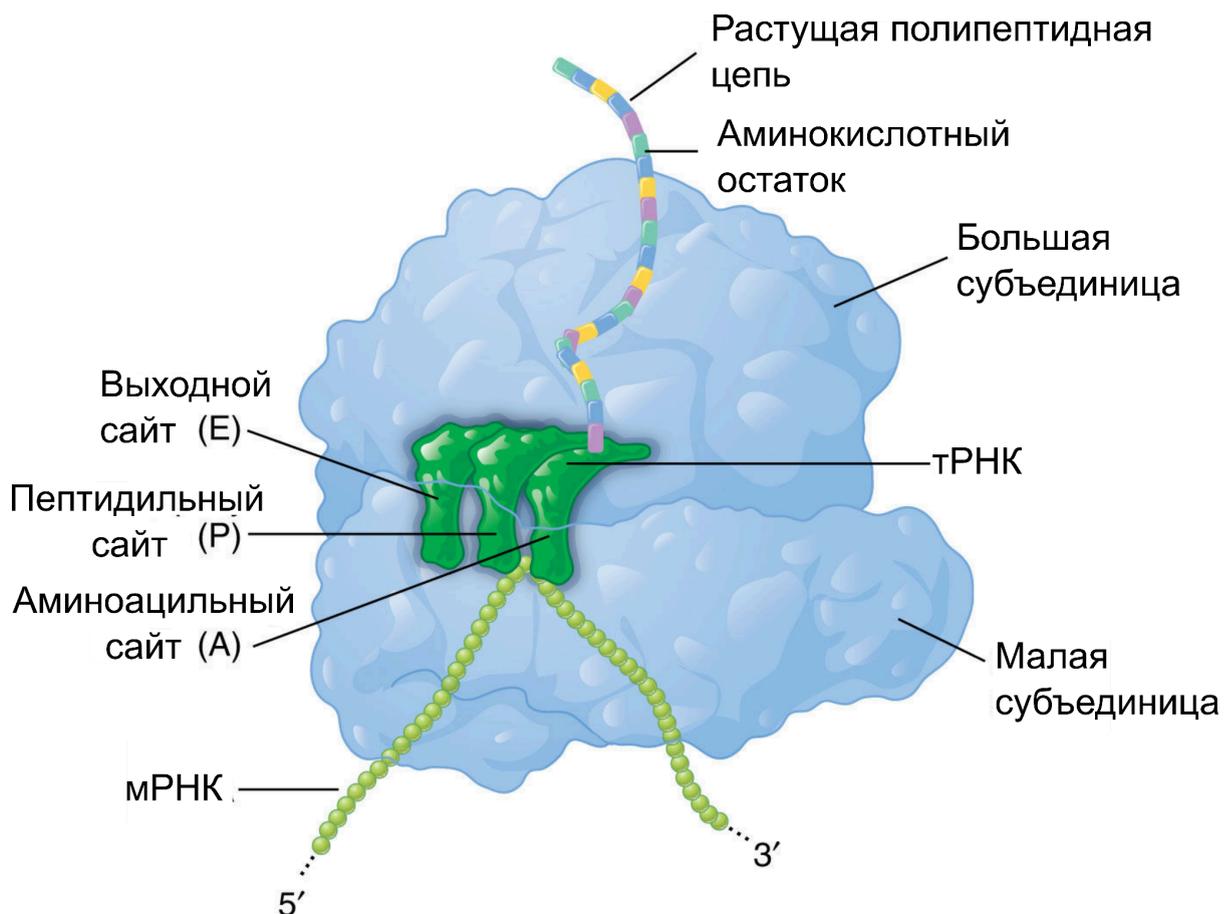


Рисунок 2. Организация рибосомы (модифицировано из Russell, Peter, 2009).

Во время трансляции молекулы тРНК транслоцируются из сайта А в сайт Р, и из сайта Р в сайт Е. Большая субъединица катализирует образование пептидной связи. Ее основные функциональные сайты - это сайты связывания тРНК (А, Р и Е), выходной туннель пептида, который проходит через тело большой субъединицы, и пептидилтрансферазный центр (ПТЦ). ПТЦ отвечает за образование пептидной связи и расположен у входа в пептидный туннель. В результате образования в ПТЦ пептидной связи зарождающаяся полипептидная цепь переносится с пептидил-тРНК в Р-сайте к аа-тРНК в А-сайте, таким образом увеличивая образующуюся цепь на одну аминокислоту [Melnikov et al., 2012].

В целом, рибосомы бактерий, архей и эукариот обладают высокой степенью консервативности последовательности и структуры, что указывает на общее эволюционное происхождение [Blanchet, Ranjan, 2022].

1.2.2 Общая схема трансляции

Инициация трансляции в большинстве случаев начинается со стартового кодона AUG, кодирующего метионин, при этом происходят распознавание стартового кодона мРНК, что задает правильную рамку считывания. Далее начинается элонгация, которая является наиболее продолжительным этапом белкового синтеза. В ходе элонгации происходит наращивание полипептидной цепи путем последовательного присоединения аминокислотных остатков. Во время элонгации aa-тРНК входят в А-сайт рибосомы, где происходит декодирование кодонов мРНК за счет их взаимодействия с антикодоном тРНК. В случае правильного спаривания кодона и антикодона рибосома катализирует образование пептидной связи, присоединяя к синтезирующемуся пептиду новую аминокислоту. После этого комплекс, состоящий из тРНК, пептида и мРНК, транслируется на один кодон, при этом пептидил-тРНК перемещается в Р-сайт, освобождая в А-сайте место для следующей aa-тРНК. После этого процесс повторяется. Важную роль в данных процессах выполняют факторы элонгации. Наращивание аминокислотной цепи завершается, когда в процессе сканирования мРНК в А-сайт рибосомы попадает один из стоп-кодонов, что влечет за собой терминацию трансляции — заключительный этап в биосинтезе белка. На этапе рециклинга рибосомные субъединицы диссоциируют, высвобождая мРНК и деацилированную тРНК [Blanchet, Ranjan, 2022; Dever, Green, 2012; Dever et al., 2016; Rodnina, Wintermeyer, 2009]. На стадии терминации и рециклинга одну из важнейших ролей играют белковые факторы терминации трансляции, изучение которых является предметом настоящего диссертационного исследования.

1.2.3 Факторы терминации трансляции, структура, механизмы функционирования, особенности

Аппарат трансляции — рибосома и связанные с ней факторы инициации, элонгации и терминации — одна из самых сложных молекулярных машин клетки. Неудивительно, что некоторые составляющие, ответственные за основные функции, консервативны среди бактерий, архей и эукариот. Тем не менее, существуют различия в особенностях взаимодействия и функциях белков, участвующих в процессе, изменчивость их структурного и аминокислотного состава, а также отличия в работе вспомогательных участников процесса. Большая часть исследований, описывающих

механизм процесса терминации трансляции, была сделана с использованием прокариотической системы. Стоит отметить, что последнее десятилетие для более подробного изучения механизма трансляции на разных этапах активно используют наряду с классическим методом рентгеноструктурного анализа также метод криоэлектронной микроскопии (крио-ЭМ) — просвечивающей электронной микроскопии, в которой образец исследуется при криогенных температурах (обычно в жидком азоте). Данный метод быстро стал популярен в структурной биологии, так как не требует получения кристаллов, подходит для белков и их комплексов с большой молекулярной массой, способен поддерживать нативную активность и функциональное состояние образцов, включая посттрансляционные модификации, при этом в одном эксперименте можно зафиксировать несколько различных конформационных состояний [Benjin, Ling, 2020].

1.2.3.1 Структура и функции факторов терминации у прокариот

Терминация трансляции включает в себя три этапа: распознавание стоп-кодона, гидролиз сложноэфирной связи пептидил-тРНК (эти два этапа выполняются факторами первого класса RF1 или RF2) и диссоциацию RF1/RF2 с помощью фактора второго класса RF3. Бактериальные факторы терминации трансляции первого класса состоят из четырех доменов (**рис. 3**). Домен 1 взаимодействует с белком RF3. Домены 2 и 4 образуют компактный супердомен, который связывается с субъединицей 30S и участвует в распознавании стоп-кодонов. Домен 3 участвует в высвобождении образующегося пептида путем гидролиза сложноэфирной связи в ПТЦ. В структуре факторов RF1 и RF2 выделяют универсально консервативный мотив GGQ, который участвует в гидролизе связи пептидил-тРНК, и консервативные аминокислоты T186 и S206 (которые входят в состав консервативных мотивов PXT и SPF соответственно), обеспечивающие кодон-специфичность [Korkmaz, Sanyal, 2017; Korostelev et al., 2008; Korostelev et al., 2010; Rodnina, 2018; Shin et al., 2004]. Позднее было показано, что помимо вышеперечисленных аминокислот в структуре RF1 за распознавание стоп-кодона отвечают остатки T194, Q181, G116 и E119. В структуре RF2 кодон-специфичность также обеспечивают аминокислоты G138, E141, T216 и V203 [Xia, 2018].

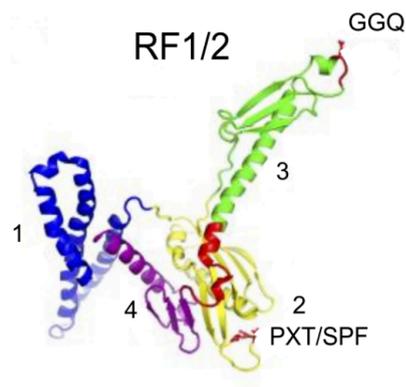


Рисунок 3. Обобщенная структура бактериальных факторов терминации трансляции первого класса. Структуры окрашены в соответствии с их четырехдоменной организацией; мотивы GGQ, PXT и SPF показаны красным (по Korostelev., 2010, с изменениями).

Было показано, что глутаминовый остаток мотива GGQ метилирован; данная модификация увеличивает скорость высвобождения пептида, в частности, для RF2. Предполагается, что реакция проходит через промежуточный продукт, который расщепляется с образованием свободного полипептида и деацилированной тРНК [Jin et al., 2010; Pundir et al., 2021].

Белок RF3 (**рис. 4**) имеет в своем составе три отдельных домена. Домен I состоит из классического ГТФазного домена (G) и EF-G-подобного G-субдомена (G'). Домен II образует β -бочонкообразную структуру, так же как и у EF-Tu, EF-G (прокариотические факторы элонгации) и eRF3. Домен II соединен коротким пептидным линкером с доменом III, который состоит из центрального β -бочонка, фланкированного двумя α -спиралями [Gao et al., 2007].

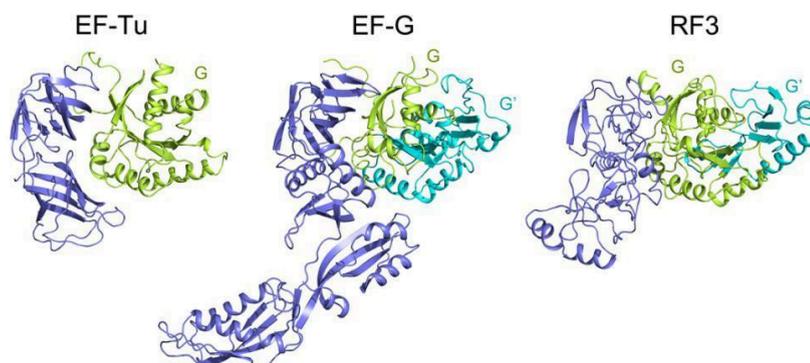


Рисунок 4. Структуры основных ГТФаз, участвующих в элонгации и терминации у прокариот. Зеленым и голубым цветом показан домен I — G-домен и субдомен G'

соответственно. Домены II и III окрашены фиолетовым [Liljas, Sanyal, 2018]. EF-Tu, EF-G - факторы элонгации трансляции. RF3 - фактор терминации трансляции.

1.2.3.2 Механизм функционирования прокариотических факторов терминации трансляции

Структурные исследования RF с помощью рентгеновской кристаллографии и крио-ЭМ показали, что RF1 и RF2 существуют в двух разных конформациях: в свободном и в связанном с рибосомой состояниях. В кристаллических структурах RF1 и RF2, не связанных с рибосомой, расстояние между мотивами PXT и GGQ составляет около 25Å, что намного меньше, чем расстояние в 75Å, разделяющее центр декодирования и ПТЦ в бактериальной 70S рибосоме (рис. 5). Одновременное взаимодействие PVT (мотив PXT, где во втором положении находится аминокислота валин) и GGQ-мотивов с соответствующими участками рибосомы реализуется за счет перехода RF1 в открытую (англ. extended) конформацию, в которой расстояние между мотивами значительно увеличивается (рис. 5).

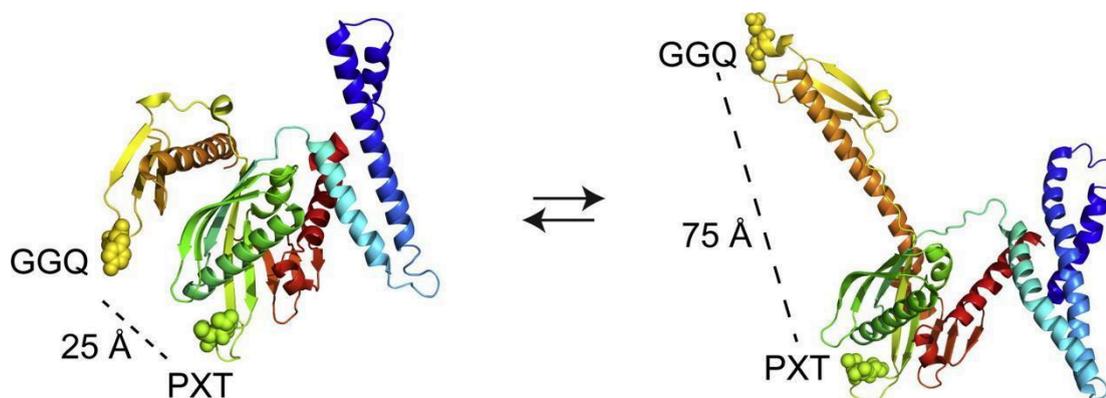


Рисунок 5. Открытая и закрытая конформация RF1. Слева — кристаллическая структура RF1 *Thermotoga maritima* в закрытой конформации с мотивом GGQ (желтые сферы), и мотивом PXT (зеленые сферы). Справа: Кристаллическая структура RF1 *Thermus thermophilus* в открытой конформации [Trapp, Joseph, 2016].

Появилось предположение, что RF1 и RF2 приобретают каталитически активную открытую конформацию при правильном распознавании кодонов, после связывания с рибосомой. Визуальные доказательства этой гипотезы, появились совсем недавно благодаря крио-ЭМ с временным разрешением, которая продемонстрировала как переход RF1/RF2 из “закрытого” в “открытое” состояние на рибосоме [Fu et al., 2019]

после правильного распознавания стоп-кодона, так и различные промежуточные конформации (между полностью закрытой и открытой конформацией) RF1 и RF2. В целом эти исследования расшифровывают почти полную механистическую картину терминации трансляции бактериальными RF I класса, где распознавание стоп-кодона и конформационные изменения связаны с точностью терминации, тогда как высвобождение пептида определяет скорость процесса [Pundir et al., 2021].

Еще одним важным механистическим аспектом терминации трансляции является участие RF3 в этом процессе. Известно, что RF3 необходим для высвобождения RF1/RF2 из рибосомы, однако данные, описывающие механизм действия фактора II класса, долгое время были достаточно противоречивы [Koutmou et al., 2014; Pallesen et al., 2013; Peske et al., 2014; Shi, Joseph, 2016; Zavialov et al., 2001; Zavialov et al., 2002]. К настоящему моменту показано, что связывание RF3 с рибосомой индуцирует вращение малой субъединицы рибосомы, что приводит к изменению расположения тРНК и изменению конформации RF1. RF3 индуцирует полное вращение малой субъединицы, которое приводит к вытеснению RF1 из его сайта связывания. Вращение малой субъединицы сопряжено с размещением ГТФазного домена RF3 на большой субъединице, что способствует гидролизу ГТФ и диссоциации RF3 из рибосомы [Graf et al., 2018].

Таким образом, последние исследования позволили прояснить основные аспекты терминации трансляции на примере прокариот. В то же время, ряд вопросов все еще заслуживает дальнейшего изучения.

1.2.3.3 Структура и функции факторов терминации у эукариот

Стоит отметить, что терминация трансляции у эукариот сходна с данным процессом у прокариот, однако эукариотическая терминация имеет несколько особенностей.

В случае эукариот терминация осуществляется двумя белковыми факторами: eRF1, который распознает все три стоп-кодона, и ГТФазой eRF3, которая стимулирует работу фактора eRF1 [Frolova et al., 1994; Zhouravleva et al., 1995]. N-аминоконцевой домен eRF1 (**рис. 6А**) отвечает за распознавание стоп-кодона в А-сайте [Bertram et al., 2000], в осуществление этого процесса вовлечены гептапептид TASNKS [Ito et al., 2002], консервативный мотив YxCxxxF [Frolova et al., 2002; Seit-Nebi et al., 2002], а

также GTS петля и аминокислотные остатки S33, S70, E55 и V71 [Blanchet et al., 2015]. На структурах N-домена eRF1 человека методом ядерного магнитного резонанса было показано, что петля GTS может принимать различные конформации, которые модулируются мутациями, окружающими эту петлю, что влияет на специфичность распознавания стоп-кодонов [Wong et al., 2012]. С использованием мутагенеза консервативных остатков в N-концевом домене eRF1 человека были выявлены аминокислоты, имеющие решающее значение для распознавания остатков аденина и гуанина во втором и третьем положениях стоп-кодона. Это исследование *in vitro* [Kryuchkova et al., 2013] показало, что остатки S33 и S70 будут участвовать в распознавании гуанина во втором положении и что декодирование аденинов в этом положении будет включать T32, S36 и F131 (из мотива YxCxxxF). Для декодирования третьего основания стоп-кодона остатки Y125, N129 (из мотива YxCxxxF) и E55 будут распознавать гуанины, тогда как валин в положении 71 будет участвовать в распознавании остатков аденина. Новые исследования с использованием криоэлектронной микроскопии выявили, что связывание с eRF1 изменяет ориентацию нуклеотида A1825 18S рРНК так, что он начинает взаимодействовать со вторым и третьим основанием стоп-кодона. Эта конфигурация способствует встраиванию основания в четвертом положении в А-сайт, где оно стабилизируется за счет взаимодействия с G626 нуклеотидом 18S рРНК. Таким образом, eRF1 использует два нуклеотида рРНК для уплотнения мРНК в А-сайте. В этой компактной конформации мРНК распознавание стоп-кодона облегчается за счет водородных связей, образованных между рРНК и аминокислотными остатками eRF1 [Brown et al., 2015]

Средний М-домен, содержит универсально консервативный мотив GGQ, индуцирует высвобождение формирующегося полипептида из пептидил-тРНК в рибосомном Р-сайте [Frolova et al., 1999]. С-терминальный домен связывается с eRF3 и ABCE1 и содержит подвижный мини-домен [Mantsyzov et al., 2007; Song et al., 2000]. Дополнительно в С-домене методом ядерного магнитного резонанса был идентифицирован подвижный минидомен (остатки 329–372). Минидомен имеет две возможные конформации и, вероятно, способен приближаться к сайту узнавания стоп-кодона N-домена eRF1. Предполагается, что этот сайт влияет на эффективность протекания процесса терминации трансляции [Mantsyzov et al., 2007; Mantsyzov et al., 2010; Журавлева и др., 2022].

В исследованиях на дрожжах *Schizosaccharomyces pombe* была экспериментально обоснована роль М- и С-доменов в процессе терминации [Ito et al., 1998]. Было показано, что два сайта С-концевого домена необходимы для взаимодействия eRF1 человека с eRF3 [Merkulova et al., 1999]. Аминокислотные остатки, расположенные между сайтами С-концевого домена eRF1 человека (остатки 338–381), вовлечены во взаимодействие с каталитической субъединицей фосфатазы PP2A [Andjelković et al., 1996], но роль их взаимодействия неясна. Взаимодействие eRF1–PP2A, по-видимому, играет важную роль в нонсенс-опосредованном распаде мРНК (NMD) [Cheng et al., 2009]. С-домен eRF1 сам по себе не может стимулировать ГТФазную активность eRF3, для гидролиза ГТФ необходимо присутствие М-домена [Kononenko et al., 2007]. Известно, что белок eRF3 действует как ГТФаза, стимулируя функция eRF1, но само связывание ГТФ с eRF3 происходит только в присутствии eRF1 и Mg^{2+} [Alkalaeva et al., 2006; Nauryliuk et al., 2006; Mitkevich et al., 2006]

Анализ третичной структуры показал, что по форме и размерам eRF1 сходен с молекулой тРНК [Ito et al., 1996], а домены N, М, С соответствуют антикодоновой петле, аминоксил-акцепторному стеблю и псевдоуридиновой петле тРНК, соответственно.

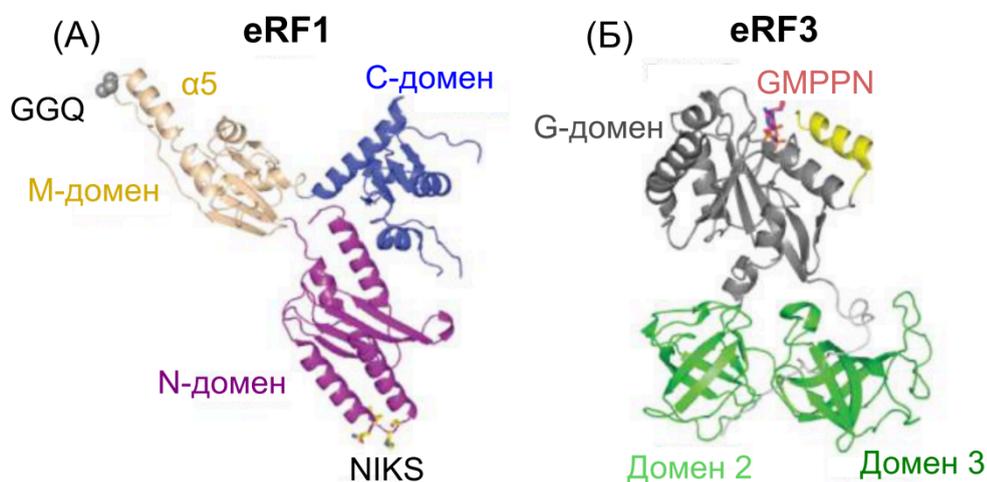


Рисунок 6. Факторы терминации трансляции у эукариот (А) eRF1 человека, (Б) С-концевой участок eRF3 *Schizosaccharomyces pombe* (модифицировано из Hellen 2018).

В eRF3 (рис. 6Б) присутствует неконсервативный N-домен, который не обязателен для реализации функции eRF3 при терминации, но связывает

поли(А)-связывающий белок (PABP) [Dubovaia et al., 2006; Hoshino et al., 1999; Kozlov, Gehring, 2010]. Помимо N-домена eRF3 содержит канонический ГТФ-связывающий (G) домен и два β -бочонка (домены 2 и 3), которые гомологичны ГТФ-связывающим факторам трансляции [Kong et al., 2004]. Как и во всех ГТФазах, G-домен eRF3 содержит элементы «Switch I» и «Switch II», необходимые для связывания и гидролиза ГТФ и регулирующие конформацию фактора. С использованием дрожжей было выявлено, что С-концевой участок консервативен даже у эволюционно далеких видов и имеет сходную последовательность с эукариотическим фактором элонгации трансляции eEF-1 α [Kushnirov et al., 1990]. У млекопитающих существует два паралога eRF3, eRF3a и eRF3b, которые кодируются *GSPT1* и *GSPT2* соответственно. Две изоформы eRF3 имеют разные N-концевые домены, но оба связывают eRF1 и являются функциональными факторами терминации. Ген, кодирующий eRF3b, преимущественно экспрессируется в тканях головного мозга, тогда как ген, кодирующий eRF3a, экспрессируется во всех тканях [Chauvin et al., 2005; Hoshino et al., 1999].

1.2.3.4 Механизм функционирования эукариотических факторов терминации трансляции

Факторы eRF1 и eRF3 взаимодействуют друг с другом, образуя плотный комплекс, что было экспериментально показано *in vivo* и *in vitro* [Stansfield et al., 1995; Zhouravleva et al., 1995]. Несмотря на то, что *in vitro* eRF1 способен функционировать в одиночку, в комплексе с eRF3 увеличивается скорость процесса и эффективность гидролиза пептидил-тРНК. При ограниченном количестве eRF1 взаимодействие с eRF3 увеличивает скорость высвобождения пептида более чем в 20 раз [Eyler et al., 2013].

Кристаллические структуры эукариотических факторов терминации выявили детали взаимодействия между этими факторами, а также конформационные изменения в eRF1, которые происходят при связывании с eRF3. Молекулярное моделирование, анализ малоуглового рассеяния рентгеновских лучей и мутагенез показали, что в М-доме eRF1 человека аргинин в 192 положении важен для стимуляции ГТФазной активности eRF3 с помощью eRF1 и рибосомы [Cheng et al., 2009]. Также была обнаружена роль гидрофобных остатков eRF1 (F288, I291, Y298, F300 и F405) и eRF3 (I572 и F612) во взаимодействии eRF1–eRF3. Белки дополнительно контактируют друг с другом посредством ван-дер-ваальсовых взаимодействий между Q396 и Q400 eRF1 и I572 и D647 eRF3. Взаимодействия изменяют положение М-домена eRF1. Домен

перемещается в ПТЦ центр, так что расстояние между мотивом GGQ и сайтом узнавания стоп-кодона eRF1 становится таким же, как расстояние между антикодоном и последовательностью ССА тРНК (переход из открытого в закрытое состояние). Таким образом, основной вклад во взаимодействие между eRF1 и eRF3 вносят С-концевые домены, между М-доменом eRF1 и ГТФ-связывающим (G) доменом eRF3 возникают дополнительные контакты, и ГТФ играет важную роль в этом взаимодействии [Журавлева и др., 2022].

Образованный тройной комплекс eRF1, eRF3 и ГТФ быстро связывается с рибосомой, где в А-сайте располагается стоп-кодон (рис. 7). У эукариот, как и у бактерий, общим принципом достижения точности терминации является смена закрытых и открытых конформаций фактора 1 класса. N-домен фактора eRF1 проникает в сайт А, образуя карман, который в компактной конформации вмещает стоп-кодон и нуклеотид мРНК в позиции +4 (первый нуклеотид после стоп-кодона). Структуры, выявленные при помощи крио-ЭМ высокого разрешения показали, как eRF1 распознает четыре нуклеотида мРНК, находящиеся в сайте А рибосомы. Это подчеркивает важность пуринового остатка (т. е. G или A), следующего за каноническими терминирующими кодонами UAA, UGA или UAG [Brown et al., 2015].

Ранее было показано, что на эффективность терминации трансляции существенно влияет контекст, окружающий стоп-кодон с 5' и 3' конца, особенно нуклеотид, следующий сразу за стоп-кодом (положение +4) [Bonetti et al., 1995]. Также было обнаружено, что мотив 3'-контекста, родственной последовательности стоп-кодона, стимулирует терминацию трансляции. В то же время нуклеотидный состав 3'-последовательности, отличающийся от стоп-кодона, снижает эффективность терминации трансляции [Sokolova et al., 2020]. В более поздних работах есть свидетельства того, что не только контекст влияет на частоту прочтения стоп-кодона. Эукариотический фактор инициации трансляции eIF3 увеличивает эффективность терминации в присутствии “слабого” контекста, предположительно способствуя включению почти родственных тРНК [Beznosková et al., 2015]. Помимо этого было выявлено, что эффективность терминации трансляции зависит от концентрации как eRF, так и супрессорных/почти родственных тРНК [Biziaeve et al., 2022].

В последующих этапах принимает участие фактор eRF3, он направляет течение процесса и ускоряет высвобождение пептида фактором eRF1 в присутствии ГТФ (рис.

7). Когда eRF3 гидролизует ГТФ, это способствует его собственному высвобождению, что позволяет перевести eRF1 в активную конформацию, в процессе чего каталитический домен eRF1 удлиняется, чтобы вставить мотив GGQ в пептидил-трансферазный центр. Rli1 у дрожжей также взаимодействует с eRF1, стимулируя его каталитическую активность путем стабилизации активной конформации. В целом, химический механизм гидролиза пептидил-тРНК, вероятно, аналогичен механизму бактериальных RF [Korostelev 2022]. Изменение конформации eRF1 способствует правильному расположению нуклеотидов в ПТЦ, что приводит к гидролизу пептидил-тРНК, вызывая движение субъединиц рибосомы относительно друг друга, перемещение деацилированной тРНК из Р-сайта в гибридное состояние Р/Е (перестройка тРНК Р-сайта из классического (Р/Р) в гибридное (Р/Е) состояние) и высвобождение как eRF1, так и новосинтезированного пептида.

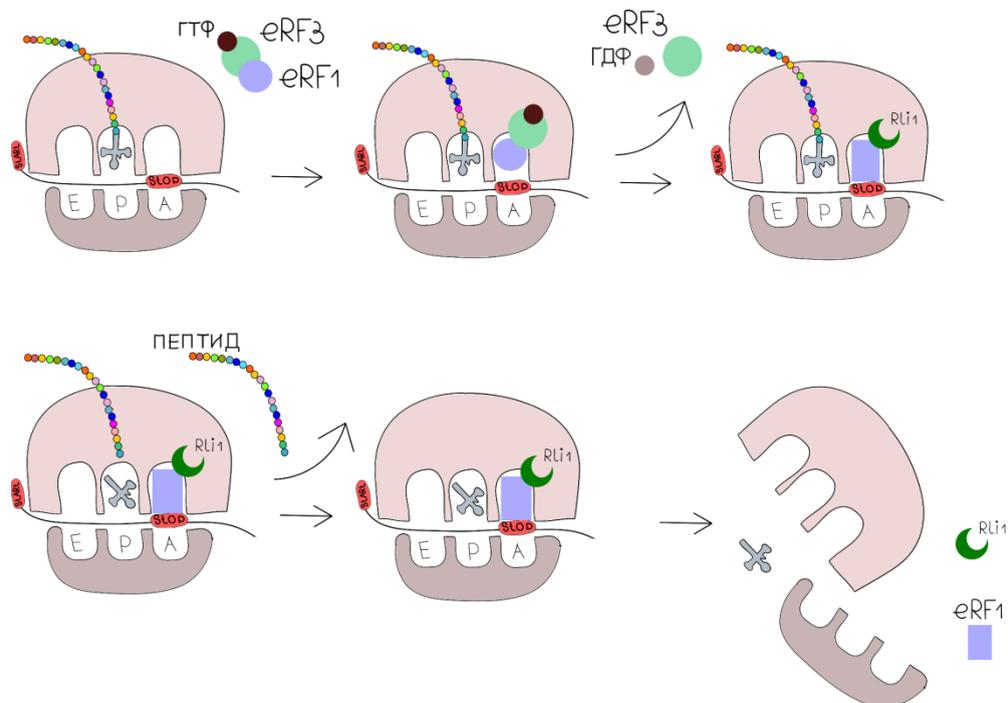


Рисунок 7. Терминация трансляции у эукариот на примере *S. cerevisiae*. Терминация происходит, когда стоп-кодон входит в сайт А рибосомы и реализуется при помощи факторов eRF1 и eRF3. Высвобождению пептида способствует Rli1, который также способствует диссоциации субъединиц (модифицировано из Blanchet and Ranjan 2022)

Известно, что на терминацию трансляции у высших эукариот влияют и другие факторы. Например, было показано, что у человека eIF3j (лабильная субъединица эукариотического фактора инициации трансляции eIF3) стимулирует гидролиз

пептидил-тРНК и участвует в загрузке факторов терминации на рибосому [Egorova et al., 2021]. PDCD4 (белок программируемой клеточной смерти 4) регулирует терминацию трансляции, способствуя связыванию факторов терминации с рибосомой, увеличивая активность ГТФазы eRF3 и диссоциируя eRF3 от посттерминационного комплекса [Mikhailova et al., 2017]. Взаимодействие с фактором eRF3 обнаружено для белков PABP. Это взаимодействие является консервативным, поскольку оно было показано как для белков млекопитающих, так и для дрожжей *S. cerevisiae* и *X. laevis*. Во всех случаях во взаимодействии участвуют С-концевой домен PABP и N-концевой домен eRF3 [Cosson et al., 2002; Hoshino et al., 1999; Uchida et al., 2002]. Известно, что связывание PABP с eRF3 повышает эффективность взаимодействия факторов терминации с рибосомой [Hoshino et al., 1999; Ivanov et al., 2016]. Кроме того было показано, что у человека два других белка, поли(А)-связывающие белки 1 и 2 (PAIP1 и PAIP2), конкурируют с eRF3 за связывание с С-концевым доменом PABP, тем самым регулируя его активность, связанную с трансляцией [Ivanov et al., 2019]. Было показано, что белки Upf1, Upf2, Upf3 (центральные регуляторы в системе деградации РНК, опосредованной преждевременным стоп-кодоном (или NMD - nonsense-mediated decay)) взаимодействуют с факторами терминации трансляции. Белок Upf1 взаимодействует с факторами терминации eRF3 и eRF1, а Upf2, Upf3 исключительно с eRF3 [Celik et al., 2015]. Взаимодействие Upf1 и Upf2 с мРНК, содержащей преждевременный стоп-кодон, приводит к удалению кэпа с 5'-конца мРНК и ее деградации при помощи экзонуклеазы Xrn1 [Roy, Jacobson, 2013]. Мутации или делеции в генах *UPF1*, *UPF3* тоже влияют на процесс терминации [Maderazo et al., 2000] при нарушении деградации мРНК с преждевременным стоп-кодоном, увеличивается синтез продукта на её основе, и это влечет повышение вероятности нонсенс-супрессии [Roy, Jacobson, 2013]. Наконец, белок ABCЕ1 взаимодействует с eRF1, стимулируя его каталитическую активность, стабилизируя открытую конформацию eRF1 [Blanchet, Ranjan, 2022].

1.2.3.5 Особенности структуры и функций факторов терминации трансляции у дрожжей *S. cerevisiae*

Несмотря на то, что дрожжи *S. cerevisiae* являются модельным объектом для изучения процесса трансляции, они имеют некоторые особенности в структуре факторов терминации, их функциях и взаимодействиях с другими белками.

У дрожжей фактор eRF1, в отличие от eRF3, практически не содержит значительных отличий от фактора терминации первого класса высших эукариот (за исключением длины М - домена). В факторе eRF1, который кодируется геном *SUP45*, можно выделить (рис. 8) три канонических домена: N (1–139), М (139–272), и С (272–437) [Журавлева и др., 2022].

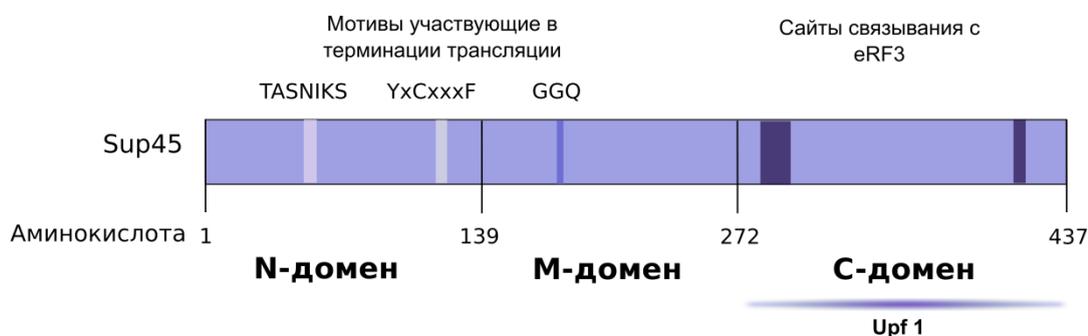


Рисунок 8. Доменная структура белка Sup45. Границы доменов обозначены номерами последних аминокислотных остатков в составе доменов. N-домен содержит консервативные мотивы TASNIKS и YxCxxxF. М-домен содержит GGQ-мотив. В С-домene цветом выделена область, где расположены участки взаимодействия с eRF3. В нижнем ряду указан белок, взаимодействующий с eRF1.

Фактор eRF3 у дрожжей *S. cerevisiae* кодирует ген *SUP35*. Остатки метионина, соответствующие кодонам ATG в положении 123 и 254, условно подразделяют белок Sup35 на три домена (рис. 9) N, М и С [Kushnirov et al., 1988].

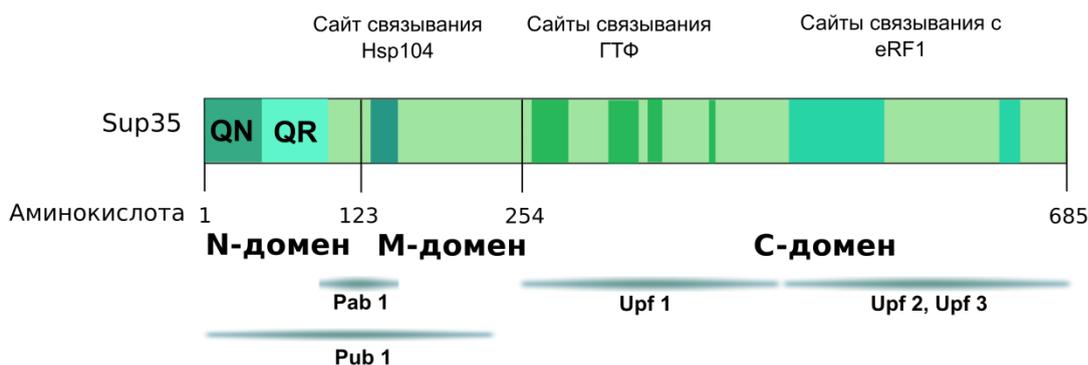


Рисунок 9. Доменная структура белка Sup35. Границы доменов обозначены номерами последних аминокислотных остатков в составе доменов. N-домен подразделяется на QN (аспарагин/глутамин)-богатый участок и QR-участок, содержащий олигопептидные повторы. M-домен содержит сайты связывания с шапероном Hsp104. В C-доме линиями обозначены сайты связывания с ГТФ, цветом выделена область, где расположены участки взаимодействия с eRF1. В нижнем ряду указаны белки, взаимодействующие с eRF3.

Важной особенностью дрожжевого eRF3 является наличие обогащенного заряженными аминокислотами (лизинном и глутаминовой кислотой) M-домена, который наряду с N-доменом, не является необходимыми для жизнедеятельности клетки, так как не существенен для процесса терминации трансляции [Ter-Avanesyan et al., 1993; Trubitsina et al., 2019]. N-домен имеет необычный аминокислотный состав, а именно содержит более 50% аспарагиновых (Q) и глутаминовых (N) остатков. Более того, этот участок содержит шесть повторов из 9 аминокислотных остатков (PQGGYQQYN), один из которых неполный (PQGG) [Kushnirov et al., 1988]. Эти последовательности обуславливают способность дрожжевого eRF3 — белка Sup35 — агрегировать и приобретать прионную конформацию (образовывать дрожжевой прион [*PSI⁺*] [Paushkin et al., 1996]). Было также обнаружено, что увеличение количества последовательностей, содержащих повторы, приводит к ускоренному протеканию процесса прионизации [Liu, Lindquist, 1999]. В M-доме в свою очередь были локализованы сайты связывания с шапероном Hsp104, который необходим для поддержания приона [*PSI⁺*] в ряду клеточных делений [Helsen, Glover, 2012; Trubitsina et al., 2019].

Несмотря на то, что N- и M-домены не участвуют в реализации терминационной функции Sup35, существовало предположение, что они представляют собой двухкомпонентную функциональную единицу, критическая роль которой оставалась неизученной. В 2018 году была продемонстрирована неожиданная функция N и M доменов канонического дрожжевого прионного белка Sup35. В стрессовых условиях, за счет изменения pH, Sup35 образовывал защитные гели при помощи разделения жидкой

фазы. Разделение фаз было опосредовано N-концевым прионным доменом и регулировалось соседним M-доменом, чей кластер отрицательно заряженных аминокислот действовал как датчик pH. Синергия этих двух модулей способствовала выживанию дрожжевых клеток, за счет спасения жизненно необходимого фактора трансляции Sup35 от необратимой агрегации. Таким образом, прионоподобные домены представляют собой консервативные датчики стресса окружающей среды, которые способствуют быстрой адаптации в нестабильных условиях путем изменения поведения белковой фазы [Franzmann et al., 2018].

1.2.3.6 Специфика взаимодействия факторов терминации трансляции у дрожжей с другими белками

У дрожжей eRF1 и eRF3, помимо взаимодействия между собой, взаимодействуют со многими другими белками, как участвующими в непосредственно в процессе терминации трансляции, так и осуществляющими, например, транспорт мРНК из ядра в цитоплазму (Dbp5 и Gle1), рециклинг (Rli1), деградацию мРНК (белки Upf), инициацию трансляции (Pab1) и другие.

Для нормального протекания процесса терминации трансляции, помимо взаимодействия факторов eRF1 и eRF3, также необходимы белки Dbp5 и Rli1 [Gross et al., 2007; Khoshnevis et al., 2010]. В работе 2019 года при помощи комбинации *in vivo* и *in vitro* экспериментов на дрожжах *S. cerevisiae* было показано, что вышеперечисленные белки регулируют стадии сборки терминационного комплекса. Стоит отметить, что результаты, приведенные в данной статье, противоречат существующей модели терминации и свидетельствуют в пользу того, что eRF1 и eRF3 рекрутируются не как комплекс, а по отдельности. Предположительно, сначала, комплекс Rli1 и eRF3-ГДФ взаимодействует с рибосомой. Затем Dbp5-АТФ доставляет eRF1 в А-сайт и, таким образом, предотвращает преждевременное взаимодействие последнего с eRF3. Dbp5, в свою очередь, диссоциирует после гидролиза АТФ. Впоследствии, это дает eRF1 возможность связаться с eRF3, так как взаимодействие Dbp5 и eRF3 с фактором eRF1 является взаимоисключающим. Дефекты в доставке eRF1 при участии Dbp5 приводят к преждевременному взаимодействию и диссоциации eRF1 и eRF3 от рибосомы и к последующему прочтению стоп-кодона. Таким образом, пошаговая сборка комплекса терминации под управлением Dbp5 необходима для корректного завершения трансляции [Weißel et al., 2019]. Как и непосредственно сам Dbp5, Gle1 действует как

фактор экспорта поли(А)-мРНК из ядра в цитоплазму и был обнаружен у *S. cerevisiae* [Murphy, Wentе, 1996]. Были обнаружены как генетические, так и физические взаимодействия между Gle1 и Sup45 и показано, что Gle1 с гексафосфатом инозитола необходим для первой стадии образования терминирующего комплекса у дрожжей [Tieg, Krebber, 2013].

Делеция *HCR1* (нежизненно важный ген, кодирующий непостоянно связанную с комплексом субъединицу Hcr1 фактора eRF3 у дрожжей) приводит к нонсенс-супрессии и увеличению количества eRF3 во фракции 80S рибосом [Beznosková et al., 2013]. Кроме того, Hcr1 вместе с eRF3 обнаруживался во фракции полисом 80S только в присутствии eRF1. Было показано, что две коровые субъединицы eRF3, кодируемые генами *TIF35* и *TIF34*, взаимодействуют с доменами N и NM eRF1. Предположительно, eRF3 связывается с претерминирующим комплексом, влияя на эффективность считывания стоп-кодона, а также действует вместе с Hcr1, способствуя высвобождению eRF3-ГДФ из рибосомы и связыванию фактора рециркуляции Rli1 [Журавлева и др., 2022].

Белок Pub1, который участвует в регуляции экспрессии генов, формировании стресс-гранул и тубулинового цитоскелета, тоже играет роль в процессе терминации трансляции. Pub1 связывается с рибосомами, свободными от eRF1 и eRF3, и взаимодействует с QN-богатым участком N-концевого домена фактора eRF3 через его короткий C-концевой тракт, богатый глутамином. Высокая скорость седиментации фракции с Pub1 в градиенте сахарозы, наблюдаемая в соответствующих экспериментах, говорит о том, что Pub1 преимущественно ассоциирован с тяжелыми полисомами, обогащенными терминирующими рибосомами. В большинстве случаев недостаток Pub1 снижает эффективность прочитывания нонсенс-кодонов, но не у всех тетрануклеотидных стоп-кодонов. Это отличает Pub1 от большинства других известных партнеров факторов терминации, которые, как было показано, модулируют прочитывание всех нонсенс-кодонов равномерно [Urakov et al., 2017].

У дрожжей сверхэкспрессия гена, кодирующего PABP (дрожжевой Pab1), имела антисупрессорный эффект в штамме *S. cerevisiae*, несущем мутацию *sup35-21* [Cosson et al., 2002]. Показано, что в культуре клеток человека нарушение взаимодействия eRF3 и PABP приводит к нарушению рециклинга рибосом. На основании этих данных была высказана гипотеза, согласно которой комплекс факторов терминации и инициации

трансляции, а также белка PABP (eRF1, eRF3, PABP и eIF4F) определяет связь между терминацией и инициацией трансляции [Uchida et al., 2002]. Предполагают, также участие Pab1 в процессе NMD. Было показано, что Pab1, взаимодействующий с 3'-некодирующей областью мРНК, является белком, маркирующим конец рамки считывания и “нормальный” стоп-кодон, тем самым определяя разницу между “нормальным” и “преждевременным” нонсенс-кодоном [Amrani et al., 2004].

Факторы терминации трансляции у дрожжей участвуют и в других независимых клеточных процессах, например, eRF3 влияет на формирование актинового цитоскелета. Было показано, что укорочение С-конца eRF3 приводит к дефектам микротрубочек, следовательно, это вызывает нарушения формирования веретена деления, деполимеризацию актина, что приводит к дефектам цито- и кариокинеза [Valouev et al., 2002]. Также было показано специфическое взаимодействие N-домена белка Sup35 с С-доменом белка Sla1, который принимает участие как в формировании актиновых микрофиламентов, так и в распространении приона [*PSI+*] [Bailleul et al., 1999].

1.2.3.7 Мутанты по генам *SUP45* и *SUP35*, кодирующим факторы терминации трансляции, как модель для изучения variability генома дрожжей

Несмотря на то, что гены *SUP45* и *SUP35* являются жизненно необходимыми, а делеция любого из них приводит к гибели клеток дрожжей 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].

Две из этих мутаций *sup45-n* (*sup45-101*, *sup45-102*) расположены в области гена *SUP45*, кодирующей NM-домены eRF1 (**рис.10**). Три мутации (*sup45-104*, *sup45-105*, *sup45-107*) расположены в последней трети гена *SUP45*, кодирующего С-концевой домен eRF1 (**рис.10**).

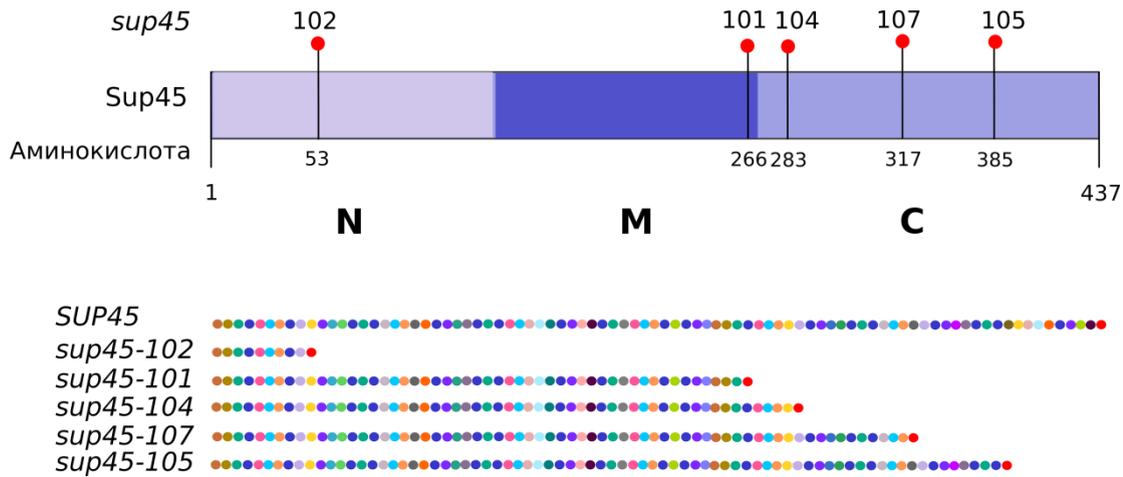


Рисунок 10. Схема расположения мутаций в гене *SUP45*.

Все эти мутации находятся в слабом терминационном контексте. Таким образом, за счет нонсенс-супрессии все нонсенс-мутанты *SUP45* содержат укороченный фрагмент eRF1, а также полноразмерный белок eRF1, хотя его уровень значительно снижен у штаммов, несущих мутантный аллель *sup45-n*, по сравнению со штаммом дикого типа. 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]

Пять мутаций *sup35-n* (*sup35-203*, *sup35-218*, *sup35-244*, *sup35-260*, *sup35-74*) расположены в первой трети гена *SUP35*, кодирующего NM-домен eRF3, а еще одна мутация *sup35-21* в области, кодирующей С-концевой домен eRF3 (рис.11) [Chabelskaya et al., 2004]. Было показано, что мутации *sup35-n* синтетически летальны при сочетании с прионом [*PSI+*], хотя такая летальность зависит от генетического метода, используемого для создания такой комбинации [Trubitsina et al., 2019]. Подобно *sup45-n*, все мутанты *sup35-n* демонстрируют сильную omnipotentную нонсенс-супрессию и приводят к продукции сниженного количества полноразмерного белка eRF3, а также укороченного фрагмента eRF3, размер которого соответствует положению преждевременного стоп-кодона [Chabelskaya et al., 2004].

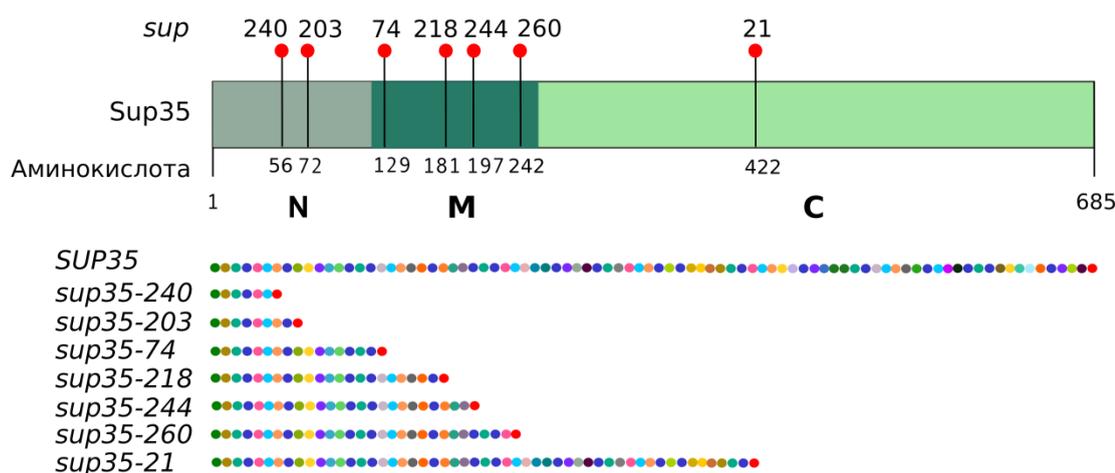


Рисунок 11. Схема расположения мутаций в гене *SUP35*.

Дополнительно в нашей работе для анализа была взята мутация *sup35-222*, молекулярную природу которой не удавалось определить до 2019 года. Было обнаружено, что она приводит к замене одного нуклеотида и разрушает потенциальный сайт связывания белка Abf1 в промоторе *SUP35*, что, в свою очередь, сопровождается снижением уровня белка Sup35 [Matveenko et al., 2019].

В случае всех вышеперечисленных нонсенс-мутаций в генах *SUP45* или *SUP35* клетки остаются жизнеспособными благодаря нонсенс-супрессии. То есть, наряду с укороченным фрагментом белка, синтезируется также его полноразмерная копия, которая способна поддерживать функционирование клеток дрожжей. Однако, 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. Процесс адаптации клеток дрожжей к подобным нарушениям можно наблюдать при замещении плазмиды, несущей аллель дикого типа (*SUP45* или *SUP35*), на плазмиду с мутантной аллелью. Для этого ранее в лаборатории были получены штаммы U-1A-D1628 (Δ *SUP45* pRS316-SUP45) и U-14-D1690 (Δ *SUP35* pRSU2), несущие делеции генов *SUP45* и *SUP35*, которые компенсированы наличием центромерных плазмид с данными генами [Le Goff et al., 2002; Maksitenko et al., 2021].

В данной работе мы сконцентрировались на изучении адаптации клеток дрожжей к дефектам процесса терминации трансляции. Мы выяснили могут ли структурные изменения в геноме *S. cerevisiae* объяснить парадокс существования 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.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Штаммы микроорганизмов.

Штаммы дрожжей, использованные в работе, приведены в **Таблице 1**.

Таблица 1. Штаммы дрожжей *S. cerevisiae*, использованные в работе.

Штамм	Генотип	Ссылка	Источник
U-1A-D1628	<i>MATα ade1-14(UGA) trp1-289 (UAG) his3 lys2 ura3-52 leu2-3,112 sup45::HIS3MX [pRS316-SUP45] [psi] [PIN⁺]</i>	[Barbitoff et al., 2021]	Лабораторная коллекция
74-D694	<i>MATα ade1-14(UGA) trp1-289(UAG) ura3-52 his3-Δ200 leu2-3,112 [psi-] [PIN⁺]</i>	[Chernoff et al., 1995]	Лабораторная коллекция
10560-23C	<i>MATα ura3-52 his3::hisG leu2::hisG</i>	[Robertson, Fink, 1998]	Предоставлен Н.-У. Mösch
10560-6B	<i>MATα ura3-52 his3::hisG leu2::hisG trp1::hisG</i>	[Lo et al., 1997]	Предоставлен Н.-У. Mösch
BY4742	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0</i>	[Brachmann et al., 1998]	Предоставлен Y.I. Pavlov
S1 (S288C)	<i>MATα SUC2 gal2 mal2 mel flo1 flo8-1 hap1 ho bio1 bio6</i>	[Mortimer, Johnston, 1986; Strope et al., 2015]	Предоставлен J. McCusker
1B-D1606	<i>MATα ade1-14(UGA) his7-1(UAA) lys9-A21(UAA) trp1-289(UAG) ura3-52 leu2-3,112 gal10-1B</i>	[Moskalenko et al., 2003]	Лабораторная коллекция
U-14-D1690	<i>MATα ade1-14(UGA) trp1-289(UAG) his3-Δ200 lys2 ura3-52 leu2-3,112 SUP35::HIS3MX [pRSU2-SUP35]</i>	[Maksiutenko et al., 2021]	Лабораторная коллекция

Штаммы 74-D694 и U-1A-D1628 (**рис. 12**) близкородственны, но не изогенны и различаются по возможности синтезировать различные аминокислоты. Как 74-D694,

так и штамм U-1A-D1628 часто используют для изучения дрожжевых прионов и амилоидов [Chernoff et al., 1995; Newnam et al., 1999; Wang et al., 2017].

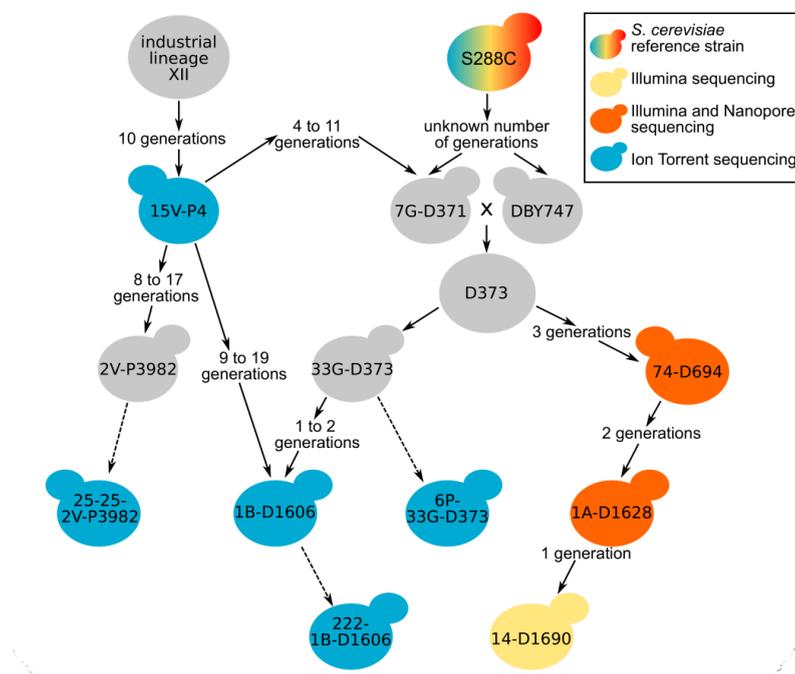


Рисунок 12. Происхождение штаммов ПГК (модифицировано из Drozdova et al., 2016a).

Штамм U-1A-D1628 с делецией хромосомного гена *SUP45* и нонсенс-мутациями разных типов традиционно используется для исследований терминации трансляции [Le Goff et al., 2002; Moskalenko et al., 2003; Petrova et al., 2015]. На основе штамма 1B-D1606 [Moskalenko et al., 2003] были получены жизнеспособные клетки, несущие нонсенс-мутантные аллели *sup45-n* на хромосоме (обозначенные в данной работе как n-1B-D1606), использованные в данной работе.

Аллели *his7-1* и *lys9-A21* содержат преждевременный стоп-кодон UAA [Самбук, Тер-Аванесян, 1980; Chabelskaya et al., 2007] аллель *ade1-14* — UGA [Bertram et al., 2000], а аллель *trp1-289* — UAG [Chabelskaya et al., 2007]. Эти мутации приводят к ауксотрофности по гистидину, лизину, аденину, лизину, треонину и триптофану соответственно. Инсерция двух гуаниловых нуклеотидов *leu2-3,112* [Meira et al., 1995] приводит к ауксотрофности по лейцину и позволяет использовать плазмидные векторы с селективным маркером *LEU2*. Вставка транспозона *ura3-52* [Rose, Winston, 1984] приводит к ауксотрофности по урацилу и позволяет использовать ген *URA3* в качестве селективного маркера.

Для наработки плазмидной ДНК в работе был использован бактериальный штамм DH5 α *supE44 Δ lacU169 (ϕ 80 *lacZ* Δ M15) *hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1** [Hanahan, 1983]

2.2. Среды и условия культивирования

Для выращивания дрожжевых культур была использована стандартная питательная среда YEPD. В селективных условиях для выращивания культур использовали синтетическую среду SC [Kaiser et al., 1994] на основе YNB (Difco или Invitrogen). Синтетическая среда без урацила и лейцина содержала следующие добавки: 40 мг/л аденина, 20 мг/л L-гистидина, 20 мг/л L-лизина, 20 мг/л L-метионина, 20 мг/л L-треонина, 20 мг/л L-триптофана. Полная среда SC дополнительно содержала 20 мг/л урацила и 20 мг/л L-лейцина. Для замещения плазмид использовали селективную среду, содержащую 1 мг/мл 5-фтороротовой кислоты (5-ФОК) [Kaiser et al., 1994]. Инкубацию штаммов дрожжей на среде с 5-ФОК осуществляли для отбора клеток, которые потеряли плазмиду несущую селективный маркер *URA3* в течение 4-5 дней.

Для выращивания бактерий использовалась полная среда LB [Sambrook et al., 1989], для селективного выращивания клеток, несущих плазмиды с маркерным геном *ampR*, использовалась LB с добавлением ампициллина в количестве 50 мкг/мл. Твердая среда отличалась от жидкой содержанием 2% агара. При культивировании в жидких средах количество оборотов на термостатируемой качалке для дрожжевых клеток составляло 200 об/мин, для бактериальных клеток — 250 об/мин. Штаммы дрожжей культивировали при 30°C или 26°C (для экспериментов со штаммами несущими мутации *sup35-n* или *sup45-n*), штаммы бактерий — при 37°C.

2.3. Плазмиды

Для трансформации штаммов 74-D694 и U-1A-D1628 были использованы плазмиды, представленные в **Таблице 2**.

Таблица 2. Плазмиды, использованные в работе.

Плаزمида	Описание	Ссылка
pRS315-SUP45	<i>LEU2, P_{SUP45}, SUP45</i>	[Le Goff et al., 2002]
pRS315-sup45-101	<i>LEU2, P_{SUP45}, sup45-101 (G796T)</i>	[Moskalenko et al., 2003]

	(E266[UAA])	
pRS315-sup45-102	<i>LEU2</i> , <i>P_{SUP45}</i> , <i>sup45-102</i> (T159A) (Y53[UAA])	
pRS315-sup45-104	<i>LEU2</i> , <i>P_{SUP45}</i> , <i>sup45-104</i> (T848A) (L283[UAA])	
pRS315-sup45-105	<i>LEU2</i> , <i>P_{SUP45}</i> , <i>sup45-105</i> (G1153T) (E385[UAA])	
pRS315-sup45-107	<i>LEU2</i> , <i>P_{SUP45}</i> , <i>sup45-107</i> (T950G) (L317[UGA])	
pRSU1	<i>LEU2</i> , <i>ampR</i> , <i>P_{SUP35}</i> , <i>SUP35</i>	[Volkov et al., 2002]
pRSU1-21	<i>LEU2</i> , <i>P_{SUP35}</i> , <i>sup35-21</i> (C1264T) (Q422[UAA])	[Chabelskaya et al., 2004]
pRSU1-74	<i>LEU2</i> , <i>P_{SUP35}</i> , <i>sup35-74</i> (C388T) (Q130[UAA])	
pRSU1-218	<i>LEU2</i> , <i>P_{SUP35}</i> , <i>sup35-218</i> (G541T) (E181[UAA])	
pRSU1-240	<i>LEU2</i> , <i>P_{SUP35}</i> , <i>sup35-240</i> (C166T) (Q56[UAA])	

2.4. Генетические и микробиологические методы

В работе использовали стандартные генетические методы: метод отпечатков и истощающего штриха [Захаров и др., 1984].

Для изучения адаптации клеток дрожжей к нонсенс-мутациям в генах факторов терминации трансляции и оценки числа копий плазмид, несущих нонсенс мутантные аллели *sup45-n* и *sup35-n* был использован метод плазмидного шаффлинга в сочетании с методом селективных сред. Штамм, содержащий аллель гена *SUP45* или *SUP35* дикого типа на плазмиде с селективным маркером *URA3* трансформировали либо вектором, содержащим селективный маркер *LEU2* и несущим аллель дикого типа гена *SUP45* или *SUP35*, либо плазмидами, содержащими мутации *sup45-n* и *sup35-n*. Трансформацию дрожжей *S. cerevisiae* (**Таблица 1**) проводили согласно методике [Kaiser et al., 1994]. Трансформированные штаммы высевали на твердую синтетическую среду без урацила и лейцина, инкубировали в течении 4-5 дней при

температуре 30°C. Затем отбирали трансформантов, содержащих две плазмиды и переносили на среду содержащую 5-ФОК, и инкубировали в течении 4-7 дней при температуре 26°C для потери плазмиды с маркером *URA3*, несущей аллель дикого типа *SUP35* или *SUP45*. Потерю плазмиды проверяли при помощи посева клеток на синтетические среды, не содержащие отдельных аминокислот: урацила, лейцина или аденина. Обратное замещение плазмид, содержащих мутантные аллели *sup35-n* или *sup45-n* на аллели дикого типа *SUP35* или *SUP45* проводили по такой же схеме.

Бактериальную трансформацию с использованием компетентных клеток и плазмид, перечисленных в **Таблице 2**, проводили по протоколу [Inoue et al.,1990].

2.5. Анализ инвазивного роста

Анализ инвазивного роста дрожжей проводили в соответствии с ранее описанной методикой [Roberts, Fink, 1994]. Штаммы высевали на чашки со средой среду YEPD зубочисткой. Перед анализом инвазивного роста чашки инкубировали в течение 5 дней при 30°C, а затем в течение 2 дней при комнатной температуре. Неадгезивные клетки смывали с агара слабой струей воды, оставляя подповерхностные клетки, проникшие в агар. Чашки фотографировали до и после смыва. Анализ был выполнен в трех повторностях.

2.6. Молекулярно-биологические методы

В работе использовали стандартные молекулярные методы: выделение плазмид, рестрикцию плазмидной ДНК, полимеразную цепную реакцию, электрофорез ДНК в агарозном геле и другие [Roberts, Fink, 1994].

2.6.1. Праймеры, использованные в работе

Таблица 3. Праймеры, использованные в работе

Пары праймеров	Последовательность
ASG1-2107-F-NcoI	GCAACCCATGGTATTCTTTTCTTCCCAGGATACGAAG
ASG1-R-SacII	GATACCGCGGTCCTTCAGAGGGGTAATTTAAAGGTAGGTA
GAL11-1684-F	CCACAAGTCTACATCATCACAAG

GAL11-2431-R	GAGAAGGATTTGTATTTGGGGTTG
DDR48-F-BamHI DDR48-R-SacII	AAAAGGATCCATGGGTTTATTTGATAAAGTGAAGCA ATCCCCGCGGTCCGTAATCGTCGTCACCACCG
MF(ALPHA)1_pro-F MF(ALPHA)1_out-R-SalI	ACAACAGGTTTTGGATAAGTACAT CAAAGTCGACTTTGTTACATCTACAC
Sch9-F-SpeI Sch9-R-402-BamHI	CGAATAACTAGTATGATGAATTTTTTTACATCAAAATCG GATTGGGATCCCGTGTCTGTTTGTAAGTCCATTG
NSP1-963-F NSP1-2132-R	ATAAGACAACAAACACAACCCC ACTGACTAATTTGTTACCTCC
FLO5start-F (1) FLO5-5B (2)	AAAAATGCCTGTGGCTGCTC GTTGACCGTTGGTACCGGT
FLO5start-F (1) CSS1inner-R (4)	AAATGACAATTGCACACCACTG GATGCTGAAGAAGTAATGGAACTCA
CSS1start-F (3) CSS1inner-R (4)	ATGTTCAATCGTTTAAACAAATTCCAAG GATGCTGAAGAAGTAATGGAACTCA
FLO10start-F (5) FLO10-547-R (6)	AAAAATGCCTGTGGCTGCTC CCAACCGATAAAATTGCTGAATC
FLO10-2663-F (7) YPR195Cout(-1467)-F (8)	CAAGGAAACCATGTCGTCTGA TACAAGTTGAGGGTGTAAGTACTGAG
CUP1-RT-FW CUP1-RT-RV	AAGGTCATGAGTGCCAATGC ATTTCCCAGAGCAGCATGAC
ACT1-F ACT1-R	TAACGGTTCTGGTATGTGTAAAGC GCTTCATCACCAACGTAGGAGTC
bla_F bla_R	ATAAATCTGGAGCCGGTGAG CTACGATACGGGAGGGCTTA
SUP45_F SUP45_R	CGATCCAAGACTAGCATGTAAG CTTGAACATACTTGACATTGGC

SUP35_F	ACAACAAGGTAACAACAGATACC
SUP35_R	GGATTGAATTGCTGCTGATAAC
F-ADH1-RT	CAAGTCGTCAAGTCCATCTC
R-ADH1-RT	GTAGACAAGCCGACAACCT
COX3_F	TTGAAGCTGTACAACCTACC
COX3_R	CCTGCGATTAAGGCATGATG

2.6.2. ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ)

Число копий целевых фрагментов генома анализировали с помощью количественной ПЦР. Реакции и количественный анализ проводили с использованием амплификатора CFX96 (Bio-Rad, Hercules, Калифорния, США). Для количественной ПЦР в режиме реального времени использовали 2,5x реакционную смесь с красителем EVA Green (Синтол); праймеры в количестве по 10 пМ на 20 мкл реакционной смеси; 1 мкл полученной ДНК (в концентрации 500 нг на мкл) или кДНК (в концентрации 100-150 нг на мкл). Цикл количественного определения *ACT1* использовался в качестве референса для оценки числа копий плазмид при помощи праймеров bla_F и bla_R, (Таблица 3). Для оценки экспрессии генов *SUP35* (праймеры SUP35_F, SUP35_R) и *SUP45* (праймеры SUP45_F, SUP45_R) в клетках, содержащих мутантные аллели *sup35-218* и *sup45-105* в качестве референсного гена во всех случаях использовали *ADH1*. Для каждой биологической повторности (не менее трех, однако количество варьировалось в зависимости от эксперимента) проводили три технических повторности количественной ПЦР. ПЦР осуществляли по следующей программе: 95 градусов в течение 5 минут; 39 циклов (95 градусов - 15 секунд, 55 градусов - 30 секунд, 72 градуса - 30 секунд); 95 градусов - 10 секунд; 65 градусов - 5 секунд. Для количественных расчетов результатов ПЦР три технических повторности, в составе одной биологической, объединяли и вычисляли среднее, после чего использовали метод $\Delta\Delta C_T$ [Livak, Schmittgen, 2001]. Полученные значения были использованы для оценки количества копий генов *COX3*, *SUP35*, *SUP45* и кластеров *CUP1*. Статистическую значимость полученных результатов оценивали с использованием критерия Вилкоксона-Манна-Уитни. Для оценки корреляции полученных результатов использовали коэффициент корреляции Пирсона.

2.6.3 Выделение геномной ДНК из клеток дрожжей с помощью смеси фенола и хлороформа

Для выделения геномной ДНК использовали жидкую культуру клеток дрожжей в логарифмической стадии роста. Ночную культуру разбавляли жидкой средой YEPD, SC или SC без урацила и лейцина до объема 10 мл. Среду YEPD использовали для выделения из клеток геномной ДНК для последующего секвенирования, клетки растили до $OD_{595} \sim 0,5-0,6$ (iMark Absorbance Reader, BioRad). В среде SC культивировали клетки, несущие плазмиды с урациловым или лейциновым селективными маркерами, геномная ДНК которых использовалась для ПЦР-РВ. Среду SC без урацила и лейцина использовали в случае клеток, несущих плазмиды как с урациловым, так и лейциновым селективными маркерами. В среде SC и SC без урацила и лейцина клетки растили до $OD_{595} \sim 0,3-0,4$ (iMark Absorbance Reader, BioRad). Клетки собирали центрифугированием на скорости 7 тыс. g (~50 мг клеток) и добавляли к ним 1 мл смеси 0,9 М сорбитола и 0,1 М ЭДТА (данная смесь позволяет поддерживать тургорное давление сферопластов после разрушения клеточной стенки). Затем для разрушения клеточной стенки к смеси добавляли 5 мкл зимолиазы (Zymolyase-20T) в концентрации 12 мг/мл. Смесь аккуратно перемешивали и затем инкубировали на водяной бане при температуре 37°C в течение 1 часа. Пробы периодически перемешивали. После инкубации сферопласты собирали центрифугированием при 6 тыс. g в течение 3 минут. Для лизиса клеток в пробу добавляли 0,5 мл TLB (0,4 М NaCl; 0,1 М Трис-HCl (pH 8,0); 2 мМ ЭДТА pH 8,0; 2% SDS) и 1 мкл РНКазы А с концентрацией 10 мг/мл (Thermo Scientific), полученную смесь инкубировали при 37°C в течение 1 часа.

Для очистки ДНК добавляли 0,5 мл фенола (фенол предварительно насыщали буферным раствором, содержащим 0,1 М Трис-HCl, pH 7,6). Полученную смесь перемешивали на шейкере, водную и фенольную фракцию разделяли методом центрифугирования при 20 тыс. g в течение 4 минут при +4°C. Затем отбирали 0,5 мл верхней фракции и помещали в новую микропробирку, туда же добавляли 250 мкл фенола и 250 мкл хлороформа (смесь хлороформа с изоамиловым спиртом в соотношении 24:1) и перемешивали. Пробы центрифугировали при 20 тыс. g в течение 4 минут. Затем отбирали 0,5 мл верхней фракции и перемещали в новую микропробирку, к пробе добавляли 50 мкл 3 М NaAc и 1 мл 96% этанола и оставляли

при -80°C на 40 минут. После этого ДНК собирали центрифугированием на скорости 20 тыс. g в течение 10 минут при $+4^{\circ}\text{C}$. К осадку ДНК добавляли 0,5 мл 70% холодного этанола и центрифугировали в том же режиме. Далее к осадку добавляли 0,5 мл 96% спирта и центрифугировали на скорости 20 тыс. g в течение 12 минут при $+4^{\circ}\text{C}$. Осадок ДНК сушили при 50°C в течение 5 минут. Далее ДНК растворяли в 100 мкл деионизированной воды и затем добавляли 1 мкл РНКазы А (Thermo Scientific) с концентрацией 10 мг/мл и ставили инкубироваться при комнатной температуре на ночь.

После инкубации к пробе добавляли 100 мкл воды, 100 мкл фенола и 100 мкл хлороформа. Смесь встряхивали и центрифугировали 4 минуты на скорости 12 тыс. g. Затем отбирали верхнюю фракцию и переносили в новую пробирку, дальнейшее осаждение ДНК проводили, как описано ранее (добавляли 1/10 объема 3М NaAc pH 5,3 и 2,5 объема 96% этанола, предварительно охлажденного до -20°C). Затем ДНК высушивали и добавляли 30 мкл воды.

2.6.4 Полногеномное секвенирование

Для проведения секвенирования генома дрожжевых клеток методом использовали ДНК, выделенную по вышеописанной методике.

Секвенирование штаммов 74-D694 и U-1A-D1628 (эксперимент проведен А.В. Предеусом и А.Я. Белявской) проводили с использованием секвенатора Oxford Nanopore MinION с проточными ячейками 9.4.1 и набора реактивов SQK-LSK109. Общий объем полученных прочтений составил 10 Гб для штамма U-1A-D1628 и 7,5 Гб для штамма 74-D694. При расчетном размере генома в 12,2 Мб это соответствовало примерно 800-кратному покрытию для штамма U-1A-D1628 и \sim 600-кратному покрытию штамма 74-D694.

Для штаммов 74-D694 и U-1A-D1628 также осуществляли секвенирование при помощи коротких прочтений Illumina, фрагментировали 500 нг ДНК с помощью NEBNext dsDNA Fragmentase (NEB, США) в соответствии с рекомендациями производителя. Затем очищали фрагментированную ДНК с использованием гранул Ampure XP (Beckman, США) и готовили библиотеки ДНК с помощью набора для подготовки библиотек Кара НТР (Roche, Швейцария) в соответствии с оригинальным протоколом. Было использовано 6 циклов ПЦР для окончательной амплификации библиотеки и проведен отбор по размеру (550 п.н). Библиотеку ДНК дрожжей

секвенировали на платформе Illumina HiSeq 2500 в режиме парных прочтений с длиной считывания либо 2*130, либо 2*150 п.н.

Для штаммов n-1B-D1606, несущих мутантные аллели *sup45-n* и *sup35-n* секвенирование библиотек ДНК также осуществляли на платформе Illumina HiSeq 2500 в режиме парных прочтений с длиной считывания 2*150 п.н.

В данной работе были просеквенированы геномы 100 штаммов, несущих аллели дикого типа или мутантные аллели генов *SUP45* и *SUP35* (рис. 13).

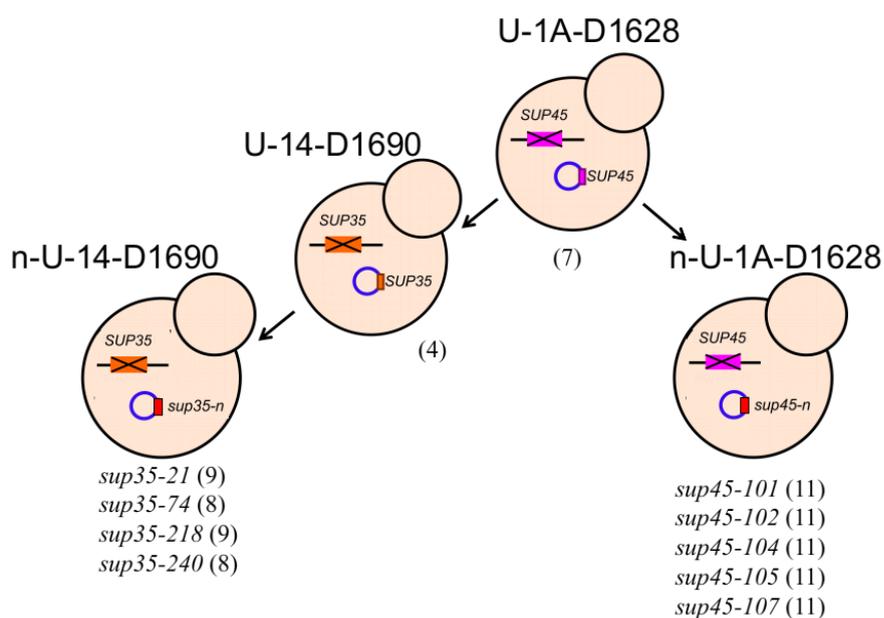


Рисунок 13. Схема отбора штаммов несущих аллели дикого типа или мутантные аллели генов *SUP45* и *SUP35*. В скобках приведено количество просеквенированных клонов.

Для каждой аллели *sup45-n* отбирали 8 независимых колоний методом спонтанной потери плазмиды (на среде YEPD) и ещё 3 — на средах, содержащих 5-ФОК. Для каждой аллели *sup35-n* путем спонтанной потери плазмиды с аллелью *SUP35* дикого типа отбирали 8 (в случае *sup35-74* и *sup35-240*) или 9 (в случае *sup35-21* и *sup35-218*) независимых колоний. Наряду со штаммами, несущими аллели *sup45-n* и *sup35-n*, мы секвенировали геномы 7 независимых клонов, несущих плазмиду, содержащую аллель *SUP45* дикого типа, и 4 клонов, несущих плазмиду, содержащую аллель *SUP35* дикого типа.

2.6.5 Выделение РНК из клеток и получение кДНК

Для выделения РНК культуру клеток дрожжей выращивали в объеме 30 мл в селективной среде SC (полной или без урацила и лейцина) до $OD_{595} \sim 0,4-0,45$ (iMark Absorbance Reader, BioRad) после чего клетки собирали центрифугированием при 8 тыс. g в течение 5 минут и промывали в охлажденной воде. Тотальную дрожжевую РНК выделяли с помощью GeneJET RNA Purification Kit (Thermo Scientific) и обрабатывали ДНКазой I (RapidOut Набор для удаления ДНК, Thermo Scientific) в соответствии с инструкциями производителя. Концентрацию и качество РНК оценивали с помощью спектрофотометра NanoDrop (Thermo Scientific).

Для постановки ПЦР в реальном времени и дальнейшей оценки экспрессии аллелей *sup35-218* и *sup45-105* очищенная РНК в концентрации примерно 200 нг на мкл была обратно транскрибирована с помощью набора RevertAid RT Reverse Transcription Kit (Thermo Scientific) согласно инструкции производителя. Синтез кДНК осуществляли при следующих условиях: 25°C в течение 5 мин, 42°C в течение 60 мин и завершение синтеза при 70°C в течение 5 мин.

2.6.6 Секвенирование транскриптома (RNA-seq)

Для проведения секвенирования транскриптома дрожжевых клеток методом RNA-seq использовали РНК, выделенную по вышеописанной методике. Подготовку библиотек для секвенирования осуществляли с использованием секвенатора HiSeq2500 и следующих реактивов: набора NEBNext Ultra II Directional для создания библиотек РНК для платформы Illumina с магнитными шариками для очистки и набора 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».

2.7. Биоинформатический анализ данных

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

Для проведения сборки генома дрожжей из данных, полученных на платформе ONT, в начале определяли последовательность прочтений по исходному сигналу прибора (в формате fast5) с использованием высокоточного режима guppy v. 3.1.5. Полученные таким образом прочтения в формате FASTQ использовали для проведения сборки с помощью нескольких инструментов: canu v. 1.8 [Koren et al., 2017] с предустановками по умолчанию для необработанных прочтений Oxford Nanopore, а также программ Shasta [Shafin et al., 2020] и Flye [Kolmogorov et al., 2019]. Полученные черновые сборки (в случае использования метода canu) подвергали двухстадийной корректировке с использованием исходного сигнала ONT и программы Nanopolish v. 0.9.2 (Loman et al., 2015), а также (на втором этапе) прочтений с Illumina с использованием Racon 4 v. 1.4.10 [Vaser et al., 2017].

Все полученные сборки были оценены с использованием QUAST v. 5.0.2 [Gurevich et al., 2013] и BUSCO 6 v. 4.1.2 [Waterhouse et al., 2018] с использованием справочной базы данных «*saccharomycetes_odb10*» и видового параметра «*saccharomyces_cerevisiae_S288C*» для программы AUGUSTUS [Stanke et al., 2004].

2.7.2 Анализ генетических различий в штаммах, несущих различные аллели

sup45-n или *sup35-n*

Для поиска генетических вариантов в геномах штаммов, несущих аллели *sup45-n* и *sup35-n*, проводили анализ данных полногеномного секвенирования этих штаммов. На первом этапе обработки данных (рис. 14) осуществляли выравнивание коротких прочтений на полученную референсную последовательность генома U-1A-D1628 или последовательность плазмид pRS315, pRSU1 (для поиска вариантов в остове данных плазмид). Для выравнивания использовали алгоритм BWA MEM [Li, Durbin, 2009], сортировку и индексирование осуществляли при помощи SAMtools [Li et al., 2009]. Для начального анализа покрытия использовали qualimap v.2.2.2 [Okonechnikov, Conesa, García-Alcalde, 2016]. При помощи инструмента Genome Analysis ToolKit (GATK) [Van der Auwera et al., 2013] v. 4.1.9.0 осуществляли объединение результатов выравнивания

данных, полученных на разных дорожках прибора для одного образца, после чего маркировали оптические и ПЦР дубликаты.

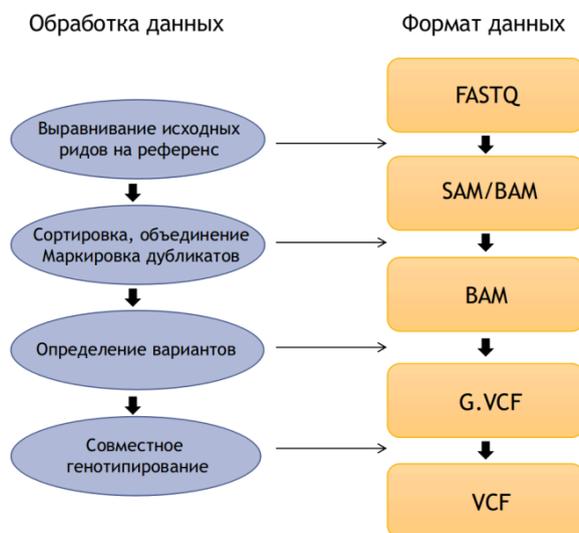


Рисунок 14. Схема поиска вариаций в последовательности плазмид и в геноме штаммов дрожжей несущих мутантные аллели *sup45-n* и *sup35-n*.

Для последующего определения коротких (до 40 п.н.) генетических вариантов использовали GATK HaplotypeCaller (в режиме ERC GVCF). Полученный набор файлов формата `.g.vcf`, описывающих все потенциальные отклонения от референсной последовательности в каждом образце, объединяли в единый `.g.vcf` файл и обрабатывали инструментом GATK GenotypeGVCF для совместного генотипирования образцов.

2.7.3 Анализ дифференциальной экспрессии генов

На первом этапе проводили качественный анализ данных (FastQC). Парные риды выравнивали при помощи утилиты Hisat2 [Kim et al., 2019]. В качестве референса использовали последовательность генома штамма S288C (R64-3-1), а также его аннотацию. Далее осуществляли подсчет уровней экспрессии с использованием программы featurecounts [Liao, Smyth, Shi, 2014]. Анализ дифференциальной экспрессии выполнялся в R v4.1.1 при помощи пакета DESeq2 (v1.34.0) [Love et al., 2014]. Коррекцию “батч эффекта” (влияние небиологических факторов на результат эксперимента) проводили на `log`-трансформированной матрице с помощью функции `comBat` из пакета `sva` R (<https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/sva.html>).

Анализ обогащения набора генов проводили с использованием базы данных Gene Ontology (<http://geneontology.org/>).

3. РЕЗУЛЬТАТЫ

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

Отправной точкой данной работы стало секвенирование геномов двух наиболее часто используемых 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.

Для проведения анализа нами был использован ряд различных стратегий и программ для сборки генома (canu [Koren et al., 2017], Flye [Kolmogorov et al., 2019], Shasta [Shafin et al., 2020]). В случае Flye и Shasta, в качестве входных данных использовали прочтения Oxford Nanopore, полученные при помощи программного обеспечения для перевода исходного сигнала ONT в нуклеотидную последовательность (guppy v. 5.0.11). После создания черновых сборок мы провели анализ их качества, фокусируясь в первую очередь на протяженности сборки (оцениваемой по параметру N50). Данное сравнение показало, что сборки, полученные при помощи алгоритмов Flye и canu, характеризовались высокой степенью протяженности, сходной с референсным геномом штамма S288C (**Таблица 4**). Сборки, полученные с помощью canu, характеризовались более высоким средним значением N50, но содержали большее количество коротких контигов (**рис.15**).

В связи с тем, что сборка генома при помощи canu, в отличие от Flye, не включает в себя стадию дополнительной корректировки, далее нами была осуществлена двухэтапная корректировка этих сборок при помощи программного пакета Nanopolish (с использованием исходного сигнала ONT) и программы Racon (с использованием прочтений Illumina). После проведения корректировки мы сравнили точность нуклеотидной последовательности полированных сборок Flye и canu, основываясь на среднем количестве нуклеотидных различий по сравнению с S288C и числе

универсальных однокопийных ортологов (Benchmarking Universal Single-Copy Orthologs (BUSCO)) [Simão et al., 2015] класса *Saccharomyces*. Такой анализ показал высокую степень точности всех полученных сборок; в то же время, для дальнейшего анализа, ввиду несколько большего числа обнаруженных цельных универсальных однокопийных ортологов (2124 для U-1A-D1628 и 2125 для 74-D694), были использованы сборки при помощи *canu* (Таблица 4).

Таблица 4. 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 (<i>canu</i> , черновая)	36	824	263.9	197.50	1769
74-D694 (<i>canu</i> , черновая)	31	806	291.3	230.72	1657
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 (<i>canu</i> , финальная)	32	825	257.3	36.00	2124
74-D694 (<i>canu</i> , финальная)	29	808	294.8	41.60	2125
S288C (референс)	17	924	0*	0*	2126

*-ожидаемый результат при сравнении идентичных последовательностей

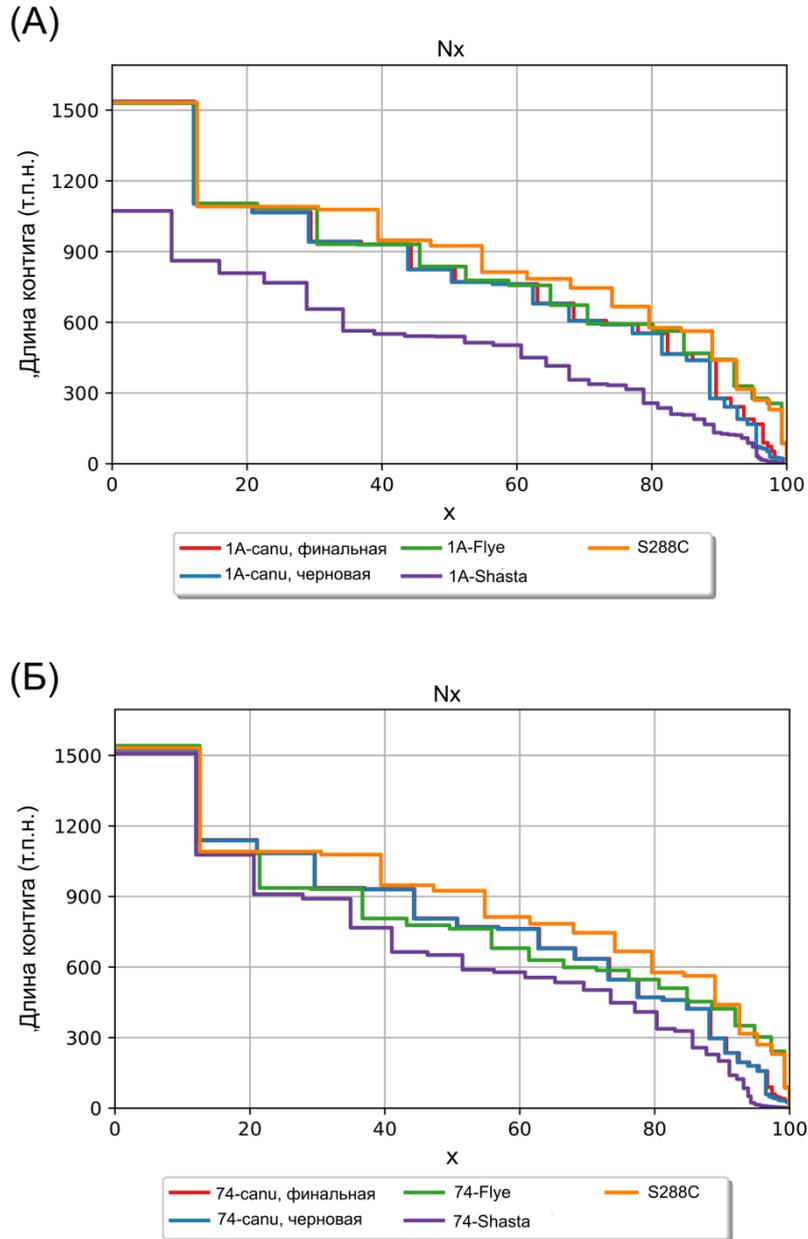


Рисунок 15. Сравнение сборок, полученных при помощи различных программ для сборки генома. Показаны графики убывания длины контига в зависимости от доли общей длины сборки (Nx). На панели А приведен сравнительный анализ для штамма U-1A-D1628. На панели Б приведен сравнительный анализ сборок, полученных для штамма 74-D694.

3.2 Сравнительный анализ генома штамма U-1A-D1628, 74-D694 и референсного штамма дрожжей S288C

Получив целостные сборки геномов изучаемых штаммов, мы приступили к сравнению этих последовательностей с референсным геномом S288C. На первом этапе мы осуществили полногеномное выравнивание, чтобы оценить структурное сходство геномов штаммов ПГК с S288C. Было обнаружено, что сборки U-1A-D1628 и 74-D694 имеют высокую степень сходства с эталонным S288C (**рис. 16**) без крупномасштабных хромосомных аномалий. Важно отметить, что все, кроме двух (в случае U-1A-D1628) или трех (в случае 74-D694) хромосом, были собраны в единый контиг.

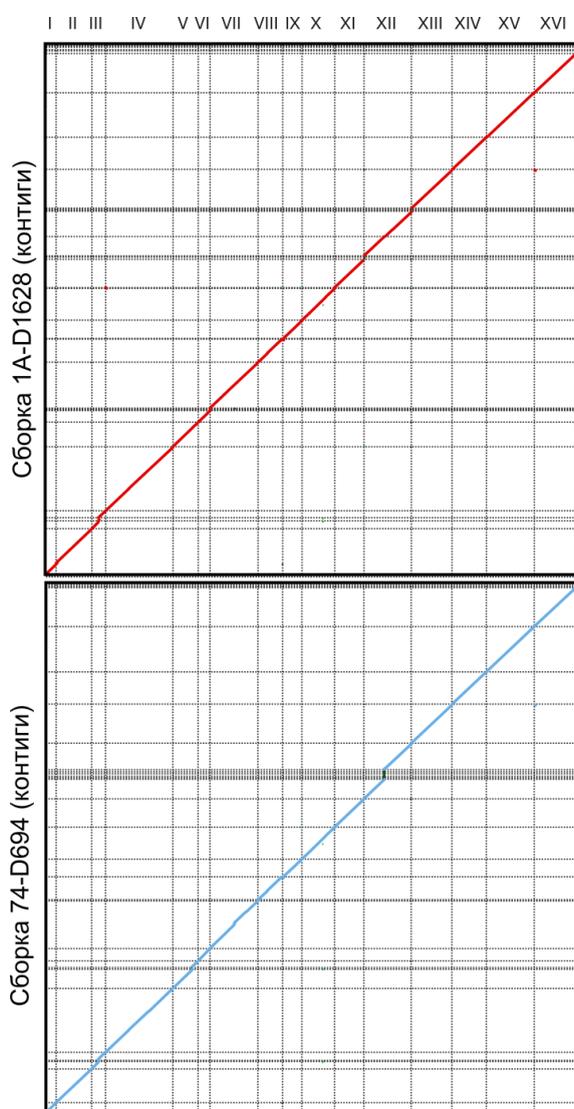


Рисунок 16. Визуализация полногеномного выравнивания сборок U-1A-D1628 и 74-D694 на геном референсного штамма S288C (по оси абсцисс). Графики были получены с использованием D-GENIES (<http://dgenies.toulouse.inra.fr>). Точки на

диаграмме обозначают соответствие между последовательностями геномов в указанном участке. Красным цветом обозначен штамм U-1A-D1628, синим 74-D694.

Поскольку данная работа сфокусирована на изучении парадокса жизнеспособных нонсенс-мутантов по жизненно важным генам факторов терминации трансляции *SUP45* и *SUP35*, мы осуществили анализ хромосомных перестроек в геномах штаммов U-1A-D1628 и 74-D694, на основе которых ранее жизнеспособные нонсенс-мутанты были получены. Для этого длинные прочтения, полученные при секвенировании генома штамма на платформе ONT, выравнивали на референсный геном S288C и производили автоматизированный поиск структурных вариаций. В результате такого анализа с последующей визуальной верификацией наличия перестройки (выполнена А.Г. Матвеевко) было обнаружено 62 различные перестройки, из которых были выбраны изменения, затрагивающие белок-кодирующие гены с известной функцией и потенциально амилоидогенные белки (Таблица 5).

Таблица 5. Структурные изменения в тандемных повторах в составе белок-кодирующих генов.

Ген	Изменение в геноме	Функция (https://www.yeastgenome.org/)
<i>SCH9</i>	VIII:509678-509725 (инсерция)	Серин/треониновая киназа, вовлеченная в регуляцию транскрипции РНК-полимеразами I, II, и III. Участвует в регуляции биосинтеза сфинголипидов, клеточном старении и ответе на осмотический и оксидативный стрессы.
<i>ASG1</i>	IX:105351-105423 (инсерция, экспансия поли-N тракта)	Белок цинкового кластера, предположительно транскрипционный регулятор, участвующий в ответе на стресс.
<i>DDR48</i>	XIII:608945-609304 (дупликация), 609644-609995 (делеция с инсерцией)	Белок реагирующий на повреждение ДНК; экспрессия возрастает в ответ на тепловой шок. Содержит повторы NNDSYGS.
<i>GAL11</i>	XV:236963-236996 (делеция в поли-Q тракте)	Субъединица РНК-полимераза II медиаторного комплекса. Коактиватор РНК-полимеразы II, участвующий в сборке преинициаторного комплекса. Связывает транскрипционные факторы TFIIIE и класс TFIIH, рекрутирует Gcn4p.
<i>MF</i> (<i>ALPHA</i>) 1	XVI:193934-193983 (инсерция)	Феромон, обеспечивающий спаривание. Также Cu^{2+} -связывающий белок. Также кодируется MF(ALPHA)2, хотя MF(ALPHA)1 продуцирует больше альфа-фактора.

<i>NSP1</i>	X:367389-367446 DEL	FG-нуклеопориновый компонент ядерного порового комплекса (NPC), является частью ядерной корзинки. Мутации в <i>NSP1</i> или нехватка Nsp1p вызывают нарушения импорта белков в ядро.
-------------	---------------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Для дальнейшей валидации полученных данных мы повторно выделили геномную ДНК из клеток изучаемых штаммов и провели серию экспериментов на основе ПЦР с предварительно подобранными парами праймеров (см. Материалы и методы). В результате анализа длины ПЦР-продуктов, полученных при амплификации участков структурных перестроек (Таблица 5), во всех случаях было подтверждено наличие предполагаемых хромосомных перестроек (рис. 17). Помимо анализа размера ПЦР-продукта, нами также было проведено его секвенирование (анализ выполнен на платформе РЦ “Развитие молекулярных и клеточных технологий”) для дополнительной проверки полученных результатов.

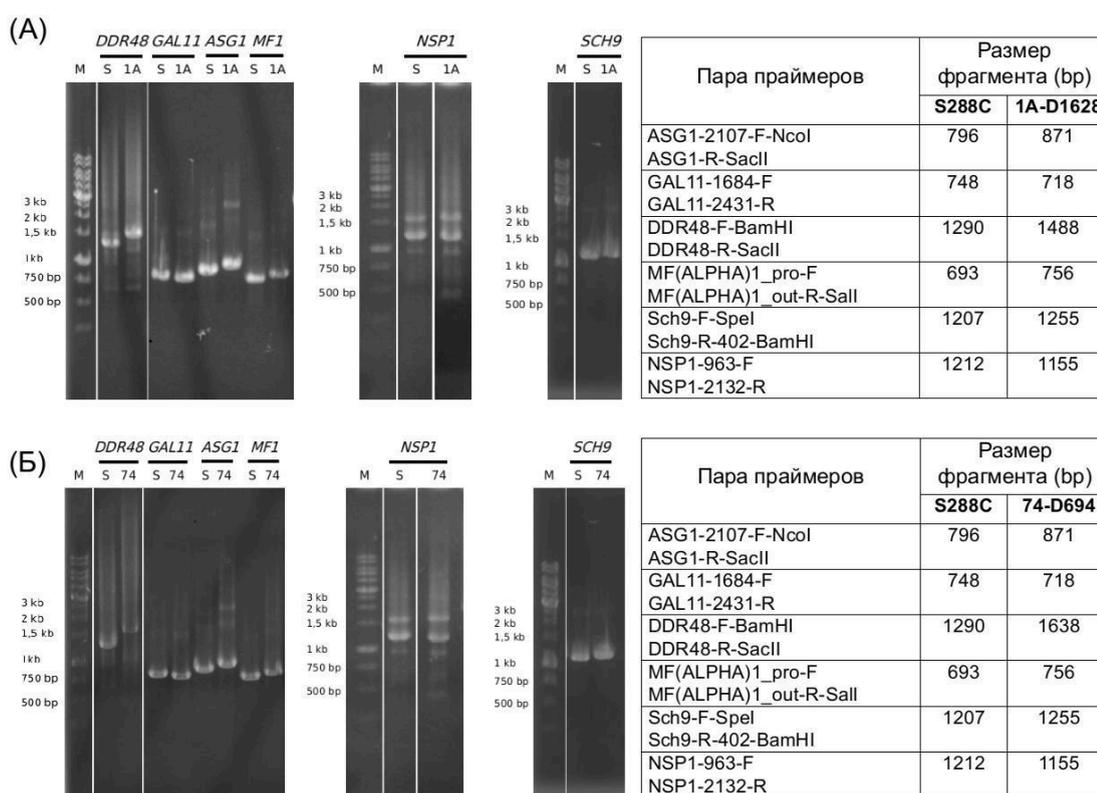


Рисунок 17. Проверка структурных вариантов в штаммах А) U-1A-D1628 и Б) 74-D694 при помощи ПЦР. S, 74 и 1A соответствуют геномной ДНК штаммов S288C, 74-D694 и U-1A-D1628, используемой в качестве матрицы; М - маркер молекулярной массы ДНК (SibEnzyme, 1kb). Справа от электрофореграмм представлены таблицы, иллюстрирующие ожидаемые размеры фрагментов, при использовании различных пар праймеров.

Помимо структурных перестроек, мы обратили внимание на перестройки, затрагивающие кластер генов метаболизма меди *CUP1*, а также реципрокные транслокации, происходящие в теломерных и субтеломерных участках, которые затрагивают последовательности генов *FLO*, кодирующих гены, контролирующие инвазивный рост и флокуляцию.

В рамках биоинформатического анализа (анализ проведен А.Г. Матвеевко) обнаруженных ранее структурных перестроек геномов штаммов ПГК было выявлено несколько транслокаций между хромосомами I, VIII, IX, XI и XVI. По аналогии с верификацией перестроек в белок-кодирующих генах, нами были подобраны праймеры для подтверждения наличия вышеуказанных перестроек (**рис. 18 А**). Используя данные пары праймеров, мы подтвердили наличие всех предполагаемых транслокаций в геномах штаммов с использованием ПЦР (**рис. 18 Б,В**). Транслокации, затрагивающие гены флокулинов *FLO*, могут нарушать способность этих генов контролировать инвазивный рост и флокуляцию. Чтобы оценить функциональность генов *FLO* у штаммов U-1A-D1628 и 74-D694, мы провели анализ инвазивного роста, сравнивая способность вращаться в агар у штаммов U-1A-D1628 и 74-D694 с дополнительной экспрессией генов *FLO* и без нее. Для этого штаммы U-1A-D1628 и 74-D694 трансформировали плазмидами, полученными из дрожжевой геномной коллекции YSC4613 Yeast Genome Tiling Collection [Jones et al., 2008] и несущими различные гены *FLO* (*FLO1*, *FLO5*, *FLO8* и *FLO11*). Мы использовали два производных штамма Sigma 1278b в качестве положительного контроля для сравнения (эти штаммы характеризуются высокой способностью к инвазивному росту [Lo et al., 1997; Robertson, Fink, 1998]). Наш анализ показал, что ни U-1A-D1628, ни 74-D694 не могут эффективно проникать в агар даже при дополнительной экспрессии генов *FLO* (**рис. 18 Г**). Стоит отметить, что в двух повторностях эксперимента экспрессия гена *FLO1* частично восстанавливала фенотип; однако этот результат не удалось воспроизвести во всех шести биологических повторностях. Следовательно, мы можем заключить, что структурные изменения в субтеломерных последовательностях привели к почти полной инактивации генов *FLO* в штаммах Петергофской генетической коллекции.

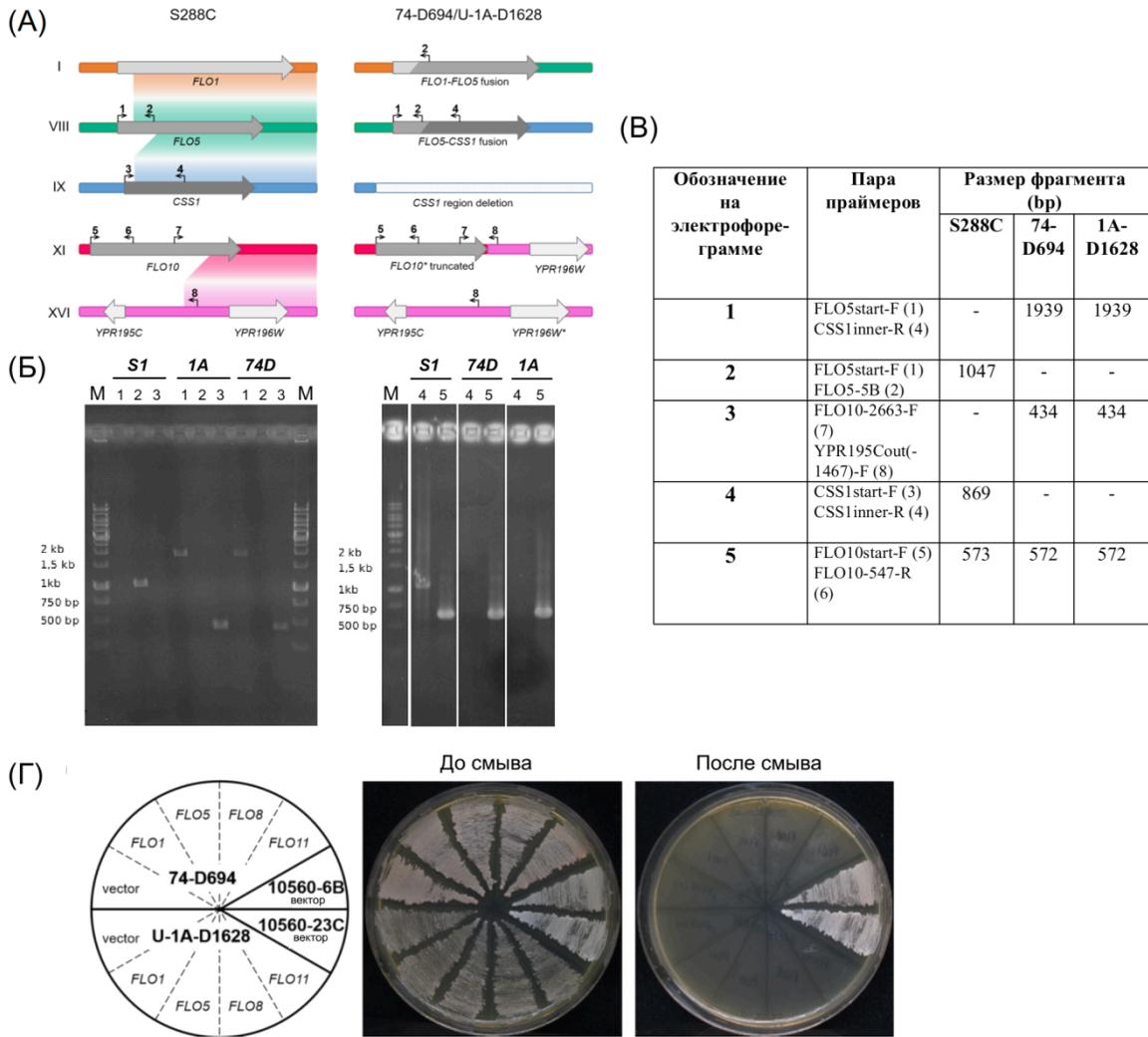


Рисунок 18. Транслокации в генах *FLO*. А) Транслокации в штаммах 74-D694 и U-1A-D1628, влияющие на гены *FLO*. Поля градиентного цвета отображают возможные варианты транслокаций между хромосомами. Гены, не функциональные из-за мутаций сдвига рамки считывания, отмечены звездочкой. Праймеры, соответствующие номерам, перечислены в Таблице 1 (раздел Материалы и Методы). Б) Подтверждение обнаруженных транслокаций в генах *FLO* с помощью ПЦР. S, 74 и 1A соответствуют геномной ДНК S1, 74-D694 и U-1A-D1628, используемой в качестве матрицы; М — маркер молекулярной массы ДНК (SibEnzyme, 1kb). Номера соответствуют праймерам, обозначенным в таблице (B). В) Таблица, иллюстрирующая ожидаемые размеры фрагментов, при использовании различных пар праймеров. Г) Оценка инвазивного роста дрожжей при помощи смыва. На рисунке представлены фотографии чашек до и после смыва соответственно. Штаммы 10560-23C и 10560-6B растут в агар и остаются на чашке даже при смывах с использованием шпателя. Штаммы U-1A-D1628 и 74-D694, трансформированные плазмидами, содержащими гены *FLO*, не растут в агар, а формируют скопления, которые полностью смываются при использовании шпателя (фотография смыва с использованием шпателя не представлена).

Известно, что в дрожжевом геноме есть несколько участков с известным естественным изменением числа копий. Эти области включают кластер генов *CUP1*, ответственный за метаболизм меди [Istace et al., 2017]. В ходе анализа данных полногеномного секвенирования штаммов ПГК (рис. 19А) была обнаружена дупликация кластера *CUP1* по сравнению со штаммом S288C. Для проверки наличия таких отличий мы проанализировали количество копий кластера генов *CUP1* в изучаемых штаммах *S. cerevisiae* при помощи метода ПЦР-РВ (рис. 19Б).

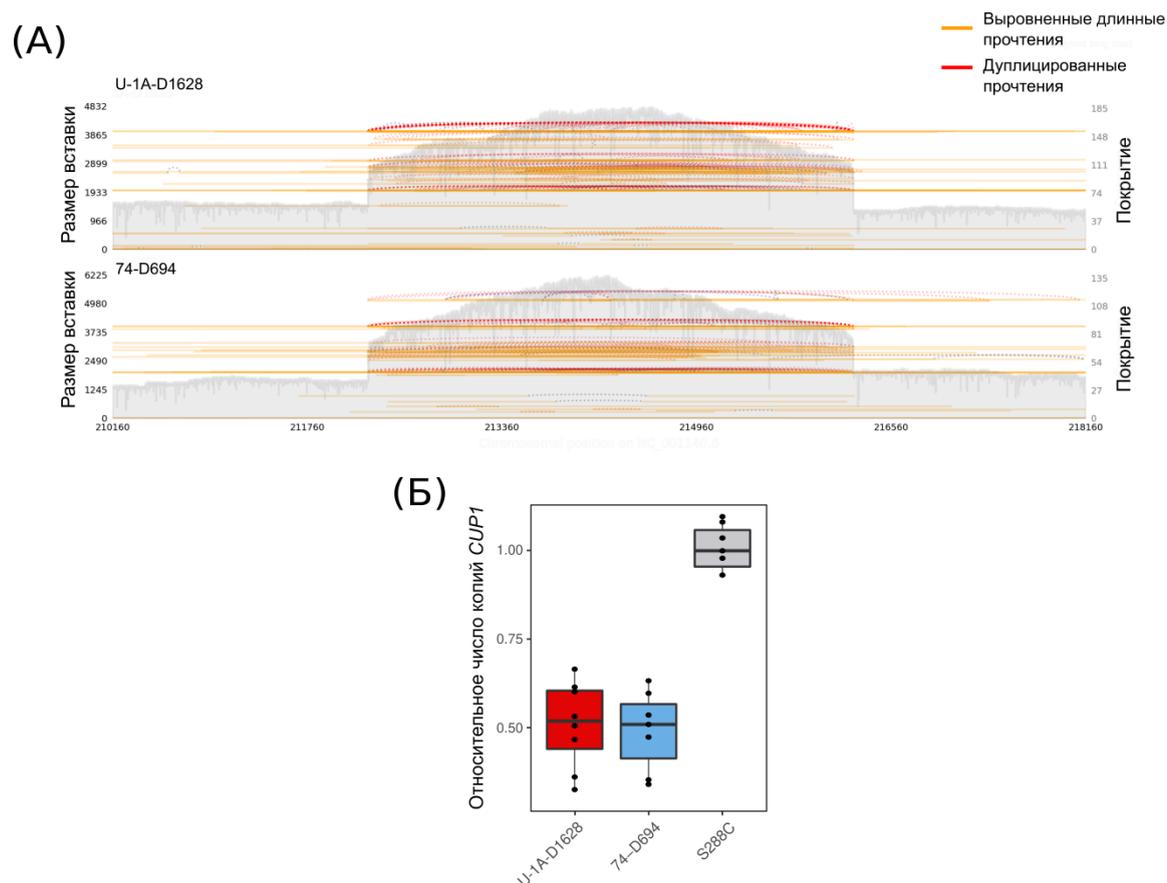


Рисунок 19. Число копий гена *CUP1* относительно референса (S288C) (А) по данным биоинформатического анализа и (Б) определенное при помощи ПЦР-РВ. Каждая точка представляет собой независимую биологическую повторность.

Мы обнаружили, что относительное количество копий гена *CUP1*, определенное с помощью ПЦР-РВ, было примерно в 2 раза ниже для штаммов U-1A-D1628 и 74-D694 по сравнению с референсным геномом S288C. Этот результат противоречит данным полногеномного анализа, согласно которому число копий этого кластера генов у штаммов ПГК повышено по сравнению с референсным геномом. В то же время, данное противоречие объясняется не ошибками биоинформатического анализа, а недостатками референсной сборки генома штамма S288C, число копий *CUP1* в которой в несколько

раз ниже значений, фигурирующих в литературных источниках. В работе 2014 года было показано, что в штамме S288C присутствует 15 копий *CUP1*, в то время как по данным SGD их всего 2 [Zhao et al., 2014]. Помимо этого фенотипический анализ устойчивости штаммов к различным концентрациям сульфата меди в среде, проведенный коллегами в нашей лаборатории, показал, что клетки U-1A-D1628 и 74-D694 имеют сниженную жизнеспособность в присутствии высоких концентраций CuSO₄ по сравнению с S288C [Barbitoff et al., 2021].

Также в результате анализа последовательностей геномов штаммов Петергофской генетической коллекции, полученных с использованием гибридной сборки из прочтений Illumina и Oxford Nanopore, мы обнаружили, что оба штамма U-1A-D1628 и 74-D694 содержат последовательности 2-микронной ДНК. Интересно, что А-форма 2-мкм плазмиды была собрана в 74-D694, а В-форма была обнаружена в U-1A-D1628. Различие форм А и В заключается в одной большой инверсии [Broach et al., 1982].

Таким образом, полногеномное выравнивание референсных сборок геномов U-1A-D1628 и 74-D694 на геном референсного штамма S288C показало отсутствие крупных структурных различий между этими геномами. Однако, несмотря на высокий общий уровень сходства геномов, нам удалось обнаружить и подтвердить несколько примечательных структурных вариаций между последовательностями геномов изучаемых штаммов.

3.3 Анализ однонуклеотидных вариаций в клетках, несущих мутантные аллели *sup45-n* и *sup35-n*

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 (см. Материалы и Методы).

Для обнаружения факторов, которые могут влиять на повышение жизнеспособности клеток, содержащих мутантные аллели генов факторов терминации трансляции, было проанализировано наличие коротких вариантов (включая

однонуклеотидные замены), инсерций и делеций в изучаемых штаммах (анализ проведен Ю.А. Барбитовым). Мы не обнаружили генетических вариантов в геноме дрожжей, которые бы наблюдались более двух раз в исследуемой выборке, за исключением точечных замен в последовательностях *SUP45/SUP35*, которые исходно присутствовали в составе соответствующей мутантной аллели.

Поскольку в нашей работе штаммы дрожжей содержали мутации *sup45-n* или *sup35-n* на плазмиде, следующим нашим шагом стало выявление однонуклеотидных вариаций непосредственно в структуре плазмид, несущих мутантные аллели *sup45-n* и *sup35-n* (в качестве референсной последовательности для анализа использовали последовательность плазмиды pRS315-SUP45 или pRSU1 соответственно). Поиск коротких вариаций производили при помощи выравнивания прочтений на последовательность соответствующей плазмиды (подробно в разделе “Материалы и методы”).

В результате проведенного анализа был обнаружен 41 вариант в последовательности плазмид, несущих аллели *sup45-n*, и 33 — в плаزمид, несущих аллели *sup35-n*, в число которых входили также мутации генов *sup45-n* (5 мутаций) и *sup35-n* (4 мутации), внесенные в ходе эксперимента. Большая часть изменений обнаруживалась в общих участках, которые присутствуют как в составе плазмиды, так и в геномной ДНК дрожжей (например, в гене *LEU2*). Однако, также было найдено небольшое количество вариантов, специфичных для остова плазмид, а также не описанных ранее замен внутри последовательностей генов *SUP45* и *SUP35*, наблюдаемых только в клетках, несущих мутантные аллели *sup45-n* и *sup35-n* (Таблица 6).

Таблица 6. Вариации в структуре остова плазмид, несущих мутантные аллели *sup45-n* и *sup35-n*.

Ген	Тип	Замена	Положение	Участок	Кол-во клонов
<i>sup45-n</i>	SNP	A → G	1715	Последовательность гена <i>SUP45</i>	55

<i>sup45-n</i>	SNP	G → T	2165	Последовательность гена <i>SUP45</i>	55
<i>sup45-n</i>	SNP	T → C	2333	Последовательность гена <i>SUP45</i>	55
<i>sup45-n</i>	SNP	T → A	2348	Последовательность гена <i>SUP45</i>	55
<i>sup45-n</i>	SNP	G → A	2573	Последовательность гена <i>SUP45</i>	55
<i>sup45-n</i>	SNP	T → C	2654	Последовательность гена <i>SUP45</i>	55
<i>sup45-101</i>	SNP	A → T	1651	Последовательность гена <i>SUP45</i>	2
<i>sup45-105</i>	SNP	A → T	891	Промотор <i>SUP45</i>	1
<i>sup45-105</i>	SNP	G → A	3380	Неаннотированный участок	1
<i>sup45-105</i>	SNP	G → A	6151	Неаннотированный участок	1
<i>sup45-105</i>	Делеция	AT → A	6352	<i>LEU2</i> терминатор	1
<i>sup35-n</i>	Инсерция	T → TCTAG	5110	Полилинкер	34
<i>sup35-74</i>	SNP	A → G	2391	Последовательность гена <i>SUP35</i>	8
<i>sup35-74</i>	SNP	A → G	2594	Последовательность гена <i>SUP35</i>	8
<i>sup35-74</i>	SNP	T → C	2800	Последовательность гена <i>SUP35</i>	8
<i>sup35-74</i>	SNP	T → C	10205	Бактериальный <i>ori</i>	8
<i>sup35-218</i>	Делеция	TTA → T	3849	Неаннотированный участок	2
<i>sup35-218</i>	Делеция	GA → G	8463	CEN/ARS	9
<i>sup35-218</i>	SNP	A → C	10117	Бактериальный <i>ori</i>	7
<i>sup35-240</i>	Делеция	TTA → T	3849	Неаннотированный участок	1

Наибольшее количество замен было обнаружено в остове плазмиды, несущей мутантную аллель *sup45-105*. Стоит упомянуть, что клетки, содержащие данную мутантную аллель, характеризуются меньшей жизнеспособностью, чем клетки с другими мутантными аллелями *sup45-n*. Также интересно отметить делецию, встречающуюся у всех образцов *sup35-218*, которая локализуется в области центромеры и ARS, что может оказывать влияние на изменение числа копий плазмиды. Однако данная вариация не была найдена в плазмидах, несущих другие мутантные аллели *sup35-n*. Остальные замены, расположенные в полилинкере и бактериальных ориджинах, предположительно, не оказывают существенного влияния на увеличение жизнеспособности изучаемых штаммов.

Несмотря на значительное общее количество обнаруженных коротких вариаций, на основе полученных данных мы не можем сделать вывод о том, что адаптация дрожжевых клеток к нарушениям в работе факторов терминации трансляции связана с дополнительными изменениями в остове плазмид, несущих мутантные аллели *sup45-n* и *sup35-n*. Вероятно, повышение жизнеспособности изучаемых штаммов, содержащих мутантные аллели *sup45-n* *sup35-n*, обусловлено другими наследуемыми факторами, не связанными с появлением однонуклеотидных вариантов в остове этих плазмид. В то же время, эффект некоторых из обнаруженных изменений (таких как делеция в CEN/ARS регионе в плазмидах, несущих аллель *sup35-218*) на воспроизведение и/или сегрегацию плазмиды может заслуживать дополнительной проверки.

3.4 Оценка изменений копийности плазмид, несущих мутантные аллели *sup45-n* и *sup35-n*

В результате биоинформатического анализа данных полногеномного секвенирования штаммов, несущих мутантные аллели *sup45-n* и *sup35-n*, было выявлено, что происходит увеличение покрытия в регионах, в которых расположены гены *SUP45* и *SUP35* (у клеток, несущих мутантные аллели *sup45-n* и *sup35-n*, соответственно) (**рис. 20**). 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 U-1A-D1628) и *pRSU1-sup35-n* (в штамме 14-D1690) соответственно.

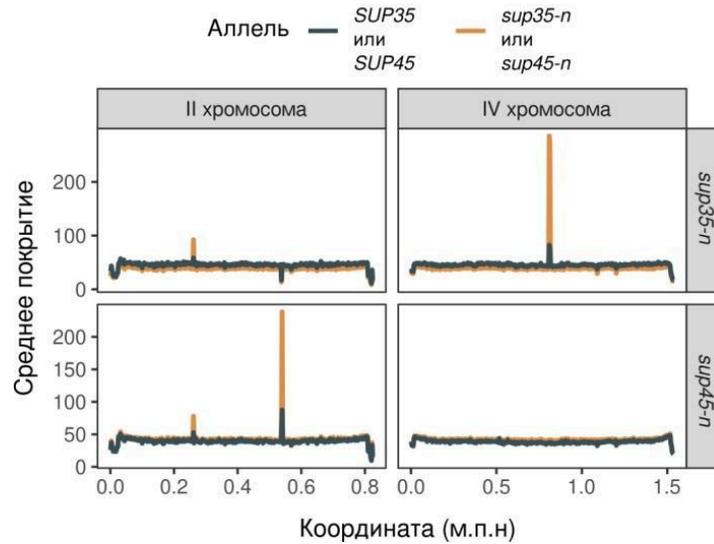


Рисунок 20. Средние профили покрытия прочтениями хромосом II и IV для штаммов, несущих аллели дикого типа и мутантные аллели *SUP45* (левая половина) или *SUP35* (правая половина). Данные о покрытии были получены с помощью программы qualimap.

Для количественной оценки изменений копийности плазмид были использованы штаммы U-1A-D1628 и U-14-D1690 с делецией *SUP45* или *SUP35*, компенсированной копией этого гена на плазмиде, несущей маркер *URA3*. Этот штамм трансформировали либо вектором, содержащим селективный маркер *LEU2* и несущим аллель дикого типа гена *SUP45/SUP35*, либо плазмидами, содержащими мутации *sup45-n/sup35-n* (2 стадия на **рис. 21**). Впоследствии штаммы, содержащие две плазмиды, выращивали на среде, содержащей 5-ФОК, для потери плазмиды с маркером *URA3*, несущей аллель дикого типа *SUP45* или *SUP35* (3 стадия на **рис. 21**).

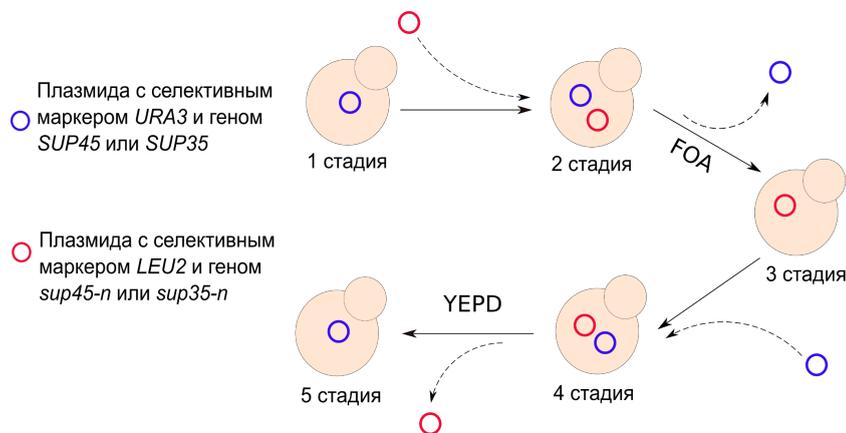


Рисунок 21. Схема эксперимента. На каждой стадии также присутствовал контроль — клетки, несущие исключительно плазмиду/ы с аллелью *SUP45* или *SUP35* дикого типа.

Затем на каждом этапе мы выделяли геномную ДНК из штаммов, и использовали ее для проведения серии количественных ПЦР в реальном времени (рис. 22, 23Б). Для образцов *sup45-101*, *sup45-105*, *sup35-218*, *sup35-74* на 2 и 4 стадии эксперимента количество копий плазмиды определяли при помощи специально подобранных праймеров, специфичных к маркеру *LEU2* или *URA3* для отслеживания количества копий каждой из плазмид в отдельности (рис. 22). В тоже время, дополнительно, для клеток несущих различные аллели *sup45-n* и *sup35-n* количество копий плазмиды на 1, 3 (рис. 23Б) и 5 стадии определяли при помощи праймеров, специфичных для гена β-лактамазы, расположенного на плазмиде (*bla*). В качестве референсного гена использовали *ACT1*.

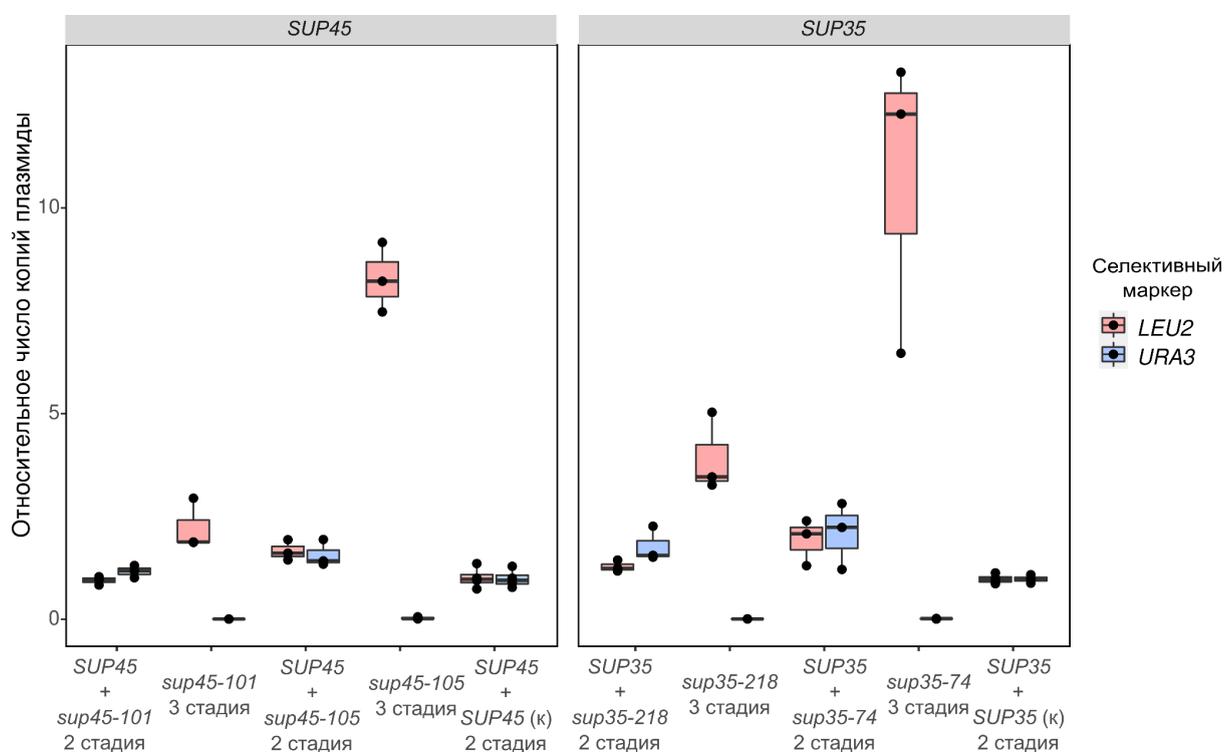


Рисунок 22. Анализ числа копий центромерных плазмид несущих мутантные аллели *sup45-n* и *sup35-n*. “2 стадия” (к-контроль) — клетки, несущие две плазмиды, одна из которых несет аллель дикого типа, а другая — аллель дикого типа (*SUP45* или *SUP35*) или мутантную аллель *sup45-101*, *sup45-105*, *sup35-218*, *sup35-74* или “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. Так, относительное число копий плазмид (несущих лейциновый или урациловый маркер) на 2 стадии, для клеток, содержащих мутантную аллель *sup45-101* было сходно с контролем, а для аллели *sup45-105* выше в 1,4 - 1,6 раза. В случае присутствия мутантной аллели *sup35-218* значение было в 1,2 - 1,5 раза выше, чем у контроля, а для аллели *sup35-74* в 2 - 2,2 раза. Для всех клеток, несущих исключительно мутантную аллель (3 стадия **рис. 22**, **рис. 23Б**), было обнаружено статистически значимое увеличение копийности плазмиды, несущей мутантную аллель *sup45-n* или *sup35-n*. Полученные данные подтверждают факт того, что происходит увеличение копийности плазмид в ходе замещения аллели дикого типа на мутантную аллель. 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 *sup45-n* или *sup35-n* содержится аллель *SUP45* или *SUP35* дикого типа.

На следующем этапе 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 для клеток, несущих аллели *sup35-n* (**рис. 23А**). Результаты количественной ПЦР-РВ показали сходные тенденции в увеличении числа копий плазмид для изученных мутантных аллелей, а количество копий плазмиды варьировало от 1,8 до 6,2 для *sup45-n* и от 3,3 до 11,4 для *sup35-n*.

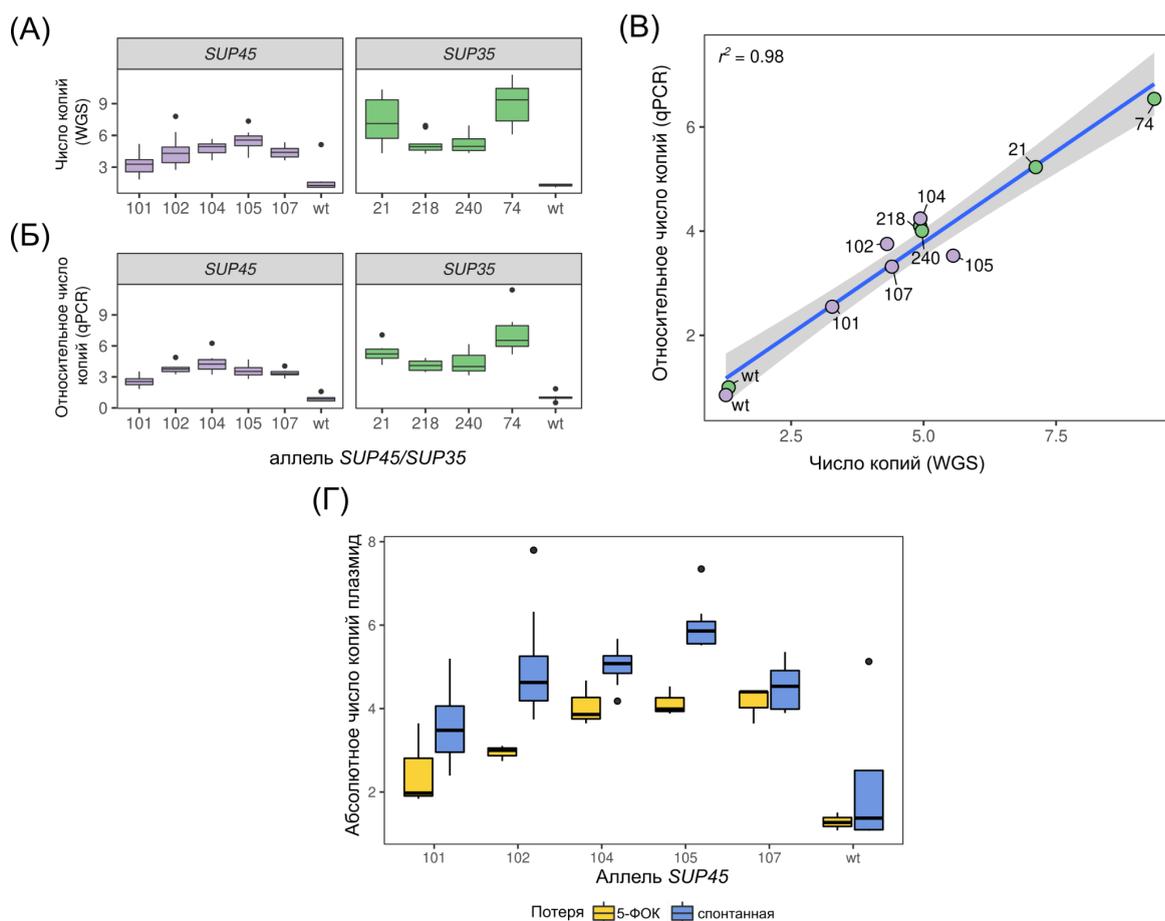


Рисунок 23. Количество копий плазмиды, оцененное с использованием данных WGS (А) и количественной ПЦР (ПЦР-РВ) с праймерами к гену *bla* (Б). (В) Диаграмма рассеяния, показывающая соответствие между числом копий плазмид по данным WGS и ПЦР-РВ. Цифры соответствуют аллелям *SUP45* и *SUP35*. Сплошная линия представляет собой линию линейной регрессии; серая область соответствует доверительному интервалу линейной регрессии. (Г) Количество копий плазмиды в штаммах, которые были отобраны с использованием 5-FOA или спонтанно потеряли плазмиду, содержащую аллель гена *SUP45*.

Интересно отметить, что в некоторых случаях количество копий было немного выше у штаммов, которые спонтанно утратили аллель дикого типа во время культивирования на полной среде по сравнению со штаммами, выращенными на среде 5-ФОК, используемой для селективного отбора клеток, потерявших плазмиду с геном *URA3* (рис. 23Г). Таким образом, количество копий плазмиды систематически увеличено у штаммов, несущих все изученные аллели *sup45-n* и *sup35-n*, по сравнению с соответствующими референсными штаммами. Статистический анализ показал высокую степень корреляции ($r^2 = 0,98$) (рис. 23В) между данными, полученными с использованием полногеномного секвенирования и количественной ПЦР (рис. 23Б)

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* с помощью ПЦР-РВ. 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* (рис. 24).

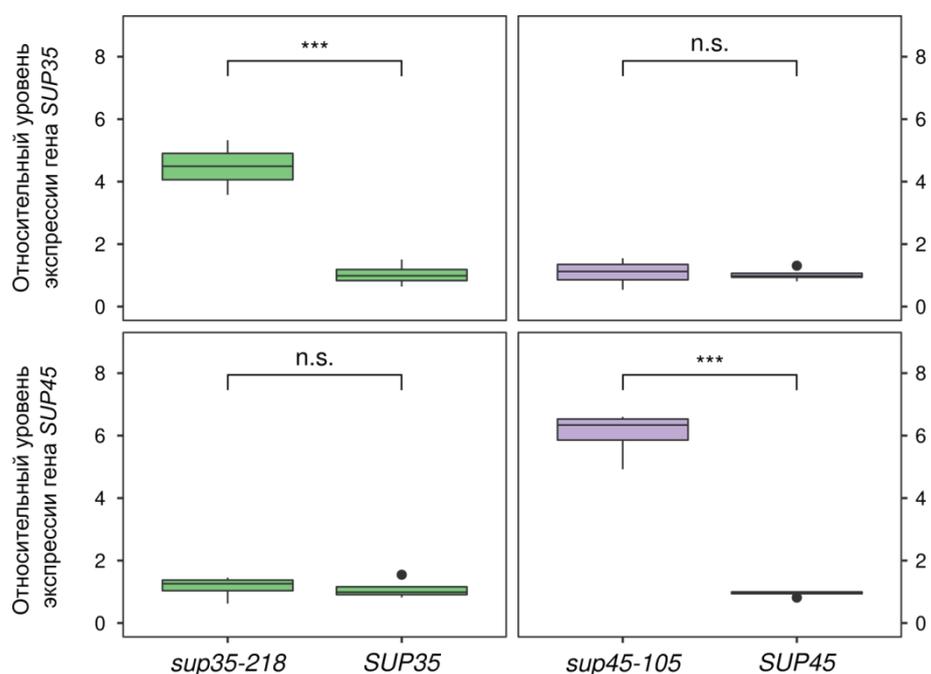


Рисунок 24. Уровни экспрессии генов *SUP45* и *SUP35* увеличены в клетках, содержащих мутантные аллели *sup45-105* и *sup35-218* на плазмиде, соответственно. Относительные уровни экспрессии соответствующих генов оценивали с использованием метода $\Delta\Delta CT$. В качестве референсного гена во всех 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 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.

Дальнейшей задачей была проверка того, являются ли данные изменения, происходящие в клетках дрожжей, обратимыми. Следующий этап эксперимента

заключался в последовательном двухстадийном возвращении клеток к первоначальному состоянию, в котором они несут одну плазмиду с аллелью гена *SUP45/SUP35* дикого типа. Штаммы дрожжей на 3 стадии (содержащие мутантные аллели *sup45-n/sup35-n* или *SUP45/SUP35* (контроль) на плазмиде с селективным маркером *LEU2*) трансформировали плазмидами с селективным маркером *URA3*, содержащими аллели *SUP45* или *SUP35* дикого типа (рис. 21 — 4 стадия). Впоследствии штаммы, содержащие две плазмиды, пассировали 4 раза на среде YEPD, проверяли фенотип и отбирали колонии, которые содержали только плазмиду с селективным маркером *URA3* и аллелью дикого типа *SUP45* или *SUP35* (рис. 21 — 5 стадия). В результате было обнаружено, что клетки дрожжей на 4 стадии, несущие плазмиды с разными аллелями гена *SUP35*, по числу копий плазмиды практически не отличаются от контроля на 2 стадии (рис. 25). Однако результаты ПЦР-РВ для клеток, несущих мутантную аллель *sup45-101* наряду с аллелью *SUP45* дикого типа, демонстрировали увеличение копийности плазмид, как с урациловым, так и лейциновым маркером, относительно контроля, в 2,7 и 4,3 раза соответственно. В то же время, образцы с мутантной аллелью *sup45-105*, ранее демонстрировавшие наиболее существенные отклонения в копийности (на 3 стадии), не имели каких-либо отличий от клеток, несущих две аллели *SUP45* дикого типа. Эти результаты свидетельствуют в пользу того, что изменения, происходящие на 3 стадии, являются адаптацией к дефектам в работе факторов терминации трансляции, а возвращение функциональной копии гена способствует восстановлению исходного числа копий плазмиды.

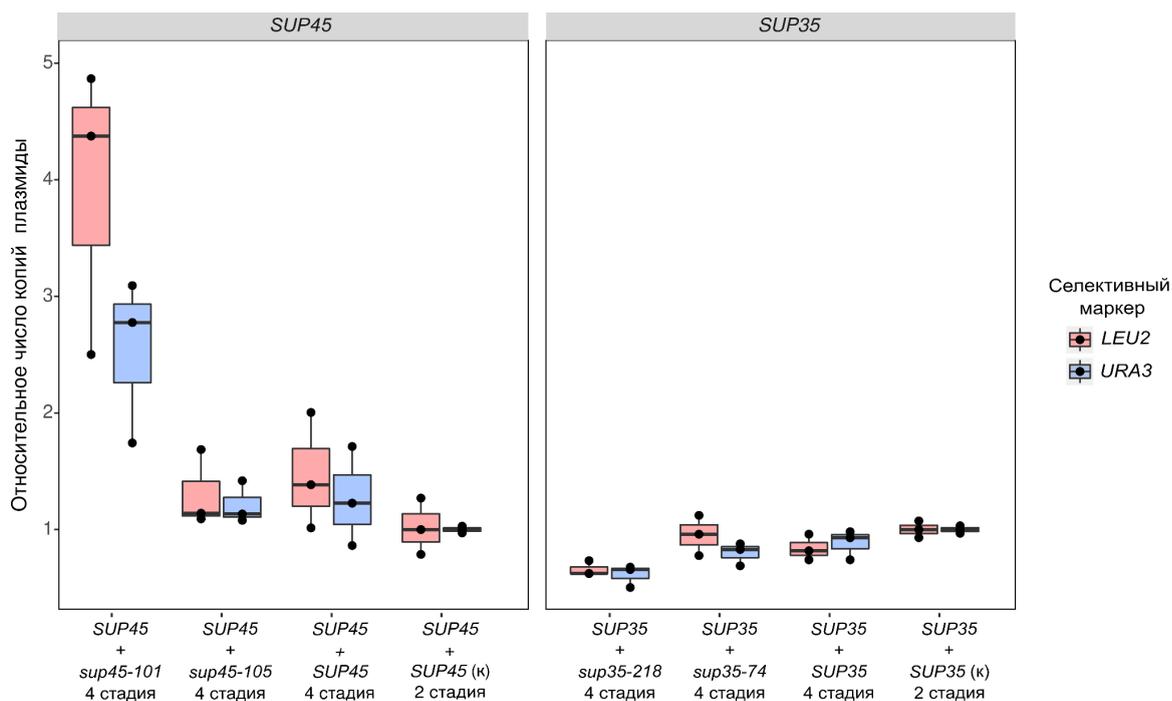


Рисунок 25. Сравнительный анализ числа копий центромерных плазмид, несущих мутантные аллели *sup45-n* и *sup35-n*, на 4 стадии эксперимента. “2 стадия” (к-контроль) - клетки, несущие две плазмиды с разными селективными маркерами (*URA3* и *LEU2*) и одинаковыми аллелями дикого типа (*SUP45* или *SUP35*). “4 стадия” - клетки, несущие две плазмиды, одна из которых несет аллель дикого типа (*SUP45* или *SUP35*), а вторая - мутантную аллель (*sup45-101*, *sup45-105* или *sup35-218*, *sup35-74*). Контроли (к), на протяжении всего эксперимента содержали только плазмиды с аллелью дикого типа.

На заключительном этапе в результате неселективной потери плазмиды, несущей мутантные аллели *sup45-n/sup35-n* (или аллели *SUP45* или *SUP35* дикого типа — контроль), мы получали клетки, соответствующие по генотипу стадии 1 (т.е., несущие только плазмиду с маркером *URA3* и аллелью *SUP45* или *SUP35* дикого типа) (рис. 21). На рисунке 26 представлены результаты ПЦР-РВ для этих клеток. За исключением клеток, которые ранее в процессе эксперимента содержали мутантную аллель *sup45-105*, все исследованные образцы не имели статистически значимых отличий от контроля.

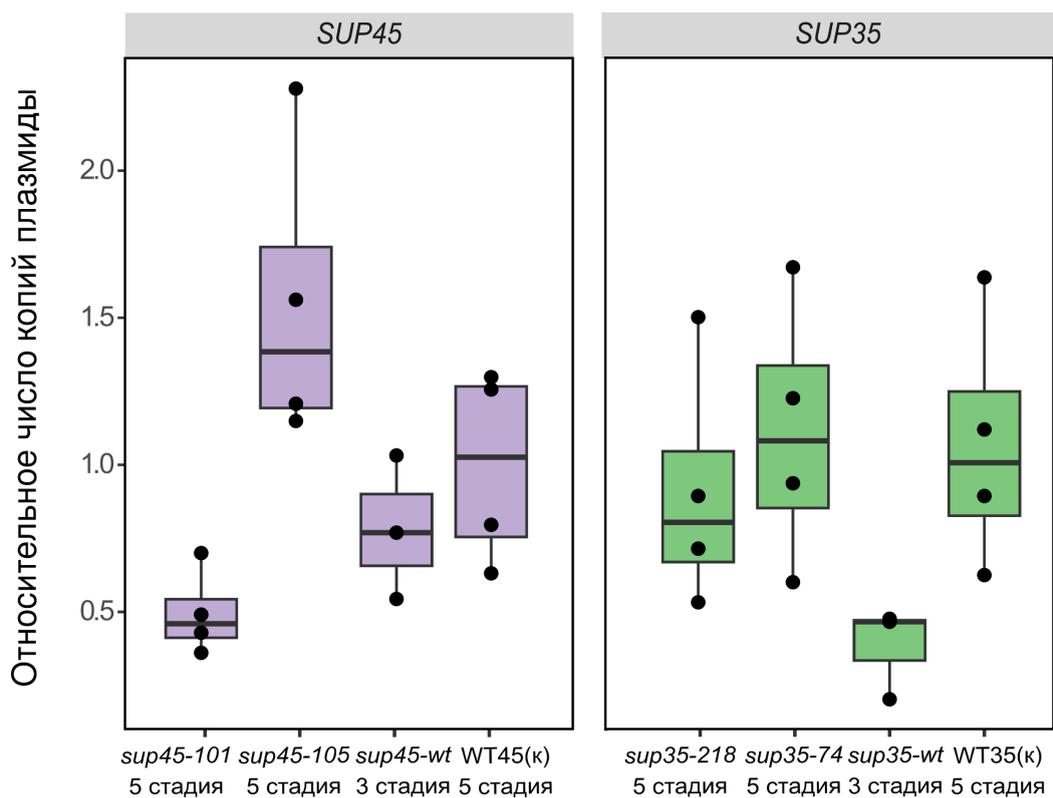


Рисунок 26. Оценка относительного числа копий плазмиды на 5 стадии, рассчитанное с использованием данных количественной ПЦР. Номера мутаций обозначают мутантные аллели *sup45-n* и *sup35-n*, которые присутствовали в этих клетках на 2, 3, 4 стадии эксперимента. Контроли (к), на протяжении всего эксперимента содержали только плазмиды с аллелью дикого типа.

Таким образом, мы можем сделать вывод о том, что в клетках дрожжей в присутствии нонсенс-мутаций в генах факторов терминации трансляции *SUP45* или *SUP35* происходит изменение числа копий генов *sup45-n/sup35-n*. Впоследствии при потере мутантной аллели и возвращении в клетку функциональной копии гена *SUP45/SUP35* происходит восстановление исходного числа копий плазмиды, то есть обнаруженное явление увеличения копийности является обратимым. Предположительно именно за счет этого явления происходит процесс адаптации и увеличение жизнеспособности клеток с дефектами в жизненно важных генах факторов терминации трансляции.

3.5 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 получения более полной картины изменений, происходящих на фоне присутствия в клетках дрожжей плазмид, содержащих нонсенс-мутации *sup45-n* и *sup35-n*, мы провели количественный анализ митохондриальной ДНК (мтДНК) у данных штаммов.

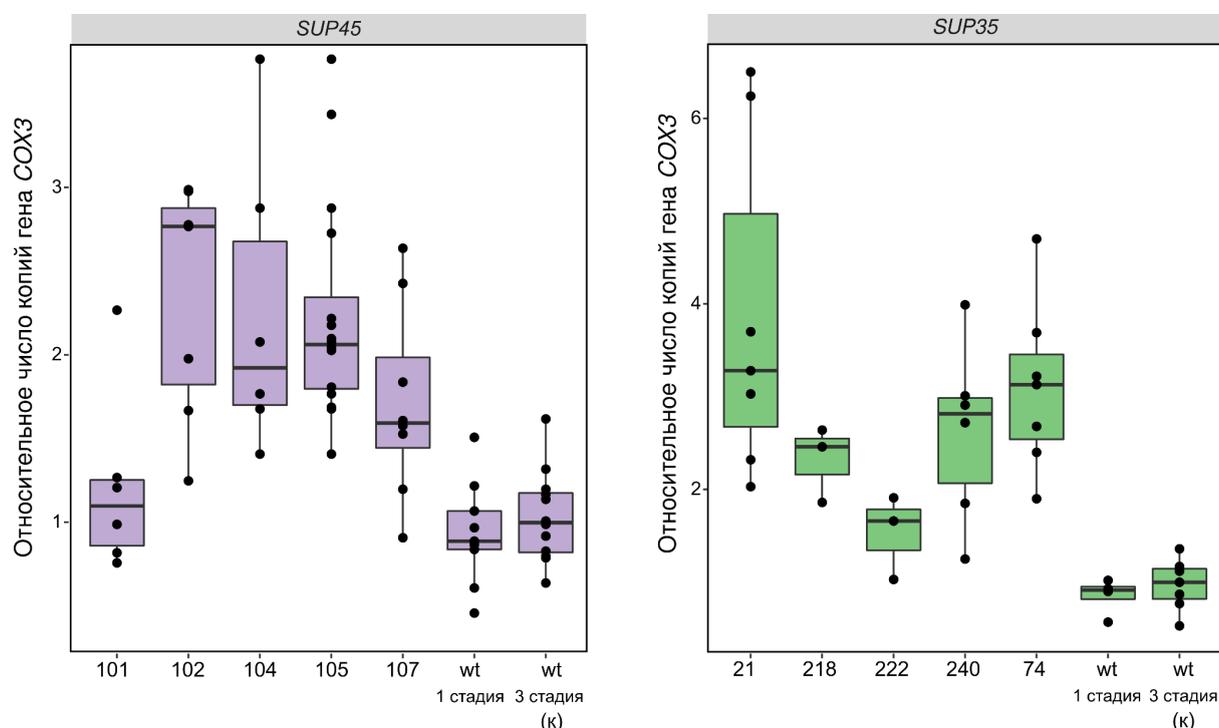


Рисунок 27. Нонсенс-мутации в генах *SUP45* и *SUP35* приводят к увеличению числа копий гена *COX3*. Контроли (к), на протяжении всего эксперимента содержали только плазмиды с аллелью дикого типа.

Была проведена серия ПЦР-РВ с праймерами к гену *COX3*, кодирующему одну из трёх самых больших субъединиц митохондриального цитохромоксидазного комплекса *S. cerevisiae*. *COX3* является одним из стандартных маркеров, используемых для оценки числа копий мтДНК [Galeota-Sprung et al., 2022]. 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. 27).

Также мы проанализировали корреляцию между результатами, 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. 28).

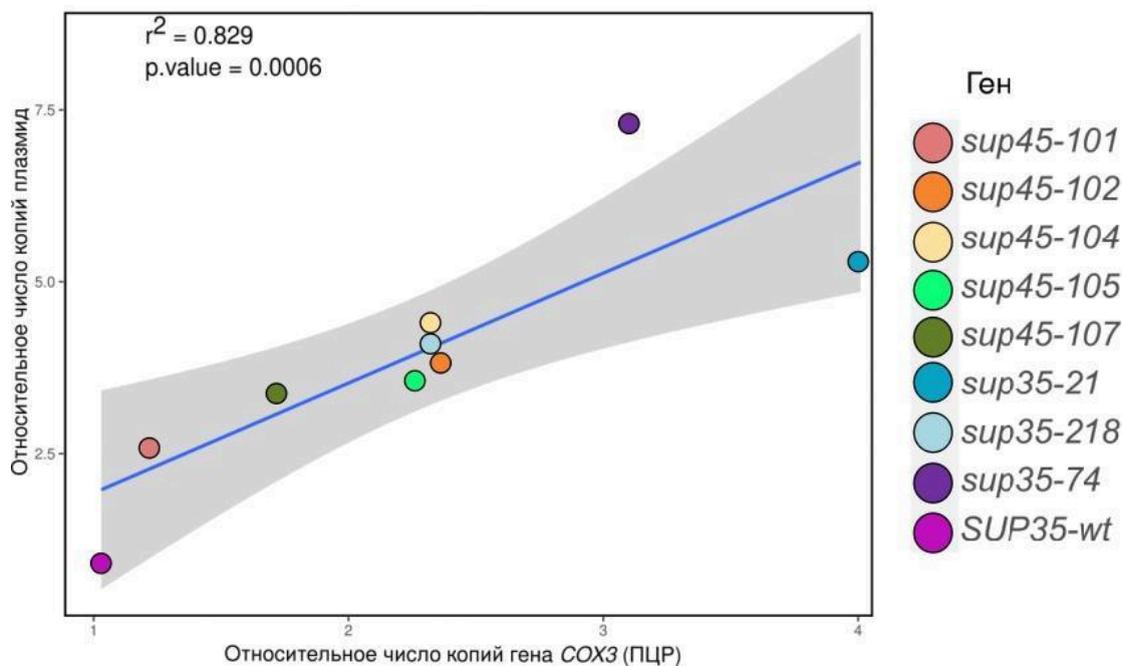


Рисунок 28. Изменение копийности центромерных плазмид, несущих мутантные аллели *sup45-n* и *sup35-n*, и изменение числа копий мтДНК в изучаемых штаммах имеют высокую степень корреляции. Сплошная линия представляет собой линию линейной регрессии; серая область соответствует доверительному интервалу линейной регрессии.

Для детальной характеристики изменений в митохондриальном геноме мы воспользовались полученными ранее данными секвенирования геномов штаммов, несущих нонсенс-мутации *sup45-n* и *sup35-n* на плазмиде. Прочтения выравнивали на референсный геном штамма U-1A-D1628, после чего проводили анализ вариаций числа копий при помощи инструмента CNVkit [Talevich et al., 2016]. В ходе этого анализа осуществляли подсчет изменения числа копий участков митохондриальной ДНК относительно клеток, несущих аллели *SUP45* и *SUP35* дикого типа.

При анализе полученных данных было обнаружено, что помимо различий в числе копий мтДНК в целом, в некоторых случаях наблюдаются протяженные делеции, а

также локальные изменения числа копий отдельных фрагментов митохондриального генома. Интересно отметить, что данное явление наблюдается исключительно в штаммах, несущих мутации *sup45-101*, *sup45-102* (рис. 29) и только в случае спонтанной потери плазмиды, несущей аллель гена *SUP45* дикого типа. В клетках, содержащих плазмиды с мутациями *sup45-104*, *sup45-105*, *sup45-107*, а также *sup35-n* покрытие было равномерным (рис. 29). Возможно, обнаруженные различия объясняются тем, что присутствие мутантных аллелей *sup45-101*, *sup45-102* не приводит к существенному снижению жизнеспособности штаммов, в связи с чем допустимы изменения в структуре мтДНК, которые не приводят к летальности клеток. Также нельзя исключить, что отбор клеток с использованием среды с 5-ФОК может приводить к сокращению разнообразия структуры мтДНК изучаемых штаммов за счет дополнительного селективного давления.

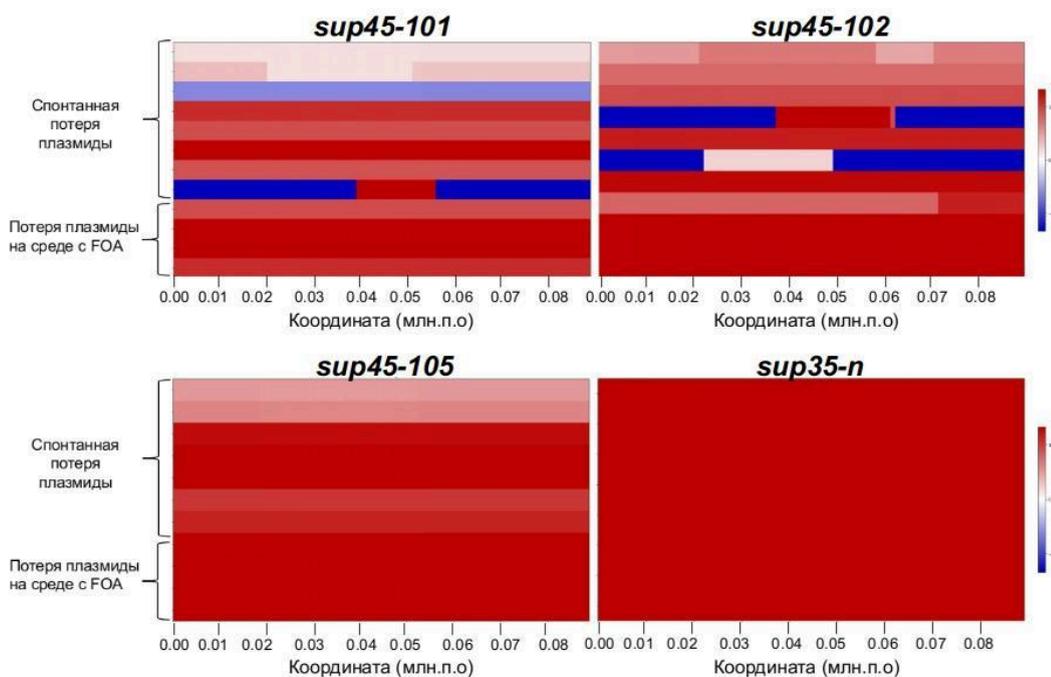


Рисунок 29. Нонсенс-мутации в генах *SUP45* и *SUP35* приводят к увеличению относительного числа копий мтДНК. На рисунке представлены тепловые карты отражающие структуру и копийность мтДНК для штаммов, полученных в различных условиях и содержащих плазмиды с различными мутантными аллелями *sup45-n* и *sup35-n* (единообразная картина в случае присутствия всех нонсенс-мутаций). Одна полоса соответствует одному проанализированному клону.

Наконец, мы произвели подсчет абсолютного количества копий мтДНК в клетках. Для этого подсчитывали отношение покрытия митохондриального генома к среднему

покрытию ядерного генома (рис. 30).

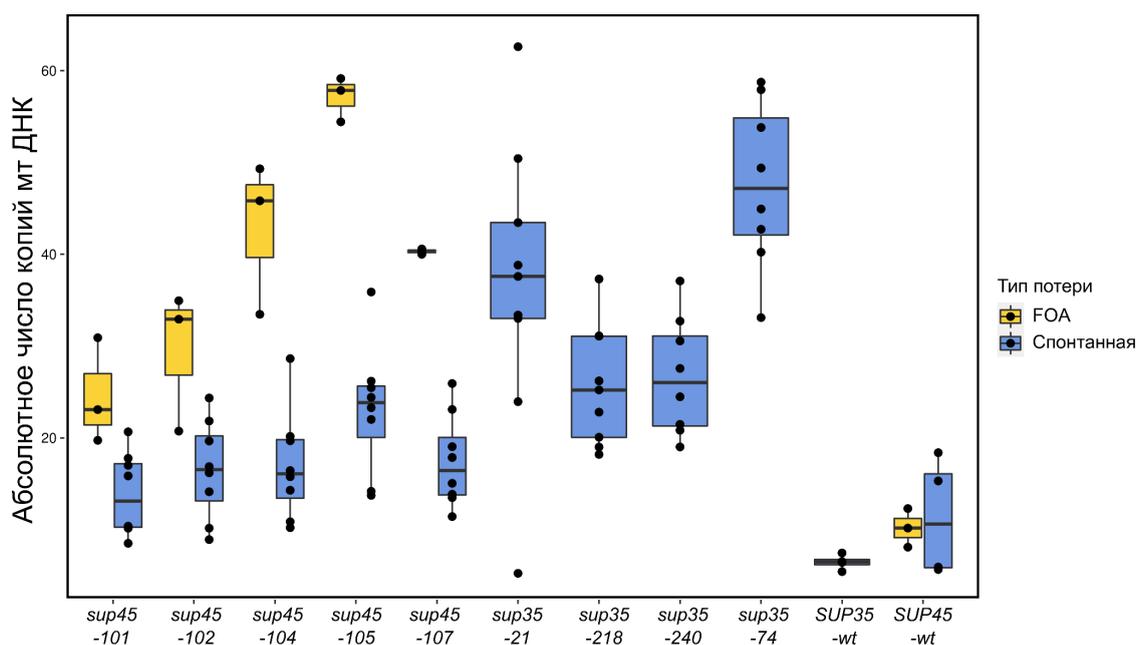


Рисунок 30. Нонсенс-мутации в генах *SUP45* и *SUP35* приводят к увеличению абсолютного числа копий мтДНК.

Данный анализ подтвердил сделанные ранее выводы о значительном увеличении копийности мтДНК у клеток, несущих аллели *sup45-n* и *sup35-n*. Также нами было обнаружено, что в случае потери плазмиды, содержащей аллель гена *SUP45* дикого типа, с использованием селективной среды, содержащей 5-ФОК, копийность мтДНК была существенно выше, чем в случае спонтанной потери плазмиды.

3.6 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 [Chabelskaya et al., 2004; Moskalenko et al., 2003]. 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 изучить адаптации у штаммов 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. 31).

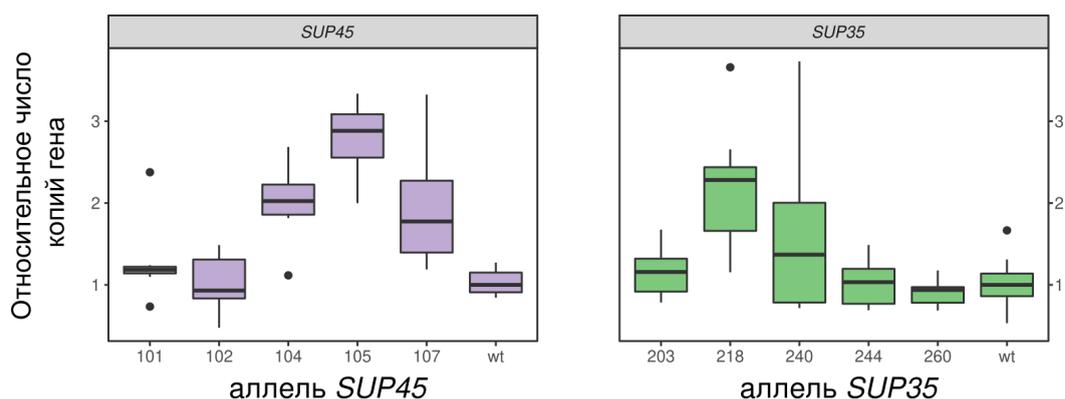


Рисунок 31. Количество копий некоторых мутантных аллелей *sup45-n* и *sup35-n* увеличено в клетках штамма 1B-D1606. На рисунке представлены графики, показывающие число копий аллелей *sup45-n* (слева) и *sup35-n* (справа) относительно штамма дикого типа 1B-D1606 (wt), определенное при помощи ПЦР-РВ. Относительное число копий гена было оценено с использованием метода $\Delta\Delta C_T$ [Livak, 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. 31). В частности, мы наблюдали двукратное увеличение количества копий для аллелей *sup45-104*, *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 показывают 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. 31). Таким образом, для выяснения причин различий по числу копий

мутантных аллелей 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 (**рис. 32**).

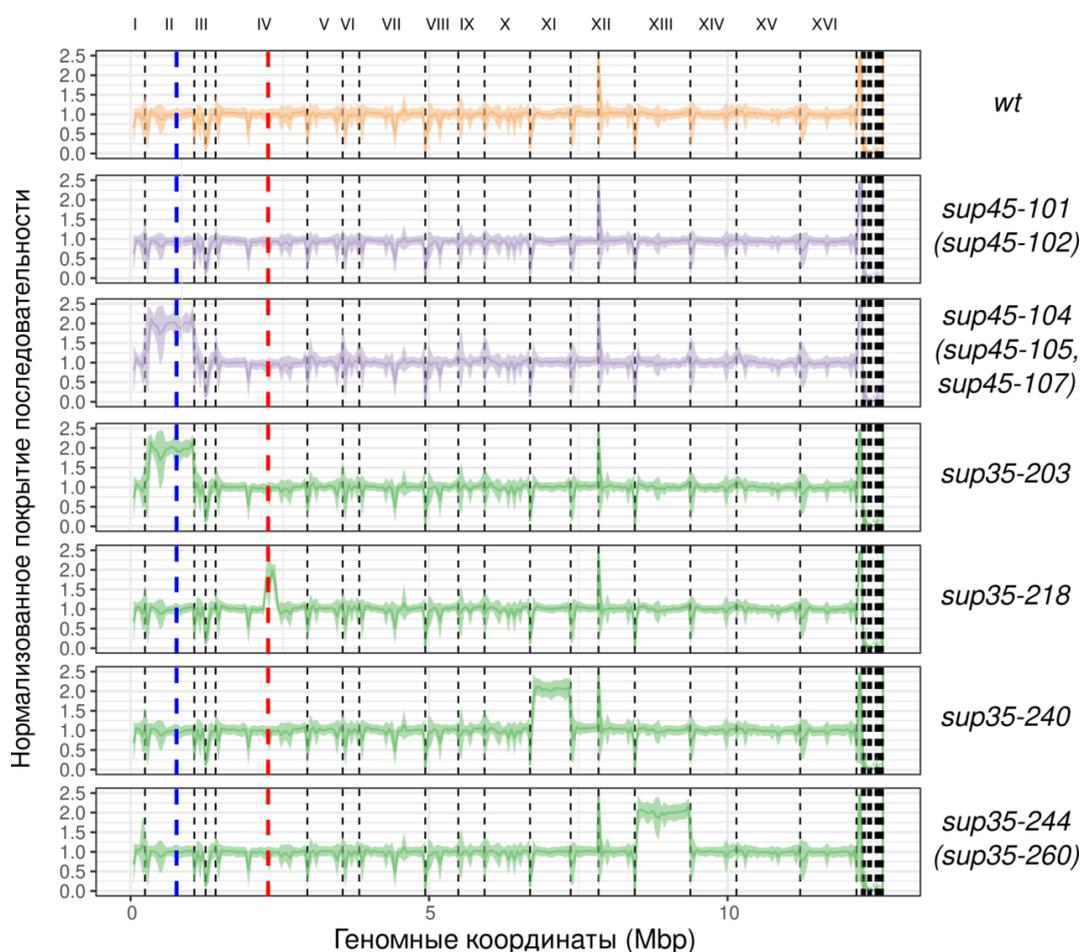


Рисунок 32. Визуализация результатов полногеномного секвенирования штаммов n-1B-D1606, содержащих мутантные аллели *sup45-n* и *sup35-n* в геноме. На рисунке представлены нормализованные профили покрытия относительно последовательности генома U-1A-D1628. Черные пунктирные линии соответствуют границам 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.

В соответствии с результатами ПЦР-РВ, в некоторых штаммах мы наблюдали увеличение покрытия в регионах, где расположены гены *SUP45* и *SUP35*. 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*.

Интересно отметить, что границы этой дупликации были идентичны границам дупликации, которые ранее наблюдались в случае аллеля *sup35-222* [Matveenko et al., 2019]. 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 244-1B-D1606 и 260-1B-D1606 мы обнаружили дисомию по хромосоме XIII (рис. 32). 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.

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

Все ранее полученные результаты, как для клеток дрожжей, несущих нонсенс-мутантные аллели генов *SUP45* и *SUP35* на плазмиде, так 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, на наш взгляд, представляют молекулярные изменения, происходящие в таких клетках. 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 с плазмидой с аллелью дикого типа) — 7 образцов, 2 стадия (клетки с двумя плазмидами) — 8 образцов (только для *SUP45/sup45-105*), 3 стадия (клетки после потери с плазмидой с аллелью дикого типа) — 15 образцов. Мы сфокусировались на поиске различий в транскриптомах клеток на 3 стадии эксперимента и проводили функциональный анализ с целью выявления биологических процессов, способствующих выживанию в условиях серьезных дефектов процесса терминации трансляции.

На первом этапе мы проанализировали совокупные различия профилей экспрессии генов между образцами, несущими мутантные аллели и аллели дикого типа *SUP45* или *SUP35* на разных стадиях эксперимента. Для этого использовали полученные в ходе анализа исходных прочтений (см. Материалы и методы) 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 *SUP45* (**рис. 33А**), мы не наблюдали явного разделения на группы. Образцы характеризовались большой гетерогенностью, даже несмотря на статистическую поправку на дату выделения РНК. Дальнейший анализ исходных данных для образцов на 2 и 3 стадии показал, что в ряде случаев мутантная аллель не экспрессировалась вовсе, что может объяснить наблюдаемую гетерогенность, но затрудняет биологическую интерпретацию полученных результатов.

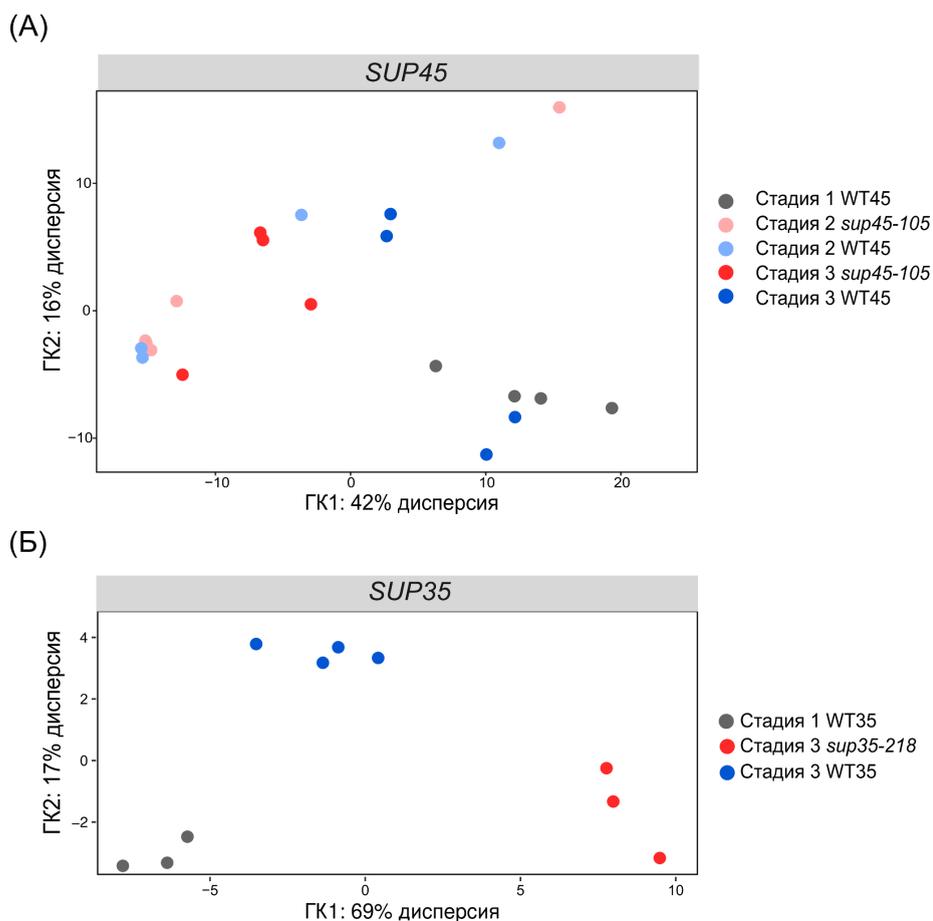


Рисунок 33. Анализ проанализированных транскриптомов дрожжей при помощи метода главных компонент (ГК). А) Диаграмма рассеяния 20 образцов, несущих различные комбинации аллелей гена *SUP45*, по первым двум главным компонентам после статистической поправки на дату выделения РНК (1,2,3 стадия). Б) Аналогично (А), но для 10 образцов, несущих различные комбинации аллелей гена *SUP35* (1,3 стадия).

Для клеток, содержащих плазмиды с различными комбинациями аллелей гена *SUP35* (рис. 33Б) наблюдались иные результаты. Мы обнаружили 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.

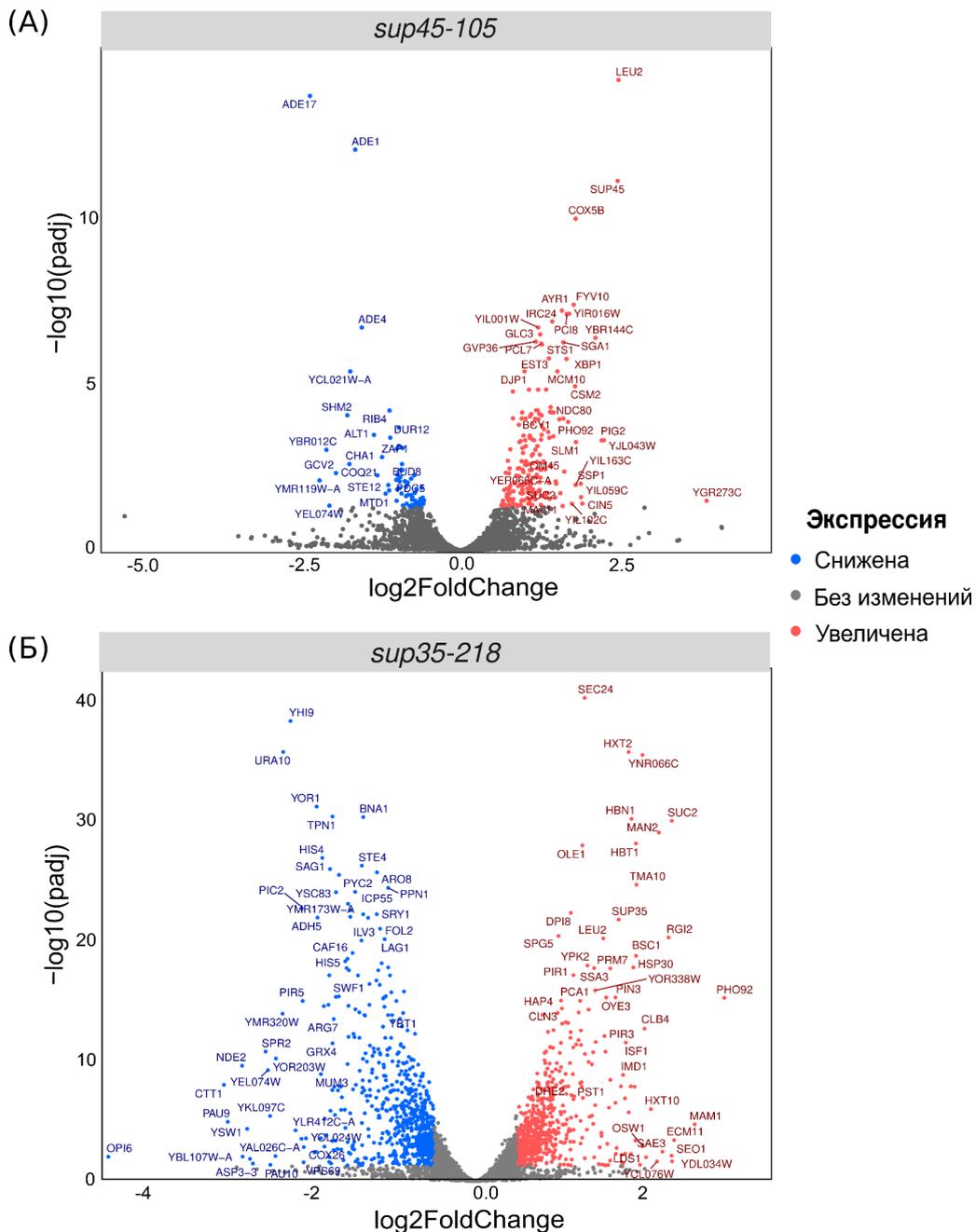
На следующем этапе нами был проведен анализ дифференциальной экспрессии генов. Ввиду высокой гетерогенности данных, полученных от клеток на 2 стадии (с различными комбинациями аллелей гена *SUP45*), использовали только образцы с 1 и 3 стадии эксперимента. В ходе анализа дифференциальной экспрессии нами были

отобраны гены со статистически значимыми различиями в экспрессии между группами (скорректированное р-значение < 0.05), при этом сравнение проводили в различных комбинациях для клеток на 1 и 3 стадии эксперимента (**Таблица 7**).

Таблица 7. Сравнительный анализ количества дифференциально экспрессированных генов.

Мутация	<i>sup35-218</i>	<i>sup45-105</i>	<i>sup35-218</i>	<i>sup45-105</i>
Контрольные образцы	стадия 1 <i>SUP35</i> -wt	стадия 1 <i>SUP45</i> -wt	стадия 3 <i>SUP35</i> -wt	стадия 3 <i>SUP45</i> -wt
Повышенная экспрессия ↑	817	887	656	192
Сниженная экспрессия ↓	1007	826	710	66

Сравнение количества дифференциально экспрессирующихся генов (ДЭГ) в различных сравнениях выявил существенные различия между 1 и 3 стадией, что, вероятно, объясняется различиями в составе питательной среды для клеток, несущих плазмиды с разными селективными маркерами. В связи с этим, дальнейший анализ проводили исключительно между клетками на 3 стадии. Мы также отметили, что в случае клеток, несущих аллели гена *SUP45*, мы обнаружили в несколько раз меньше ДЭГ, чем для штаммов с различными аллелями гена *SUP35* (**рис. 34**).



Различия в количестве ДЭГ были еще более значительны для генов, экспрессия которых была изменена в 2 и более раз. На фоне присутствия аллели *sup45-105* (рис. 34А) экспрессия 126 генов была двукратно повышена, 19 — более чем двукратно снижена, а в случае наличия мутации *sup35-218* (рис. 34Б) было выявлено 147 генов с двукратно повышенной экспрессией, 216 — с двукратно сниженной.

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/>). В случае аллели *sup35-218* анализ 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. 35 А,Б). Среди генов со сниженной экспрессией была обнаружена перепредставленность генов-участников различных процессов биосинтеза, в том числе синтеза аминокислот (рис. 35В).

В случае аллели *sup45-105* анализ показал обогащение набора генов с повышенной экспрессией генами, участвующими в углеводном метаболизме, например, обмене гликогена и полисахаридов (рис. 35Г). Среди генов со сниженной экспрессией была обнаружена перепредставленность генов-участников различных процессов биосинтеза, в том числе синтеза нуклеотидов (рис. 35Д). При этом мы не обнаружили перепредставленности генов клеточного цикла, однако предположительно, это может быть связано с гетерогенностью выборки вследствие “батч” эффекта. Это и различия в количестве ДЭГ, могут указывать на более низкое качество полученных транскриптомных данных для клеток, несущих аллель *sup45-n*. 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*.

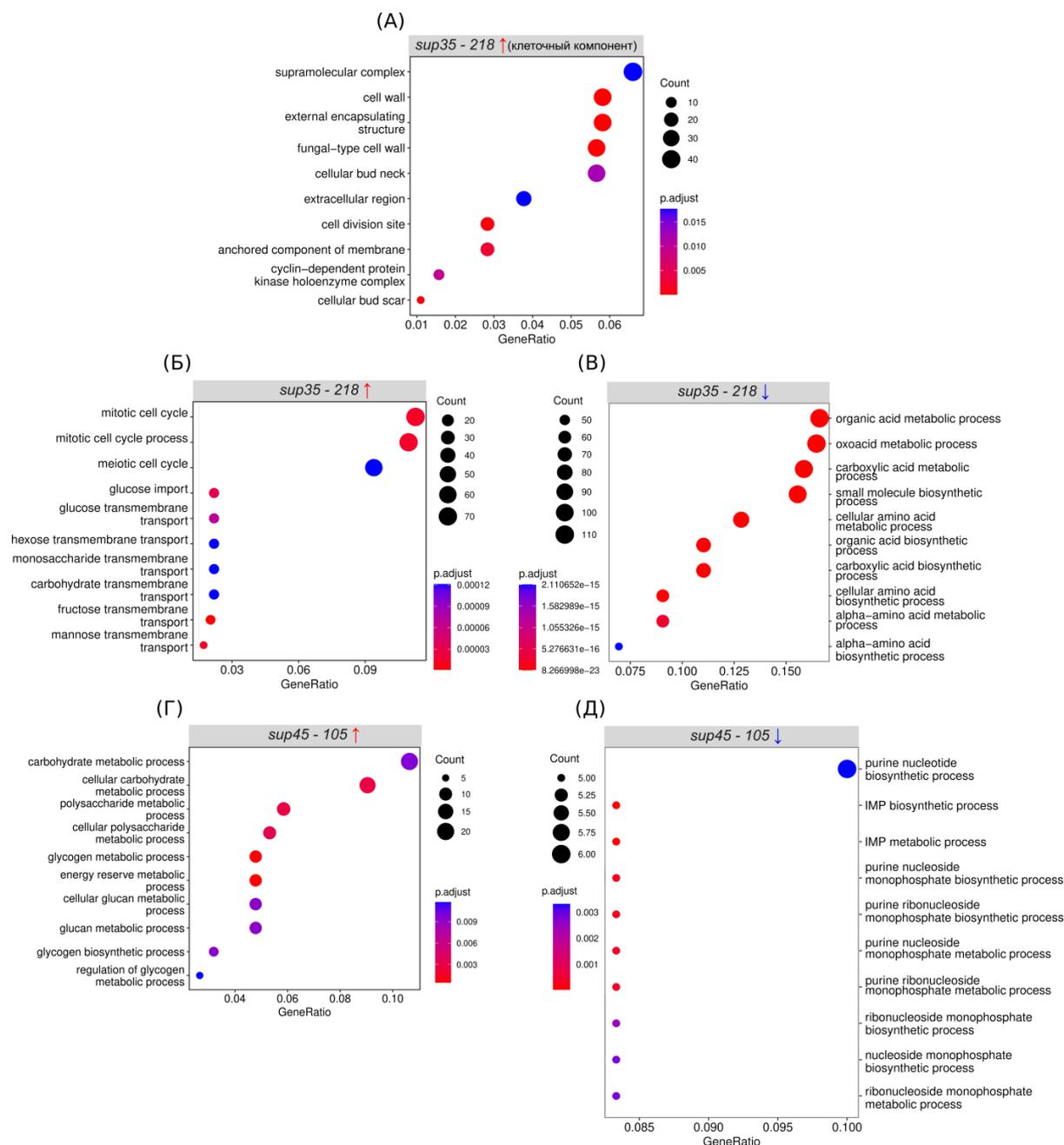


Рисунок 35. Анализ обогащения дифференциально экспрессированных генов по терминам Gene Ontology, произведенный при помощи пакета ClusterProfiler. Размер точки пропорционален соотношению обогащения, а цветовой градиент отображает скорректированный уровень значимости. А) Повышенная экспрессия *sup35-218* (клеточный компонент) Б) Повышенная экспрессия *sup35-218* (биологические процессы) В) Сниженная экспрессия *sup35-218* (биологические процессы) Г) Повышенная экспрессия *sup45-105* (биологические процессы) Д) Сниженная экспрессия *sup45-105* (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* (рис.36).

Было обнаружено, что у клеток дрожжей в присутствии аллели *sup35-218* 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 цитокinesis. В свою очередь, экспрессия гена *CDC23* - одного из основных компонентов комплекса, стимулирующего анафазу была снижена, как и в случае присутствия в клетках аллели *sup35-218*. На основе данных 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.

цикла, при помощи KEGG PATHWAY. Гены с повышенной экспрессией в присутствии аллели *sup35-218* отмечены красным цветом, с пониженной экспрессией — синим. Градиент цвета отражает степень изменения экспрессии генов. Зеленым цветом выделены гены, где значимого изменения экспрессии не обнаружено.

Для дальнейшего анализа изучаемых наборов ДЭГ мы использовали информационную систему YEASTRACT (www.yeasttract.com), которая позволяет идентифицировать общие транскрипционные регуляторы в заданном списке генов *S. cerevisiae*.

Таблица 8. Транскрипционные факторы, мишени которых перепредставлены в наборе генов со сниженной экспрессией у клеток с аллелью *sup35-218*.

Наибольшее обогащение по транскрипционным факторам	p-value	% в изучаемом наборе генов	% в таком же по размеру случайном наборе генов <i>S. cerevisiae</i>	Функция транскрипционного фактора
Bas1	$< 10^{-15}$	55,63%	13,08%	Вовлечен в регуляцию путей биосинтеза пуринов и гистидина
Gcn4	$< 10^{-15}$	93,52%	10,83%	Транскрипционный активатор генов биосинтеза аминокислот
Nac1	$< 10^{-15}$	33,38%	16,26%	Транскрипционный фактор типа “лейциновая молния” (ATF/CREB1 гомолог)
Sok2	$< 10^{-15}$	46,20%	13,60%	Негативный регулятор псевдогифальной дифференцировки
Gln3	$< 10^{-15}$	50,14%	14,47%	Транскрипционный активатор системы азотной катаболитной репрессии
Leu3	$< 10^{-15}$	17,61%	20,23%	Регулирует гены, вовлеченные в биосинтез разветвленных аминокислот и ассимиляцию аммония
Yap1	$2,8 * 10^{-15}$	90,70%	10,66%	Необходим для устойчивости к окислительному стрессу
Ixr1	$1,6 * 10^{-14}$	45,07%	13,13%	Транскрипционный репрессор, регулирующий гены гипоксии в условиях нормоксии

Cbf1	$4,1 \cdot 10^{-14}$	81,41%	11,03%	Фактор, связывающийся с центромерой
Rpn4	$3,4 \cdot 10^{-13}$	87,75%	10,67%	Транскрипционный фактор, стимулирующий экспрессию протеосомных генов. <i>RPN4</i> регулируется различными стрессовыми воздействиями

В случае присутствия в клетках дрожжей аллели *sup35-218* в наборе генов со сниженной экспрессией (**Таблица 8**) ожидаемо преобладали мишени транскрипционных факторов, связанных с биосинтезом аминокислот и нуклеотидов. Так, преобладание мишеней наблюдалось для Bas1, регулирующего гены путей биосинтеза пуринов и гистидина (55,63% генов со сниженной экспрессией), и для Gcn4 - активатора транскрипции генов биосинтеза аминокислот (93,52% генов). Эти наблюдения хорошо согласуются с результатами, полученными с помощью анализа обогащения терминов Gene Ontology (**рис. 35**).

В свою очередь, в наборе генов с повышенной экспрессией (**Таблица 9**) мы выявили обогащение мишеней транскрипционных факторов, участвующих в метаболизме (Ino2, Gcn4) и реакции на стресс (Rpn4 и Hsf). Более того, мы обнаружили, что значительное количество идентифицированных ДЭГ являются мишенями Rph1, Mig1 и Ste12, которые участвуют во многих биологических процессах, таких как транскрипция, аутофагия, инвазивный рост и другие.

Таблица 9. Транскрипционные факторы, мишени которых перепредставлены в случае аллели *sup35-218* в наборе генов с повышенной экспрессией.

Наибольшее обогащение по транскрипционным факторам	p-value	% в изучаемом наборе генов	% в таком же по размеру случайном наборе генов <i>S. cerevisiae</i>	Функция транскрипционного фактора
Rpn4	$< 10^{-15}$	89,94%	10,10%	Транскрипционный фактор, стимулирующий экспрессию протеосомных генов. <i>RPN4</i> регулируется различными стрессовыми воздействиями

Ino2	< 10 ⁻¹⁵	42,99%	13,19%	Связывает инозитол/холин-чувствительные элементы (ICRE)
Ume6	< 10 ⁻¹⁵	37,96%	15,18%	Ключевой транскрипционный регулятор; участвует в ремоделировании хроматина, связан с регуляцией роста псевдогиф, митозом и мейозом
Yhp1	< 10 ⁻¹⁵	24,85%	16,72%	Транскрипционный гомеобокс-репрессор
Gcn4	< 10 ⁻¹⁵	96,80%	10,35%	Активатор синтеза аминокислот
Rph1	< 10 ⁻¹⁵	40,70%	13,41%	Транскрипционный фактор, репрессирующий экспрессию генов вовлеченных в автофагию и репарацию ДНК
Hsf1	< 10 ⁻¹⁵	41,01%	14,26%	Транскрипционный фактор теплового стресса
Aft1	< 10 ⁻¹⁵	34,45%	14,15%	Транскрипционный фактор, который вовлечен в гомеостаз и утилизацию железа
Mig1	< 10 ⁻¹⁵	21,80%	18,31%	Транскрипционный фактор, который вовлечен в глюкозную репрессию
Ste12	< 10 ⁻¹⁵	68,29%	11,42%	Транскрипционный фактор, который активируется MAPK-сигнальным каскадом

Интересно, что была обнаружена чрезмерная представленность мишеней нескольких транскрипционных факторов, участвующих в регуляции клеточного цикла (в частности, Aft1, Ybp1, Mcm1 и Ume6). Было показано, что Aft1, белок, который регулирует гомеостаз железа, играет роль в стабильности хромосом, взаимодействии с кинетохорами и обеспечении перичентрического когезина [Hamza, Baetz, 2012]. Yhp1 является гомеобоксным репрессором транскрипции, он связывает Mcm1 и группу генов, участвующих в ранних этапах клеточного цикла [Pramila et al., 2002]. Ume6 представляет собой субъединицу комплекса гистондеацетилазы и ключевой регулятор транскрипции генов раннего мейоза, которые участвуют в ремоделировании хроматина и репрессии транскрипции [Raithatha et al., 2021; Williams et al., 2002].

В целом, анализ транскрипционных факторов, мишени которых перепредставлены среди дифференциально экспрессированных генов, обнаруженных в данной работе, согласуются с ранее полученными результатами анализа обогащения и подтверждают изменения происходящие в регуляции метаболизма и деление клеток.

Таким образом, в данной работе был продемонстрирован феномен амплификации генов факторов терминации трансляции в присутствии нонсенс-мутаций в данных генах. При изучении этого явления были обнаружены значительные изменения в экспрессии ~ 20% генов дрожжей *S. cerevisiae*. Наиболее выраженным среди этих изменений является дисбаланс в уровнях транскрипции основных компонентов клеточного цикла. Результаты данной работы позволяют выдвинуть гипотезу о том, что жизнеспособность мутантов по генам факторов терминации трансляции поддерживается за счет изменений в продолжительности фаз клеточного цикла, которые приводят к амплификации числа копий нонсенс-мутантных аллелей и селективному преимуществу таких клеток.

4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Эта диссертация является логическим продолжением работ, начатых 60 лет назад и посвященных изучению процесса терминации трансляции у модельного объекта дрожжей *S.cerevisiae*. В ходе этих исследований был выявлен парадокс жизнеспособных нонсенс-мутантов по жизненно важным факторам терминации *SUP45* и *SUP35*. Данный феномен изучали с различных сторон, были использованы штаммы, содержащие мутантные аллели как в хромосоме, так и на плазмиде, проанализирована и охарактеризована эффективность нонсенс-супрессии для каждой мутации, получены данные о взаимодействии с другими белками. Предполагалось, что основным фактором, обеспечивающим выживание клеток, несущих аллели *sup45-n* и *sup35-n* являлся синтез небольшого количества полноразмерного белка, образующегося в результате нонсенс-супрессии. Однако, синтезируемое количество белка было существенно снижено по сравнению с нормой, в связи с чем появилось предположение, что существуют адаптивные механизмы, способствующие выживанию клеток дрожжей при нарушениях терминации трансляции.

4.1 Адаптивная роль амплификации генов факторов терминации трансляции

В последние годы было опубликовано большое количество последовательностей генома *S. cerevisiae*, которые выявили высокий уровень генетического разнообразия и фенотипической изменчивости у этого вида [Barbitoff et al., 2021; Drozdova et al., 2016; Peter et al., 2018; Strobe et al., 2015; Zhu et al., 2016]. В некоторых работах показано, что структурные изменения в геноме (например, CNV) могут иметь адаптивную роль (например, [Peter et al., 2018]), однако остается неясным, может ли давление отбора активно способствовать накоплению генетических изменений. В этой работе мы показали, что нонсенс-мутации в жизненно важных генах *SUP45* и *SUP35* приводят к амплификации генов как в плазмидной, так и в хромосомной ДНК, а также увеличению числа копий мтДНК (рис. 23 и 32, 27). Далее мы рассмотрим возможные механизмы возникновения таких изменений, а также их потенциальное адаптивное значение.

В этом исследовании мы показали, что амплификация генов у штаммов, несущих мутантные аллели *sup45-n* и *sup35-n*, носит систематический характер и, вероятно, представляет собой способ адаптации к дефектам терминации трансляции. Несмотря

на большое количество копий генов *SUP45* или *SUP35*, присутствующих у большинства мутантов, клетки, несущие мутантные аллели, по-прежнему имеют пониженный уровень жизненно важных факторов eRF1 или eRF3 [Moskalenko et al., 2003]; следовательно, их жизнеспособность должна объясняться наличием дополнительных факторов. У мутантов, несущих аллели *sup45-n* и *sup35-n*, полноразмерные белки eRF1 и eRF3 синтезируются за счет нонсенс-супрессии. На эффективность нонсенс-супрессии может влиять уровень тРНК, тип стоп-кодона и нуклеотидный контекст вокруг терминирующего кодона, особенно нуклеотид, следующий за стоп-кодом [Moskalenko et al., 2003; Trubitsina et al., 2019]. Все клетки, несущие мутации *sup45-n*, характеризуются повышенным содержанием фракций тРНК, потенциально способных узнавать стоп-кодона (т.е. тРНК^{Tyr} (GUA), тРНК^{Trp} (CCA), тРНК^{Gln} (UUG) [Beier, 2001; Blanchet et al., 2014]. Предполагается, что эти тРНК способствуют синтезу полноразмерного белка eRF1 у штаммов, несущих мутации *sup45-n*. Примечательно, что общий уровень всех тРНК различается у мутантов и, например, в случае присутствия мутации *sup45-105* был в 1,5–2 раза выше, чем у *sup45-101* [Zhouravleva et al., 2006]. Этот факт позволяет нам предположить, что каждый мутант *sup45-n* имеет свой «оптимизированный уровень супрессии». Самый высокий уровень прочитывания стоп-кодона показан для мутации *sup45-102* (20–30%), а самый низкий — для *sup45-105* (5–8%) [Kiktev et al., 2009]. Важно отметить, что эти значения хорошо согласуются с количеством копий плазмиды у штаммов, несущих соответствующую мутантную аллель. Так, количество копий плазмиды максимально для аллели *sup45-105*, характеризующейся наименьшим уровнем прочтения стоп-кодонов.

Для мутаций *sup35-n* предыдущие исследования также выявили повышение уровня тРНК [Zhouravleva et al., 2006]. В то же время, все мутанты *sup35-n* содержат крайне низкие уровни полноразмерного eRF3. Например, клетки несущие мутацию *sup35-21* или *sup35-218*, содержали только 3% и 8% полноразмерного eRF3, соответственно, по сравнению с клетками дикого типа. Примечательно, что для *sup35-244* обнаружено наименьшее количество eRF3, эквивалентное всего 0,5% от уровня, обнаруженного в клетках дикого типа [Chabelskaya et al., 2004]. Несмотря на столь низкий уровень полноразмерного белка, аллель *sup35-244* не амплифицируется в геноме штамма 244-1B-D1606, но при этом у нее наблюдается дупликация хромосомы XIII. Не исключено, что изменения экспрессии других генов, расположенных на

дуплицированной хромосоме у этого штамма, играют роль в адаптации к низким уровням eRF3. Однако необходимы дополнительные эксперименты, чтобы охарактеризовать экспрессию генов в штаммах с анеуплоидиями по хромосомам, не содержащим гены факторов терминации трансляции.

Все вышеупомянутые данные поддерживают ранее предложенную модель, которая предполагает существование регулируемого обратной связью прочитывания преждевременного стоп-кодона [Betney et al., 2010; Betney et al., 2012]. Согласно этой модели, уменьшение количества полноразмерного фактора терминации способствует опосредованному через тРНК прочтению стоп-кодона как значащего, что, в свою очередь, приводит к частичной продукции полноразмерного eRF1. В такой модели повышенный уровень супрессорной тРНК или сниженная экспрессия гена *SUP45* приводит к увеличению уровней прочтения стоп-кодонов. В то же время отрицательная обратная связь снижает уровень прочтения стоп-кодонов за счет увеличения продукции мРНК *sup45-n*, но при этом не снижает дополнительную продукцию полноразмерного белка eRF1. Следовательно, мы можем предположить, что увеличение числа копий гена, наблюдаемое у наших штаммов, позволяет повысить уровень мРНК *sup45-n* (*sup35-n*), что обеспечивает оптимизированный уровень продукции полноразмерного белка для поддержания жизнеспособности.

Отдельный интерес вызывает механизм, приводящий к амплификации мутантных аллелей *sup45-n* и *sup35-n*. Так, известно, что мутантные аллели *sup45* и *sup35* могут приводить к нестабильности генома (как уже показано в [Borchsenius et al., 2000]), что, в свою очередь, может увеличивать количество копий плазмиды и/или хромосомы. Альтернативная гипотеза предполагает, что дрожжевая клетка испытывает выраженный стресс при нарушении терминации трансляции, что приводит к неправильной сегрегации плазмид и/или хромосом. В этот период повышенной геномной нестабильности некоторые клетки приобретают дополнительные копии плазмидной ДНК или дополнительную хромосомную копию гена посредством анеуплоидии или дубликации фрагмента хромосомы (как, например, в случае *sup35-218*). Как следствие, такие клетки получают селективное преимущество и распространяются в популяции. Таким образом, этот механизм представляет собой пример феномена адаптивного мутагенеза, который может происходить в определенных селективных условиях. Однако правильность упомянутой выше модели амплификации генов у мутантов

sup45-n и *sup35-n* остается недоказанной и обуславливает необходимость дальнейших исследований.

4.2 Адаптивная роль изменений генома, не затрагивающих гены *SUP45* и *SUP35*.

В последнее время в ряде публикаций сообщалось о различных результатах, касающихся частоты анеуплоидий как у диких, так и у лабораторных изолятов дрожжей. Например, Хоуз и соавторы сообщили о широко распространенном присутствии вариаций числа копий хромосом у диких дрожжей и предположили, что механизмы компенсации дозы помогают смягчать эффекты анеуплоидий на фенотип [Hose et al., 2015]. Однако данная гипотеза буферизации подвергалась критике и обсуждению [Gasch et al., 2016; Torres et al., 2016]. В настоящей работе мы показали, что изменения числа копий хромосом не только присутствуют в геномах штаммов лабораторных дрожжей, но и могут быстро накапливаться в процессе селекции (в данном случае в присутствии нонсенс-мутаций в генах факторов терминации). Ранее сообщалось о нескольких подобных случаях анеуплоидий, связанных с генами факторов терминации и нонсенс-супрессией. К ним относится явление обратимого переключения нонсенс-супрессорного фенотипа, наблюдаемое при наличии миссенс-мутаций в генах *SUP45* и *SUP35* [Drozdova et al., 2016б], которое было связано с изменением числа копий хромосомы II. Интересно, что амплификацию II хромосомы у мутантов *sup45-104*, *sup45-105*, *sup45-107*, *sup35-203* мы также обнаружили и в данной работе. Известно, что увеличение числа копий также может быть адаптивным, так как было показано, что оно снижает токсичность полиглутамина, предположительно, за счет увеличения экспрессии *SUP45* [Gong et al., 2012]. Другим примером является дисомия хромосомы VIII, компенсирующая супрессорный фенотип у штамма с заменой нативного *SUP35* на его ортолог из *Pichia methanolica* [Zadorsky et al., 2015]. Интересно, что амплификация той же самой хромосомы может возникать и как адаптация к высоким уровням меди, поскольку она содержит гены *CUP1* [Whittaker et al., 1988]. Потенциально, дополнительная копия хромосомы или ее части может давать селективные преимущества штаммам (при определенных нарушениях в клетке, или как адаптация к окружающей среде), однако для строгого доказательства этой гипотезы следует провести сравнение между анеуплоидами и их соответствующими эуплоидными аналогами.

Еще одним следствием нарушения терминации трансляции у мутантов по генам *SUP45* и *SUP35*, вероятно является изменение числа копий мтДНК. До недавнего времени считалось, что число копий мтДНК незначительно меняется в зависимости от условий роста, однако в 2022 году была опубликована работа, в которой были продемонстрированы изменения числа копий мтДНК во время роста дрожжевой культуры. Обнаружено, что в среднем количество копий мтДНК у *S. cerevisiae* относительно низкое и равно ~9 копиям на гаплоидный геном. Это число остается стабильным во время быстрого роста за счет сбраживания глюкозы, после чего начинает стремительно возрастать (в 4-10 раз) при диауксическом сдвиге, достигая максимальных значений в конце респираторной фазы [Galeota-Sprung et al., 2022]. Было зафиксировано и обратное явление: когда медленно растущие клетки переносили на свежие среды и число копий мтДНК быстро падало. В целом, различия в числе копий мтДНК между штаммами были наиболее заметны при переходе с брожения на дыхание. Помимо этого было выявлено, что увеличение числа копий имеет сложную связь с размером клетки. Эти результаты свидетельствуют о том что, число копий мтДНК является высокодинамичным параметром у дрожжей, регуляция которого не до конца изучена.

Механизмы взаимной координации функционирования митохондрий и репликации ядерной ДНК на данный момент также остаются открытым вопросом [Zyrina et al., 2015]. Несколько исследований показали, что репликация мтДНК происходит на всех стадиях клеточного цикла [Bogenhagen, Clayton, 1977; Magnusson et al., 2003] и остановка клеток в клеточном цикле не предотвращает репликацию мтДНК [Newlon, Fangman, 1975; Sazer, Sherwood, 1990]. И наоборот, есть свидетельства взаимной регуляции между митохондриями и механизмами, контролирующими клеточный цикл. Было показано, что основная циклин-зависимая киназа (Cdc28) контролирует сборку комплекса ТОМ (транслоказа внешней мембраны - “входные ворота” митохондрий), чтобы приспособиться к возросшей потребности в энергии во время S-фазы [Harbauer et al., 2014]. Более того, структура митохондриальной сети в некоторых типах клеток меняется, отражая требования конкретной стадии клеточного цикла [Mittra et al., 2009].

Нами были обнаружены существенные различия в числе копий мтДНК у штаммов, несущих нонсенс-мутантные аллели генов *SUP45* и *SUP35*, по сравнению с клетками дикого типа. В контексте анализа последних литературных источников нельзя исключать тот факт, что на количественную оценку различий могут влиять

особенности роста и метаболизма данных клеток. Тем не менее, полученные в нашей работе данные о корреляции числа копий мтДНК и количества копий плазмидной ДНК, также позволяют предположить наличие единого механизма, приводящего к этим изменениям. Выдвинутая нами гипотеза о замедлении клеточного цикла подразумевает увеличение продолжительности S-фазы, для которой, как было сказано ранее, необходимо большое количество энергии. Мы можем предположить, что интенсивная и более длительная репликация ДНК, за счет взаимной регуляции, способна приводить к аналогичному изменению в синтезе мтДНК. В свою очередь, увеличение числа копий мтДНК, вероятно, позволяет клеткам эффективнее приспосабливаться к нарушениям в процессе терминации трансляции.

4.3 Потенциальные механизмы возникновения адаптивных изменений числа копий генов *SUP45* и *SUP35*

Наконец, полученные нами результаты транскриптомного анализа свидетельствуют в пользу гипотезы о нестабильности генома, замедлении клеточного цикла и неправильной сегрегации плазмид и/или хромосом как механизме амплификации мутантных аллелей *sup45-n* и *sup35-n*. Предположительно это происходит в результате нарушения нормального течения клеточного цикла, что подтверждается скоррелированными изменениями экспрессии целого ряда генов, контролирующих этот процесс.

В норме клеточный цикл можно разделить на четыре фазы: фаза роста (G1), во время которой происходит значительное увеличение объема клетки, за которой следует (S) фаза синтеза ДНК, во время которой ДНК реплицируется (**рис. 37**). После этого клетка вступает во вторую фазу роста (G2), появляется почка, которая становится в дочерней клеткой; заканчивается процесс митотической фазой (M), и происходит деление, дающее начало дочерней клетке [Perrino et al., 2021]. Прогрессирование клеточного цикла в основном контролируется семейством циклин-зависимых киназ (CDK) и их взаимодействием с белками, которые синтезируются циклично во время клеточного цикла — циклинами. Основная CDK у дрожжей кодируется геном *CDC28*. Cdc28 может образовывать комплекс с двумя семействами циклинов, известных как CLN и CLB. Активность семейства CLN ограничена G1-фазой, а семейство CLB в основном контролирует активность CDK в S, G2 и M-фазах [Jiménez et al., 2015]. При

переходе G2-M инактивация комплекса CDK-циклинов осуществляется APC/C (комплекс, стимулирующий анафазу), который индуцирует деградацию циклина протеасомой в сочетании с двумя кофакторами: Cdc20, который запускает первую волну инактивации CDK в метафазе, и Cdh1, который действует позже в митозе [Matellán, Monje-Casas, 2020]. Непосредственно в метафазе, когда все кинетохоры прикреплены к микротрубочкам, комплекс APC/C-Cdc20 убиквитинилирует секурин (белок, кодируемый геном *PDS1*), участвующий в управлении метафазно-анафазным переходом, и CLB. Это событие активирует протеазную сепаразу (*ESP1*) и инактивирует CDK. Сепараза, в свою очередь, расщепляет когезиновые комплексы, которые удерживают сестринские хроматиды вместе и тем самым инициирует разделение сестринских хроматид в анафазе. Инактивация CDK приводит к дефосфорилированию субстратов фосфатазой Cdc28 и тем самым обеспечивает выход из митоза [Peters, 2006].

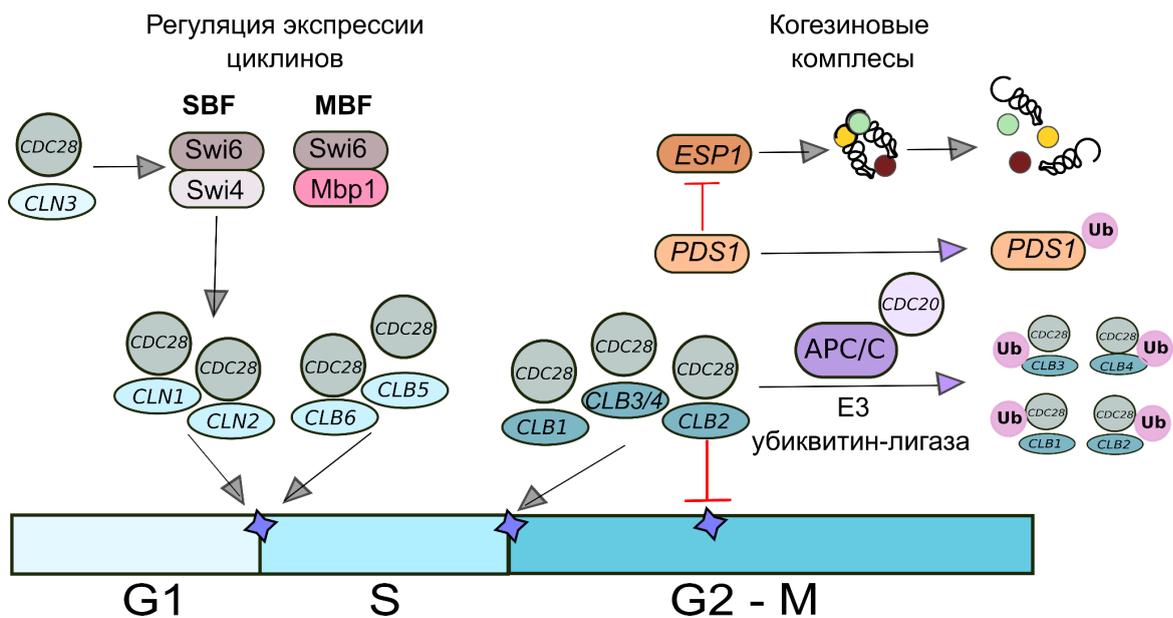


Рисунок 37. Фрагмент общей схемы регуляции клеточного цикла (модифицировано из Bloom, Cross, 2007). Фиолетовыми звездочками отмечены контрольные точки в регуляции клеточного цикла. Серые стрелки отображают направление процесса, красные перпендикулярные линии обозначают репрессию процесса. Фиолетовые стрелки обозначают направление процесса и его регуляцию комплексом APC/C и Cdc20. Ub - убиквитинилирование.

В случае клеток, несущих мутацию *sup35-218*, (рис. 38А - справа) мы наблюдаем значительные изменения в экспрессии генов, отвечающих за протекание клеточного

цикла. На фоне снижения экспрессии компонентов комплекса APC/C (*APC9*, *CDC23*) и Cdc20 увеличивается экспрессия как циклинов, так и субъединиц когезинового комплекса *SMC3* и *MCD1*. Помимо этого было обнаружено увеличение экспрессии *CDC28*, который участвует на всех стадиях клеточного цикла и генов, преимущественно задействованных в S фазе в синтезе ДНК (*ORC2*, *CLB5*, *CLB6*).

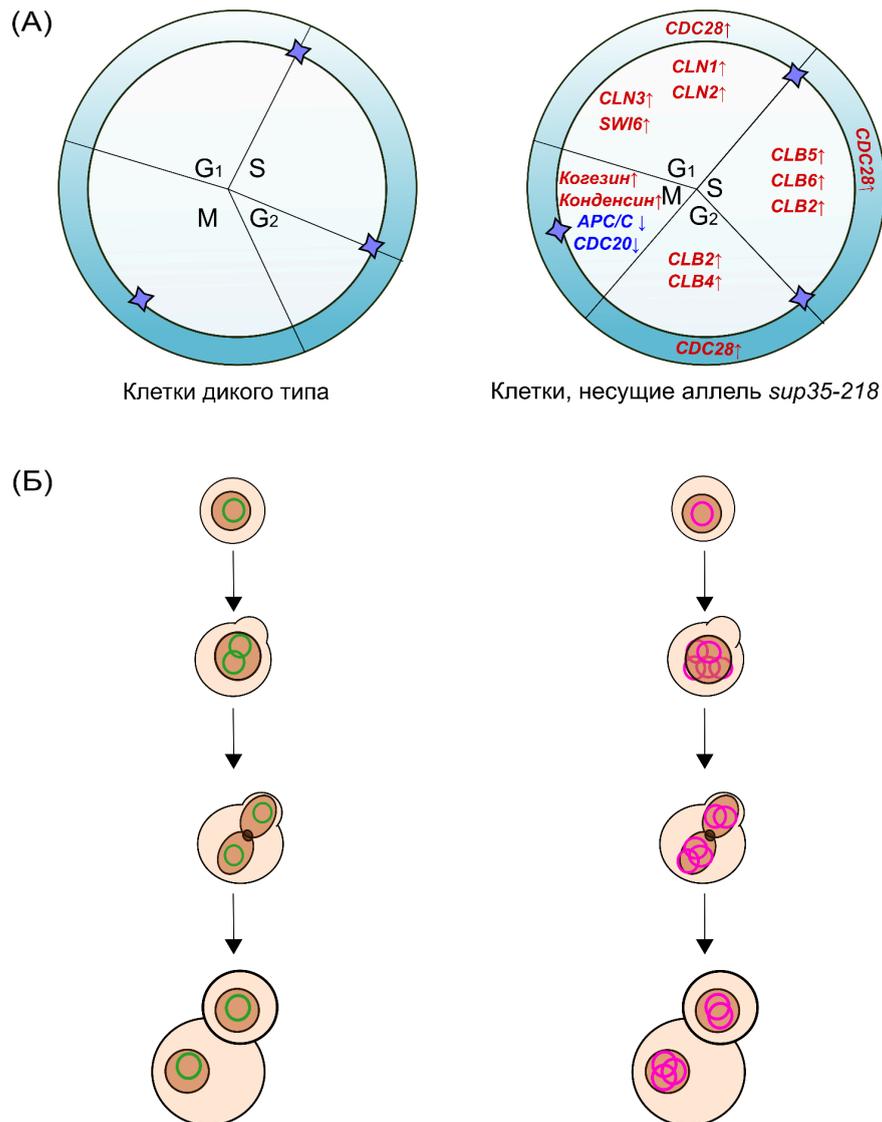


Рисунок 38. Изменения в клеточном цикле у клеток, несущих мутацию *sup35-218*.
 А) Предположительные изменения в протекании фаз клеточного цикла в клетках, несущих аллель *sup35-218* (справа) по сравнению с клетками несущими аллель *SUP35* (слева). Фиолетовыми звездочками отмечены контрольные точки в регуляции клеточного цикла. Гены с повышенной экспрессией изображены красным цветом (соответственно **рис. 36**) и отмечены стрелкой вверх, гены со сниженной экспрессией изображены синим и отмечены стрелкой вниз. Б) Схема изменений, происходящих репликации и сегрегации плазмид (розовые кольца) в клетках, несущих аллель

sup35-218 (справа), по сравнению с клетками, несущими плазмиду (зеленые кольца) с аллелью *SUP35* (слева).

Регуляция нормального течения клеточного цикла является сложным многоступенчатым процессом и контролируется на транскрипционном, трансляционном, посттрансляционном уровнях. Мы предполагаем, что изменения на транскрипционном уровне, обнаруженные в клетках, несущих мутантные аллели *sup45-105* или *sup35-218*, оказывают влияние на клеточный цикл, однако для некоторых генов с измененной экспрессией регуляция может осуществляться и на уровне их белковых продуктов. Так, регуляция продуктов генов *ORC2*, *SWI6* и *CDC28* преимущественно происходит на посттрансляционном уровне [Lee et al., 2012; Mendenhall, Hodge, 1998; Sidorova et al., 1995], однако было показано что регуляция транскрипции гена *CDC28* может происходить за счет индукции длинных некодирующих РНК при помощи стресс-чувствительного белка Hog1 [Nadal-Ribelles et al., 2014]. В свою очередь было показано, что *MCM2* поддерживает постоянство уровня плоидности в эукариотических клетках, при этом повышенная экспрессия этого гена, наблюдается в тканях рака молочной железы человека [Samad et al., 2020]. Мы также обнаружили повышенную экспрессию генов, кодирующих циклины семейств CLN и CLB и субъединицы когезинового комплекса *SMC3*, *IRR1* и *MCD1*. Функция Smc3 регулируется ацетилированием, которое необходимо для установления спаривания сестринских хроматид [Beckouët et al., 2010]. *IRR1* ответственен за загрузку когезинового комплекса на хромосому и его удаление, избыточное количество этого белка было обнаружено в клетках арестованных в фазе G1 [Kowalec et al., 2017]. Характер экспрессии *MCD1* зависит от стадии клеточного цикла, это позволяет предположить, что белок участвует в морфогенезе хромосом от S-фазы до митоза. Было обнаружено, что мутантный *mcd1* приводит к нарушению спаривания сестринских хроматид и конденсации хромосом [Guacci et al., 1997]. Известно, что циклины регулируются на транскрипционном и пост-транскрипционном уровне и экспрессируются и деградируют в альтернативных фазах клеточного цикла. Семейство CLN состоит из Cln1, Cln2, Cln3, которые экспрессируются преимущественно в фазе G1. Циклины типа CLB, с другой стороны, регулируют более поздние стадии клеточного цикла, включая репликацию ДНК и вступление в митоз. Чтобы предотвратить преждевременную репликацию ДНК, активность первых экспрессируемых циклинов В-типа, Clb5/6, ингибируется за счет высоких уровней ингибитора циклин-зависимой киназы Sic1 во время G1. *CLB4* экспрессируется

преимущественно в середине S-фазы, но его функции на данный момент не до конца изучены [Adler et al., 2022]. Активность гена *MOB1*, чья повышенная экспрессия обнаружена в клетках несущих мутацию *sup45-105* изменяется в течении клеточного цикла и достигает своего пика перед переходом G2-M [Komarnitsky et al., 1998]. Помимо увеличения экспрессии генов, участвующих в основном в синтезе и компактировании ДНК, в присутствии нонсенс-мутантных аллелей мы наблюдали снижение транскрипции генов, участвующих в митозе и, в частности, в метафазно-анафазном переходе. К ним относятся регулируемый транскрипционно и пост-транскрипционно *CDC20* [Wang et al., 2017] и компоненты комплекса, стимулирующего анафазу (APC/C), такие как *CDC23* и *APC9*. *Apс9* является несущественным компонентом APC, однако делеционные мутанты *apс9* замедляют прогрессирование митоза [Mendenhall, Hodge, 1998]. *Cdc23* был идентифицирован как консервативная субъединица APC/C [Zachariae et al., 1998], и было показано, что мутанты *cdc23* имеют дефекты в делении ядра у *S.cerevisiae* [Newlon, Fangman, 1975]. Предыдущие исследования показали, что штаммы *S. cerevisiae*, несущие мутантный *cdc23*, фенотипически выглядят как клетки, арестованные в метафазе, с большим количеством микротрубочек, исходящих от полюса и заканчивающихся близко к центру веретена [Lamb et al., 1994]. Кроме того, клетки с мутацией в гене *CDC23* у дрожжей также демонстрировали нарушения как при входе в анафазу, так и при выходе из нее [Igniger et al., 1995], что позволяет предположить, что *Cdc23* может играть важную роль, по крайней мере, в двух стадиях клеточного цикла: переходе из метафазы в анафазу и переходе из телофазы в G1. Другие исследователи обнаружили, что *Cdc23* участвует в процессе репликации ДНК при пролиферации клеток, что свидетельствует о разнообразных функциях *Cdc23* [Gregan et al., 2003; Hart et al., 2002; Lee et al., 2003; Zhou et al., 2020].

Более 30 лет назад было обнаружено, что мутация (*gst1*) [Kikuchi et al., 1988], которая находится в гене *SUP35*, приводит к нарушению и остановке клеточного цикла в фазе G1. Такие мутанты не были способны ни к продолжению клеточного цикла, ни к копуляции [Borkhsenius, Inge-Vechtomo, 1997]. В 2002 году Валуев et al. продемонстрировали влияние репрессии eRF1 и eRF3 на прогрессирование клеточного цикла и морфологию клеток дрожжей. С помощью световой микроскопии было проанализировано более 200 клеток, и было обнаружено, что репрессия *SUP45* уменьшает количество отпочковавшихся клеток, тогда как репрессия *SUP35-C*

увеличивает долю крупных отпочковавшихся клеток, изменяет их форму, значительно увеличивает размер клеток. Помимо этого наблюдались дефекты разделения клеток и образование клеточных цепей, а проточная цитометрия показала, наличие небольшого сдвига распределения в клеточном цикле в сторону содержания диплоидной ДНК. Было замечено, что после репрессии eRF3C примерно 85% крупных отпочковавшихся клеток имели различные изменения митоза, такие как множественность веретен и дефекты их структуры и/или ориентации. Эти данные свидетельствуют в пользу того, что мутация, затрагивающая С-часть продукта гена eRF3, может влиять на сегрегацию хромосом и плазмид [Valouev et al., 2002], и приводить к амплификации мутантных аллелей.

Результаты данной работы демонстрируют, что адаптация клеток к нонсенс-мутациям в генах факторов терминации трансляции осуществляется за счет амплификации числа копий плазмиды (гена или хромосомы) (**рис. 38Б**). Наблюдаемое увеличение экспрессии циклинов (на стадиях G1, S и G2) регулируемых транскрипционно, снижение эффективности комплекса, стимулирующего анафазу, с учетом имеющихся литературных данных 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. Увеличение числа копий мтДНК может способствовать обеспечению дополнительной энергией для увеличения интенсивности синтетических процессов. 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, Weinert, 2017]. В данной работе у изучаемых штаммов мы обнаруживаем геномную нестабильность, что как раз может свидетельствовать о нарушении протекания или укорочении G2-M фаз. В результате вышеописанных изменений, возникают клетки

содержащие большее число копий мутантной аллели *sup45-n* или *sup35-n*, они способны эффективнее поддерживать вышеупомянутый “оптимальный” для данной аллели уровень нонсенс-супрессии, что повышает их жизнеспособность и дает селективное преимущество.

5. 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.

6. СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Журавлёва Г.А. и др. Роль белков, взаимодействующих с факторами терминации трансляции eRF1 и eRF3, в регуляции трансляции и прионизации // Молекулярная биология, 2022, Т. 56, № 2, стр. 206-226
2. Захаров И. А., Кожин С. А., Кожина Т. Н., Федорова И. В. Сборник методик по генетике дрожжей-сахаромицетов / под ред. М. Н. Мейселя. — Л.: Наука, 1984.
3. Самбук Е. В., Тер-Аванесян М. Д. Восстановление активности кислой фосфатазы I и фосфорибозиламиноимидазолкарбоксилазы в результате супрессии охр-мутаций в генах *pho1* и *ade2* у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* // Генетика. — 1980. — Т. XVI, № 5. — С. 833—839.
4. Самсонова М.Г., Андрианова В.М., Борщевская, Т.Н., Чунаев, А.С. Петергофские генетические коллекции микроорганизмов // Генетика. 1994. Т. 30 № 8. С. 1123-1129.
5. Adler S. O. et al. A yeast cell cycle model integrating stress, signaling, and physiology // FEMS Yeast Res. 2022. Т. 22. № 1. С. foac026.
6. Ahn Y. T. et al. The 2microm-plasmid-encoded Rep1 and Rep2 proteins interact with each other and colocalize to the *Saccharomyces cerevisiae* nucleus // J. Bacteriol. 1997. Т. 179. № 23. С. 7497–7506.
7. Alkalaeva E. Z. et al. In Vitro Reconstitution of Eukaryotic Translation Reveals Cooperativity between Release Factors eRF1 and eRF3 // Cell. 2006. Т. 125. № 6. С. 1125–1136.
8. Amrani N. et al. A faux 3'-UTR promotes aberrant termination and triggers nonsense-mediated mRNA decay // Nature. 2004. Т. 432. № 7013. С. 112–118.
9. Andjelković N. et al. The catalytic subunit of protein phosphatase 2A associates with the translation termination factor eRF1 // EMBO J. 1996. Т. 15. № 24. С. 7156–7167.
10. Andrianova V.M., Samsonova M.G., Sopova Y.V., Inge-Vechtomov S.G. Catalogue of Peterhof genetic collection of yeast *Saccharomyces cerevisiae*. St Petersburg, 2003.
11. Antonarakis S. E. et al. Chromosome 21 and Down syndrome: from genomics to pathophysiology // Nat. Rev. Genet. 2004. Т. 5. № 10. С. 725–738.
12. Aouizerat T. et al. Isolation and Characterization of Live Yeast Cells from Ancient Vessels as a Tool in Bio-Archaeology // mBio. 2019. Т. 10. № 2. С. e00388-19.
13. Bailleul P. A. et al. Genetic study of interactions between the cytoskeletal assembly protein *sla1* and prion-forming domain of the release factor Sup35 (eRF3) in

- Saccharomyces cerevisiae* // *Genetics*. 1999. T. 153. № 1. C. 81–94.
14. Barbitoff Y. A. et al. Chromosome-level genome assembly and structural variant analysis of two laboratory yeast strains from the Peterhof Genetic Collection lineage // *G3 GenesGenomesGenetics*. 2021. T. 11. № 4. C. jkab029.
 15. Beckouët F. et al. An Smc3 acetylation cycle is essential for establishment of sister chromatid cohesion // *Mol. Cell*. 2010. T. 39. № 5. C. 689–699.
 16. Beier H. Misreading of termination codons in eukaryotes by natural nonsense suppressor tRNAs // *Nucleic Acids Res.* 2001. T. 29. № 23. C. 4767–4782.
 17. Beißel C. et al. Translation termination depends on the sequential ribosomal entry of eRF1 and eRF3 // *Nucleic Acids Res.* 2019. T. 47. № 9. C. 4798–4813.
 18. Belda I. et al. *Saccharomyces cerevisiae* // *Trends Genet. TIG*. 2019. T. 35. № 12. C. 956–957.
 19. Benjin X., Ling L. Developments, applications, and prospects of cryo-electron microscopy // *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* 2020. T. 29. № 4. C. 872–882.
 20. Bertram G. et al. Terminating eukaryote translation: domain 1 of release factor eRF1 functions in stop codon recognition // *RNA N. Y. N.* 2000. T. 6. № 9. C. 1236–1247.
 21. Betney R. et al. Autoregulatory systems controlling translation factor expression: Thermostat-like control of translational accuracy // *RNA*. 2010. T. 16. № 4. C. 655–663.
 22. Betney R. et al. Regulation of release factor expression using a translational negative feedback loop: A systems analysis // *RNA*. 2012. T. 18. № 12. C. 2320–2334.
 23. Beznosková P. et al. Translation Initiation Factors eIF3 and HCR1 Control Translation Termination and Stop Codon Read-Through in Yeast Cells // *PLoS Genet.* 2013. T. 9. № 11. C. e1003962.
 24. Beznosková P. et al. Translation initiation factor eIF3 promotes programmed stop codon readthrough // *Nucleic Acids Res.* 2015. T. 43. № 10. C. 5099–5111.
 25. Biziaev N. et al. Recognition of 3' nucleotide context and stop codon readthrough are determined during mRNA translation elongation // *J. Biol. Chem.* 2022. T. 298. № 7. C. 102133.
 26. Blanchet S. et al. New insights into the incorporation of natural suppressor tRNAs at stop codons in *Saccharomyces cerevisiae* // *Nucleic Acids Res.* 2014. T. 42. № 15. C. 10061–10072.
 27. Blanchet S. et al. New insights into stop codon recognition by eRF1 // *Nucleic Acids Res.* 2015. T. 43. № 6. C. 3298–3308.

28. Blanchet S., Ranjan N. Translation Phases in Eukaryotes // *Methods Mol. Biol.* Clifton NJ. 2022. T. 2533. C. 217–228.
29. Bloom J., Cross F. R. Multiple levels of cyclin specificity in cell-cycle control // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2007. T. 8. № 2. C. 149–160.
30. Bogenhagen D., Clayton D. A. Mouse L cell mitochondrial DNA molecules are selected randomly for replication throughout the cell cycle // *Cell.* 1977. T. 11. № 4. C. 719–727.
31. Bonetti B. et al. The efficiency of translation termination is determined by a synergistic interplay between upstream and downstream sequences in *Saccharomyces cerevisiae* // *J. Mol. Biol.* 1995. T. 251. № 3. C. 334–345.
32. Borchsenius A. S., Tchourikova A. A., Inge-Vechtomov S. G. Recessive mutations in *SUP35* and *SUP45* genes coding for translation release factors affect chromosome stability in *Saccharomyces cerevisiae* // *Curr. Genet.* 2000. T. 37. № 5. C. 285–291.
33. Borkhsenius A. S., Inge-Vechtomov S. G. The role of *SUP35* and *SUP45* genes in controlling *Saccharomyces* cell cycle // *Dokl. Akad. Nauk.* 1997. T. 353. № 4. C. 553–556.
34. Brachmann C. B. et al. Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications // *Yeast* Chichester Engl. 1998. T. 14. № 2. C. 115–132.
35. Broach J. R., Guarascio V. R., Jayaram M. Recombination within the yeast plasmid 2 μ circle is site-specific // *Cell.* 1982. T. 29. № 1. C. 227–234.
36. Brown A. et al. Structural basis for stop codon recognition in eukaryotes // *Nature.* 2015. T. 524. № 7566. C. 493–496.
37. Celik A., Kervestin S., Jacobson A. NMD: At the crossroads between translation termination and ribosome recycling // *Biochimie.* 2015. T. 114. C. 2–9.
38. Chabelskaya S. et al. Nonsense mutations in the essential gene *SUP35* of *Saccharomyces cerevisiae* are non-lethal // *Mol. Genet. Genomics.* 2004. T. 272. № 3. C. 297–307.
39. Chabelskaya S. et al. Inactivation of NMD increases viability of *sup45* nonsense mutants in *Saccharomyces cerevisiae* // *BMC Mol. Biol.* 2007. T. 8. № 1. C. 71.
40. Chan K.-M. et al. The 2 micron plasmid of *Saccharomyces cerevisiae*: A miniaturized selfish genome with optimized functional competence // *Plasmid.* 2013. T. 70. № 1. C. 2–17.

41. Chang S.-L. et al. Dynamic Large-Scale Chromosomal Rearrangements Fuel Rapid Adaptation in Yeast Populations // PLoS Genet. 2013. T. 9. № 1. C. e1003232.
42. Charron G., Leducq J.-B., Landry C. R. Chromosomal variation segregates within incipient species and correlates with reproductive isolation // Mol. Ecol. 2014. T. 23. № 17. C. 4362–4372.
43. Chauvin C. et al. Involvement of Human Release Factors eRF3a and eRF3b in Translation Termination and Regulation of the Termination Complex Formation // Mol. Cell. Biol. 2005. T. 25. № 14. C. 5801–5811.
44. Chen J., Garfinkel D. J., Bergman C. M. Long-Read Genome Assembly of *Saccharomyces uvarum* Strain CBS 7001 // Microbiol. Resour. Announc. 2022. T. 11. № 1. C. e00972-21.
45. Cheng Z. et al. Structural insights into eRF3 and stop codon recognition by eRF1 // Genes Dev. 2009. T. 23. № 9. C. 1106–1118.
46. Chernoff Y. O. et al. Role of the Chaperone Protein Hsp104 in Propagation of the Yeast Prion-Like Factor [*psi*⁺] // Science. 1995. T. 268. № 5212. C. 880–884.
47. Christianson T. W. et al. Multifunctional yeast high-copy-number shuttle vectors // Gene. 1992. T. 110. № 1. C. 119–122.
48. Claycomb J. M. et al. Gene amplification as a developmental strategy: isolation of two developmental amplicons in *Drosophila* // Dev. Cell. 2004. T. 6. № 1. C. 145–155.
49. Contamine V., Picard M. Maintenance and Integrity of the Mitochondrial Genome: a Plethora of Nuclear Genes in the Budding Yeast // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2000. T. 64. № 2. C. 281–315.
50. Cosson B. et al. Characterization of the poly(A) binding proteins expressed during oogenesis and early development of *Xenopus laevis* // Biol. Cell. 2002. T. 94. № 4–5. C. 217–231.
51. De Chiara M. et al. Domestication reprogrammed the budding yeast life cycle // Nat. Ecol. Evol. 2022. T. 6. № 4. C. 448–460.
52. Dever T. E., Green R. The Elongation, Termination, and Recycling Phases of Translation in Eukaryotes // Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2012. T. 4. № 7. C. a013706–a013706.
53. Dever T. E., Kinzy T. G., Pavitt G. D. Mechanism and Regulation of Protein Synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* // Genetics. 2016. T. 203. № 1. C. 65–107.
54. Dhar R. et al. Adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to saline stress through

- laboratory evolution // *J. Evol. Biol.* 2011. T. 24. № 5. C. 1135–1153.
55. Drozdova P. B. et al. Genome Sequencing and Comparative Analysis of *Saccharomyces cerevisiae* Strains of the Peterhof Genetic Collection // *PloS One*. 2016a. T. 11. № 5. C. e0154722.
56. Drozdova P., Mironova L., Zhouravleva G. Haploid yeast cells undergo a reversible phenotypic switch associated with chromosome II copy number // *BMC Genet.* 2016b. T. 17. № S3. C. 152.
57. Dubovaia V. I. et al. [Influence of individual domains of the translation termination factor eRF1 on induction of the GTPase activity of the translation termination factor eRF3] // *Mol. Biol. (Mosk.)*. 2006. T. 40. № 2. C. 310–316.
58. Dujon B. Basic principles of yeast genomics, a personal recollection: Graphical Abstract Figure. // *FEMS Yeast Res.* 2015. T. 15. № 5. C. fov047.
59. Dunham M. J. et al. Characteristic genome rearrangements in experimental evolution of *Saccharomyces cerevisiae* // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2002. T. 99. № 25. C. 16144–16149.
60. Egorova T. et al. eIF3j facilitates loading of release factors into the ribosome // *Nucleic Acids Res.* 2021. T. 49. № 19. C. 11181–11196.
61. Eyler D. E., Wehner K. A., Green R. Eukaryotic Release Factor 3 Is Required for Multiple Turnovers of Peptide Release Catalysis by Eukaryotic Release Factor 1 // *J. Biol. Chem.* 2013. T. 288. № 41. C. 29530–29538.
62. Franzmann T. M. et al. Phase separation of a yeast prion protein promotes cellular fitness // *Science*. 2018. T. 359. № 6371. C. eaao5654.
63. Frolova L. et al. A highly conserved eukaryotic protein family possessing properties of polypeptide chain release factor // *Nature*. 1994. T. 372. № 6507. C. 701–703.
64. Frolova L., Seit-Nebi A., Kisselev L. Highly conserved NIKS tetrapeptide is functionally essential in eukaryotic translation termination factor eRF1 // *RNA N. Y. N.* 2002. T. 8. № 2. C. 129–136.
65. Frolova L. Y. et al. Mutations in the highly conserved GGQ motif of class 1 polypeptide release factors abolish ability of human eRF1 to trigger peptidyl-tRNA hydrolysis // *RNA N. Y. N.* 1999. T. 5. № 8. C. 1014–1020.
66. Fu Z. et al. The structural basis for release-factor activation during translation termination revealed by time-resolved cryogenic electron microscopy // *Nat. Commun.* 2019. T. 10. № 1. C. 2579.
67. Galdieri L. et al. Reduced Histone Expression or a Defect in Chromatin Assembly

- Induces Respiration // *Mol. Cell. Biol.* 2016. T. 36. № 7. C. 1064–1077.
68. Galeota-Sprung B., Fernandez A., Sniegowski P. Changes to the mtDNA copy number during yeast culture growth // *R. Soc. Open Sci.* 2022. T. 9. № 7. C. 211842.
69. Gao H. et al. RF3 induces ribosomal conformational changes responsible for dissociation of class I release factors // *Cell.* 2007. T. 129. № 5. C. 929–941.
70. Gasch A. P. et al. Further support for aneuploidy tolerance in wild yeast and effects of dosage compensation on gene copy-number evolution // *eLife.* 2016. T. 5. C. e14409.
71. Goffeau A. et al. Life with 6000 Genes // *Science.* 1996. T. 274. № 5287. C. 546–567.
72. Göke A. et al. Mrx6 regulates mitochondrial DNA copy number in *Saccharomyces cerevisiae* by engaging the evolutionarily conserved Lon protease Pim1 // *Mol. Biol. Cell.* 2020. T. 31. № 7. C. 527–545.
73. Gong H. et al. Polyglutamine Toxicity Is Controlled by Prion Composition and Gene Dosage in Yeast // *PLoS Genet.* 2012. T. 8. № 4. C. e1002634.
74. Graf M. et al. Visualization of translation termination intermediates trapped by the Apidaecin 137 peptide during RF3-mediated recycling of RF1 // *Nat. Commun.* 2018. T. 9. № 1. C. 3053.
75. Gregan J. et al. Fission yeast Cdc23/Mcm10 functions after pre-replicative complex formation to promote Cdc45 chromatin binding // *Mol. Biol. Cell.* 2003. T. 14. № 9. C. 3876–3887.
76. Gresham D. et al. Adaptation to diverse nitrogen-limited environments by deletion or extrachromosomal element formation of the *GAPI* locus // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2010. T. 107. № 43. C. 18551–18556.
77. Gross T. et al. The DEAD-Box RNA Helicase Dbp5 Functions in Translation Termination // *Science.* 2007. T. 315. № 5812. C. 646–649.
78. Guacci V., Koshland D., Strunnikov A. A direct link between sister chromatid cohesion and chromosome condensation revealed through the analysis of MCD1 in *S. cerevisiae* // *Cell.* 1997. T. 91. № 1. C. 47–57.
79. Gurevich A. et al. QUAST: quality assessment tool for genome assemblies // *Bioinformatics.* 2013. T. 29. № 8. C. 1072–1075.
80. Hamza A., Baetz K. Iron-responsive transcription factor Aft1 interacts with kinetochore protein Iml3 and promotes pericentromeric cohesin // *J. Biol. Chem.* 2012. T. 287. № 6. C. 4139–4147.
81. Hanahan D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids // *J. Mol. Biol.* 1983. T. 166. № 4. C. 557–580.

82. Harbauer A. B. et al. Mitochondria. Cell cycle-dependent regulation of mitochondrial preprotein translocase // *Science*. 2014. T. 346. № 6213. C. 1109–1113.
83. Hart E. A. et al. Fission yeast Cdc23 interactions with DNA replication initiation proteins // *Curr. Genet.* 2002. T. 41. № 5. C. 342–348.
84. Hastings P. J. et al. Adaptive Amplification and Point Mutation Are Independent Mechanisms: Evidence for Various Stress-Inducible Mutation Mechanisms // *PLOS Biol.* 2004. T. 2. № 12. C. e399.
85. Hauryliuk V. et al. Class-1 release factor eRF1 promotes GTP binding by class-2 release factor eRF3 // *Biochimie*. 2006. T. 88. № 7. C. 747–757.
86. Hegemann J. H. et al. Mutational Analysis of Centromere DNA from Chromosome VI of *Saccharomyces cerevisiae* // *Mol. Cell. Biol.* 1988. T. 8. № 6. C. 2523–2535.
87. Hellen C. U. T. Translation Termination and Ribosome Recycling in Eukaryotes // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2018. T. 10. № 10. C. a032656.
88. Helsen C. W., Glover J. R. Insight into Molecular Basis of Curing of [PSI⁺] Prion by Overexpression of 104-kDa Heat Shock Protein (Hsp104) // *J. Biol. Chem.* 2012. T. 287. № 1. C. 542–556.
89. Hieter P. Mitotic stability of yeast chromosomes: A colony color assay that measures nondisjunction and chromosome loss // *Cell*. 1985. T. 40. № 2. C. 381–392.
90. Hose J. et al. Dosage compensation can buffer copy-number variation in wild yeast // *eLife*. 2015. T. 4. C. e05462.
91. Hoshino S. et al. The Eukaryotic Polypeptide Chain Releasing Factor (eRF3/GSPT) Carrying the Translation Termination Signal to the 3'-Poly(A) Tail of mRNA // *J. Biol. Chem.* 1999. T. 274. № 24. C. 16677–16680.
92. Huang M., Zhou Z., Elledge S. J. The DNA replication and damage checkpoint pathways induce transcription by inhibition of the Crt1 repressor // *Cell*. 1998. T. 94. № 5. C. 595–605.
93. Hwang Y. L., Lindegren G., Lindegren C. C. THE TWELFTH CHROMOSOME OF *SACCHAROMYCES* // *Can. J. Genet. Cytol. J. Can. Genet. Cytol.* 1964. T. 6. C. 373–380.
94. Hyma K. E., Fay J. C. Mixing of vineyard and oak-tree ecotypes of *Saccharomyces cerevisiae* in North American vineyards // *Mol. Ecol.* 2013. T. 22. № 11. C. 2917–2930.
95. Inge-Vechtomov S. G. Template principle in biology (the past, the present, the future?) // *Ecol. Genet.* 2003. T. 1. № 1. C. 6–15.

96. Inoue H., Nojima H., Okayama H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids // *Gene*. 1990. T. 96. № 1. C. 23–28.
97. Irniger S. et al. Genes involved in sister chromatid separation are needed for B-type cyclin proteolysis in budding yeast // *Cell*. 1995. T. 81. № 2. C. 269–278.
98. Istace B. et al. de novo assembly and population genomic survey of natural yeast isolates with the Oxford Nanopore MinION sequencer // *GigaScience*. 2017. T. 6. № 2.
99. Ito K. et al. Conserved motifs in prokaryotic and eukaryotic polypeptide release factors: tRNA-protein mimicry hypothesis. // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1996. T. 93. № 11. C. 5443–5448.
100. Ito K. et al. Omnipotent decoding potential resides in eukaryotic translation termination factor eRF1 of variant-code organisms and is modulated by the interactions of amino acid sequences within domain 1 // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2002. T. 99. № 13. C. 8494–8499.
101. Ito K., Uno M., Nakamura Y. Single amino acid substitution in prokaryote polypeptide release factor 2 permits it to terminate translation at all three stop codons // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1998. T. 95. № 14. C. 8165–8169.
102. Ivanov A. et al. PABP enhances release factor recruitment and stop codon recognition during translation termination // *Nucleic Acids Res.* 2016. T. 44. № 16. C. 7766–7776.
103. Ivanov A. et al. Polyadenylate-binding protein-interacting proteins PAIP1 and PAIP2 affect translation termination // *J. Biol. Chem.* 2019. T. 294. № 21. C. 8630–8639.
104. Jaillon O., Aury J.-M., Wincker P. “Changing by doubling”, the impact of Whole Genome Duplications in the evolution of eukaryotes // *C. R. Biol.* 2009. T. 332. № 2–3. C. 241–253.
105. Jiménez J. et al. Live fast, die soon: cell cycle progression and lifespan in yeast cells // *Microb. Cell Graz Austria*. 2015. T. 2. № 3. C. 62–67.
106. Jin H. et al. Structure of the 70S ribosome bound to release factor 2 and a substrate analog provides insights into catalysis of peptide release // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2010. T. 107. № 19. C. 8593–8598.
107. Jones G. M. et al. A systematic library for comprehensive overexpression screens in *Saccharomyces cerevisiae* // *Nat. Methods*. 2008. T. 5. № 3. C. 239–241.
108. Kaiser C., Michaelis S., Mitchell A. *Methods in yeast genetics: a Cold Spring*

- Harbor laboratory course manual. Plainview, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1994. 234 c.
109. Khoshnevis S. et al. The iron–sulphur protein RNase L inhibitor functions in translation termination // *EMBO Rep.* 2010. T. 11. № 3. C. 214–219.
 110. Kiktev D. et al. The paradox of viable *sup45* STOP mutations: a necessary equilibrium between translational readthrough, activity and stability of the protein // *Mol. Genet. Genomics MGG.* 2009. T. 282. № 1. C. 83–96.
 111. Kikuchi Y., Shimatake H., Kikuchi A. A yeast gene required for the G1-to-S transition encodes a protein containing an A-kinase target site and GTPase domain // *EMBO J.* 1988. T. 7. № 4. C. 1175–1182.
 112. Kim D. et al. Graph-based genome alignment and genotyping with HISAT2 and HISAT-genotype // *Nat. Biotechnol.* 2019. T. 37. № 8. C. 907–915.
 113. Kirschner M., Gerhart J. Evolvability // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1998. T. 95. № 15. C. 8420–8427.
 114. Kolmogorov M. et al. Assembly of long, error-prone reads using repeat graphs // *Nat. Biotechnol.* 2019. T. 37. № 5. C. 540–546.
 115. Komarnitsky S. I. et al. DBF2 protein kinase binds to and acts through the cell cycle-regulated MOB1 protein // *Mol. Cell. Biol.* 1998. T. 18. № 4. C. 2100–2107.
 116. Kong C. et al. Crystal Structure and Functional Analysis of the Eukaryotic Class II Release Factor eRF3 from *S. pombe* // *Mol. Cell.* 2004. T. 14. № 2. C. 233–245.
 117. Kononenko A. V. et al. Role of the individual domains of translation termination factor eRF1 in GTP binding to eRF3 // *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* 2007. T. 70. № 2. C. 388–393.
 118. Koren S. et al. Canu: scalable and accurate long-read assembly via adaptive *k*-mer weighting and repeat separation // *Genome Res.* 2017. T. 27. № 5. C. 722–736.
 119. Korkmaz G., Sanyal S. R213I mutation in release factor 2 (RF2) is one step forward for engineering an omnipotent release factor in bacteria *Escherichia coli* // *J. Biol. Chem.* 2017. T. 292. № 36. C. 15134–15142.
 120. Korostelev A. et al. Crystal structure of a translation termination complex formed with release factor RF2 // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2008. T. 105. № 50. C. 19684–19689.
 121. Korostelev A. et al. Recognition of the amber UAG stop codon by release factor RF1 // *EMBO J.* 2010. T. 29. № 15. C. 2577–2585.
 122. Korostelev A. A. The Structural Dynamics of Translation // *Annu. Rev. Biochem.*

2022. T. 91. C. 245–267.
123. Koutmou K. S. et al. RF3:GTP promotes rapid dissociation of the class 1 termination factor // *RNA N. Y. N.* 2014. T. 20. № 5. C. 609–620.
124. Kowalec P., Fronk J., Kurlandzka A. The Irr1/Scs3 protein implicated in chromosome segregation in *Saccharomyces cerevisiae* has a dual nuclear-cytoplasmic localization // *Cell Div.* 2017. T. 12. C. 1.
125. Kozlov G., Gehring K. Molecular Basis of eRF3 Recognition by the MLLE Domain of Poly(A)-Binding Protein // *PLoS ONE.* 2010. T. 5. № 4. C. e10169.
126. Kryuchkova P. et al. Two-step model of stop codon recognition by eukaryotic release factor eRF1 // *Nucleic Acids Res.* 2013. T. 41. № 8. C. 4573–4586.
127. Kushnirov V. V. et al. Nucleotide sequence of the *SUP2 (SUP35)* gene of *Saccharomyces cerevisiae* // *Gene.* 1988. T. 66. № 1. C. 45–54.
128. Kushnirov V. V. et al. Divergence and conservation of *SUP2(SUP35)* gene of yeasts *Pichia pinus* and *Saccharomyces cerevisiae* // *Yeast.* 1990. T. 6. № 6. C. 461–472.
129. Lamb J. R. et al. Cdc16p, Cdc23p and Cdc27p form a complex essential for mitosis // *EMBO J.* 1994. T. 13. № 18. C. 4321–4328.
130. Le Goff C. et al. Mouse *GSPT2*, but not *GSPT1*, can substitute for yeast eRF3 *in vivo*: Mouse *GSPT2* can substitute for yeast eRF3 // *Genes Cells.* 2002. T. 7. № 10. C. 1043–1057.
131. Leducq J.-B. et al. Local climatic adaptation in a widespread microorganism // *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 2014. T. 281. № 1777. C. 20132472.
132. Lee J.-K., Seo Y.-S., Hurwitz J. The Cdc23 (Mcm10) protein is required for the phosphorylation of minichromosome maintenance complex by the Dfp1-Hsk1 kinase // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2003. T. 100. № 5. C. 2334–2339.
133. Lee K. Y. et al. Phosphorylation of ORC2 protein dissociates origin recognition complex from chromatin and replication origins // *J. Biol. Chem.* 2012. T. 287. № 15. C. 11891–11898.
134. Li H. et al. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools // *Bioinforma. Oxf. Engl.* 2009. T. 25. № 16. C. 2078–2079.
135. Li H., Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows–Wheeler transform // *Bioinformatics.* 2009. T. 25. № 14. C. 1754–1760.
136. Liao Y., Smyth G. K., Shi W. featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features // *Bioinformatics.* 2014. T. 30. № 7.

- C. 923–930.
137. Libuda D. E., Winston F. Amplification of histone genes by circular chromosome formation in *Saccharomyces cerevisiae* // *Nature*. 2006. T. 443. № 7114. C. 1003–1007.
 138. Libuda D. E., Winston F. Alterations in DNA replication and histone levels promote histone gene amplification in *Saccharomyces cerevisiae* // *Genetics*. 2010. T. 184. № 4. C. 985–997.
 139. Liljas A., Sanyal S. The enigmatic ribosomal stalk // *Q. Rev. Biophys.* 2018. T. 51. C. e12.
 140. Lindegren C. C. et al. Chromosome Maps of *Saccharomyces* // *Nature*. 1959. T. 183. № 4664. C. 800–802.
 141. Liti G. et al. Population genomics of domestic and wild yeasts // *Nature*. 2009. T. 458. № 7236. C. 337–341.
 142. Liti G. The fascinating and secret wild life of the budding yeast *S. cerevisiae* // *eLife*. 2015. T. 4. C. e05835.
 143. Liu J.-J., Lindquist S. Oligopeptide-repeat expansions modulate ‘protein-only’ inheritance in yeast // *Nature*. 1999. T. 400. № 6744. C. 573–576.
 144. Liu Y.-T. et al. The Partitioning and Copy Number Control Systems of the Selfish Yeast Plasmid: An Optimized Molecular Design for Stable Persistence in Host Cells // *Microbiol. Spectr.* 2014. T. 2. № 5. C. 2.5.10.
 145. Livak K. J., Schmittgen T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method // *Methods*. 2001. T. 25. № 4. C. 402–408.
 146. Lo H.-J. et al. Nonfilamentous *C. albicans* Mutants Are Avirulent // *Cell*. 1997. T. 90. № 5. C. 939–949.
 147. Love M. I., Huber W., Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2 // *Genome Biol.* 2014. T. 15. № 12. C. 550.
 148. Macías L. G. et al. Comparative Genomics Between *Saccharomyces kudriavzevii* and *S. cerevisiae* Applied to Identify Mechanisms Involved in Adaptation // *Front. Genet.* 2019. T. 10. C. 187.
 149. Maderazo A. B. et al. Upf1p control of nonsense mRNA translation is regulated by Nmd2p and Upf3p // *Mol. Cell. Biol.* 2000. T. 20. № 13. C. 4591–4603.
 150. Magnusson J. et al. Replication of mitochondrial DNA occurs throughout the

- mitochondria of cultured human cells // *Exp. Cell Res.* 2003. T. 289. № 1. C. 133–142.
151. Maksiutenko E. M. et al. Gene Amplification as a Mechanism of Yeast Adaptation to Nonsense Mutations in Release Factor Genes // *Genes.* 2021. T. 12. № 12. C. 2019.
152. Mantsyzov A. B. et al. NMR assignments of the C-terminal domain of human polypeptide release factor eRF1 // *Biomol. NMR Assign.* 2007. T. 1. № 2. C. 183–185.
153. Mantsyzov A. B. et al. NMR solution structure and function of the C-terminal domain of eukaryotic class 1 polypeptide chain release factor // *FEBS J.* 2010. T. 277. № 12. C. 2611–2627.
154. Matellán L., Monje-Casas F. Regulation of Mitotic Exit by Cell Cycle Checkpoints: Lessons From *Saccharomyces cerevisiae* // *Genes.* 2020. T. 11. № 2. C. 195.
155. Matveenko A. G. et al. Whole genome sequencing data and analyses of the underlying SUP35 transcriptional regulation for a *Saccharomyces cerevisiae* nonsense suppressor mutant // *Data Brief.* 2019. T. 23. C. 103694.
156. McQuaid M. E. et al. The yeast 2- μ m plasmid Raf protein contributes to plasmid inheritance by stabilizing the Rep1 and Rep2 partitioning proteins // *Nucleic Acids Res.* 2017. T. 45. № 18. C. 10518–10533.
157. Meira L. B., Pêgas Henriques J. A., Magaña-Schwencke N. 8-Methoxypsoralen photoinduced plasmid-chromosome recombination in *Saccharomyces cerevisiae* using a centromeric vector // *Nucleic Acids Res.* 1995. T. 23. № 9. C. 1614–1620.
158. Melnikov S. et al. One core, two shells: bacterial and eukaryotic ribosomes // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2012. T. 19. № 6. C. 560–567.
159. Mendenhall M. D., Hodge A. E. Regulation of Cdc28 cyclin-dependent protein kinase activity during the cell cycle of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* // *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR.* 1998. T. 62. № 4. C. 1191–1243.
160. Merkulova T. I. et al. C-terminal domains of human translation termination factors eRF1 and eRF3 mediate their in vivo interaction // *FEBS Lett.* 1999. T. 443. № 1. C. 41–47.
161. Metzger M. B. et al. The Ubiquitin Ligase (E3) Psh1p Is Required for Proper Segregation of both Centromeric and Two-Micron Plasmids in *Saccharomyces cerevisiae* // *G3 GenesGenomesGenetics.* 2017. T. 7. № 11. C. 3731–3743.
162. Mikhailova T. et al. RNA helicase DDX19 stabilizes ribosomal elongation and

- termination complexes // *Nucleic Acids Res.* 2017. T. 45. № 3. C. 1307–1318.
163. Mitkevich V. A. et al. Termination of translation in eukaryotes is mediated by the quaternary eRF1-eRF3-GTP-Mg²⁺ complex. The biological roles of eRF3 and prokaryotic RF3 are profoundly distinct // *Nucleic Acids Res.* 2006. T. 34. № 14. C. 3947–3954.
164. Mitra K. et al. A hyperfused mitochondrial state achieved at G1-S regulates cyclin E buildup and entry into S phase // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2009. T. 106. № 29. C. 11960–11965.
165. Mortimer R. K., Johnston J. R. Genealogy of principal strains of the yeast genetic stock center // *Genetics.* 1986. T. 113. № 1. C. 35–43.
166. Moskalenko S. E. et al. Viable nonsense mutants for the essential gene *SUP45* of *Saccharomyces cerevisiae* // *BMC Mol. Biol.* 2003. T. 4. № 1. C. 2.
167. Murphy R., Wentz S. R. An RNA-export mediator with an essential nuclear export signal // *Nature.* 1996. T. 383. № 6598. C. 357–360.
168. Nadal-Ribelles M. et al. Control of Cdc28 CDK1 by a stress-induced lncRNA // *Mol. Cell.* 2014. T. 53. № 4. C. 549–561.
169. Nandy S. K., Srivastava R. K. A review on sustainable yeast biotechnological processes and applications // *Microbiol. Res.* 2018. T. 207. C. 83–90.
170. Newlon C. S., Fangman W. L. Mitochondrial DNA synthesis in cell cycle mutants of *Saccharomyces cerevisiae* // *Cell.* 1975. T. 5. № 4. C. 423–428.
171. Newnam G. P. et al. Antagonistic Interactions between Yeast Chaperones Hsp104 and Hsp70 in Prion Curing // *Mol. Cell. Biol.* 1999. T. 19. № 2. C. 1325–1333.
172. Ohno S. *Evolution by Gene Duplication.* Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1970.
173. Okonechnikov K., Conesa A., García-Alcalde F. Qualimap 2: advanced multi-sample quality control for high-throughput sequencing data // *Bioinforma. Oxf. Engl.* 2016. T. 32. № 2. C. 292–294.
174. Pallesen J. et al. Cryo-EM visualization of the ribosome in termination complex with apo-RF3 and RF1 // *eLife.* 2013. T. 2. C. e00411.
175. Paushkin S. V. et al. Propagation of the yeast prion-like [*psi*⁺] determinant is mediated by oligomerization of the SUP35-encoded polypeptide chain release factor // *EMBO J.* 1996. T. 15. № 12. C. 3127–3134.
176. Pavelka N., Rancati G., Li R. Dr Jekyll and Mr Hyde: role of aneuploidy in cellular adaptation and cancer // *Curr. Opin. Cell Biol.* 2010. T. 22. № 6. C. 809–815.

177. Pérez-Ortín J. E. et al. Molecular Characterization of a Chromosomal Rearrangement Involved in the Adaptive Evolution of Yeast Strains // *Genome Res.* 2002. T. 12. № 10. C. 1533–1539.
178. Perrino G. et al. Automatic synchronisation of the cell cycle in budding yeast through closed-loop feedback control // *Nat. Commun.* 2021. T. 12. № 1. C. 2452.
179. Peske F. et al. Timing of GTP binding and hydrolysis by translation termination factor RF3 // *Nucleic Acids Res.* 2014. T. 42. № 3. C. 1812–1820.
180. Peter J. et al. Genome evolution across 1,011 *Saccharomyces cerevisiae* isolates // *Nature.* 2018. T. 556. № 7701. C. 339–344.
181. Peters J.-M. The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2006. T. 7. № 9. C. 644–656.
182. Petrova A. et al. The translation termination factor eRF1 (Sup45p) of *Saccharomyces cerevisiae* is required for pseudohyphal growth and invasion // *FEMS Yeast Res.* 2015. T. 15. № 4. C. fov033.
183. Poláková S. et al. Formation of new chromosomes as a virulence mechanism in yeast *Candida glabrata* // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2009. T. 106. № 8. C. 2688–2693.
184. Pramila T. et al. Conserved homeodomain proteins interact with MADS box protein Mcm1 to restrict ECB-dependent transcription to the M/G1 phase of the cell cycle // *Genes Dev.* 2002. T. 16. № 23. C. 3034–3045.
185. Procházka E. et al. A complete sequence of *Saccharomyces paradoxus* mitochondrial genome that restores the respiration in *S. cerevisiae* // *FEMS Yeast Res.* 2012. T. 12. № 7. C. 819–830.
186. Puddu F. et al. Genome architecture and stability in the *Saccharomyces cerevisiae* knockout collection // *Nature.* 2019. T. 573. № 7774. C. 416–420.
187. Pundir S., Ge X., Sanyal S. GGQ methylation enhances both speed and accuracy of stop codon recognition by bacterial class-I release factors // *J. Biol. Chem.* 2021. T. 296. C. 100681.
188. Raithatha S. A. et al. Ume6 Acts as a Stable Platform To Coordinate Repression and Activation of Early Meiosis-Specific Genes in *Saccharomyces cerevisiae* // *Mol. Cell. Biol.* 2021. T. 41. № 7. C. e0037820.
189. Replansky T. et al. *Saccharomyces sensu stricto* as a model system for evolution and ecology // *Trends Ecol. Evol.* 2008. T. 23. № 9. C. 494–501.
190. Rhodes J., Fisher M. C. Global epidemiology of emerging *Candida auris* // *Curr.*

- Opin. Microbiol. 2019. T. 52. C. 84–89.
191. Roberts R. L., Fink G. R. Elements of a single MAP kinase cascade in *Saccharomyces cerevisiae* mediate two developmental programs in the same cell type: mating and invasive growth. // *Genes Dev.* 1994. T. 8. № 24. C. 2974–2985.
 192. Robertson L. S., Fink G. R. The three yeast A kinases have specific signaling functions in pseudohyphal growth // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1998. T. 95. № 23. C. 13783–13787.
 193. Rodnina M. V. Translation in Prokaryotes // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2018. T. 10. № 9. C. a032664.
 194. Rodnina M. V., Wintermeyer W. Recent mechanistic insights into eukaryotic ribosomes // *Curr. Opin. Cell Biol.* 2009. T. 21. № 3. C. 435–443.
 195. Rose M., Winston F. Identification of a Ty insertion within the coding sequence of the *S. cerevisiae URA3* gene // *Mol. Gen. Genet. MGG.* 1984. T. 193. № 3. C. 557–560.
 196. Roy B., Jacobson A. The intimate relationships of mRNA decay and translation // *Trends Genet.* 2013. T. 29. № 12. C. 691–699.
 197. Sabouri N. et al. Evidence for lesion bypass by yeast replicative DNA polymerases during DNA damage // *Nucleic Acids Res.* 2008. T. 36. № 17. C. 5660–5667.
 198. Samad A. et al. Computational assessment of *MCM2* transcriptional expression and identification of the prognostic biomarker for human breast cancer // *Heliyon.* 2020. T. 6. № 10. C. e05087.
 199. Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual.* Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor laboratory press, 1989. Вып. 2nd. ed.
 200. Sazer S., Sherwood S. W. Mitochondrial growth and DNA synthesis occur in the absence of nuclear DNA replication in fission yeast // *J. Cell Sci.* 1990. T. 97 (Pt 3). C. 509–516.
 201. Segal-Kischinevzky C. et al. Yeasts Inhabiting Extreme Environments and Their Biotechnological Applications // *Microorganisms.* 2022. T. 10. № 4. C. 794.
 202. Seit-Nebi A., Frolova L., Kisselev L. Conversion of omnipotent translation termination factor eRF1 into ciliate-like UGA-only unipotent eRF1 // *EMBO Rep.* 2002. T. 3. № 9. C. 881–886.
 203. Selmecki A. et al. An isochromosome confers drug resistance in vivo by amplification of two genes, *ERG11* and *TAC1* // *Mol. Microbiol.* 2008. T. 68. № 3. C.

- 624–641.
204. Selmecki A., Forche A., Berman J. Aneuploidy and isochromosome formation in drug-resistant *Candida albicans* // *Science*. 2006. T. 313. № 5785. C. 367–370.
 205. Shafin K. et al. Nanopore sequencing and the Shasta toolkit enable efficient de novo assembly of eleven human genomes // *Nat. Biotechnol.* 2020. T. 38. № 9. C. 1044–1053.
 206. Shen X.-X. et al. Tempo and Mode of Genome Evolution in the Budding Yeast Subphylum // *Cell*. 2018. T. 175. № 6. C. 1533- 1545.e20.
 207. Shi X., Joseph S. Mechanism of Translation Termination: RF1 Dissociation Follows Dissociation of RF3 from the Ribosome // *Biochemistry*. 2016. T. 55. № 45. C. 6344–6354.
 208. Shin D. H. et al. Structural analyses of peptide release factor 1 from *Thermotoga maritima* reveal domain flexibility required for its interaction with the ribosome // *J. Mol. Biol.* 2004. T. 341. № 1. C. 227–239.
 209. Sickmann A. et al. The proteome of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2003. T. 100. № 23. C. 13207–13212.
 210. Sidorova J. M., Mikesell G. E., Breeden L. L. Cell cycle-regulated phosphorylation of Swi6 controls its nuclear localization // *Mol. Biol. Cell*. 1995. T. 6. № 12. C. 1641–1658.
 211. Sikorski R. S., Hieter P. A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. // *Genetics*. 1989. T. 122. № 1. C. 19–27.
 212. Simão F. A. et al. BUSCO: assessing genome assembly and annotation completeness with single-copy orthologs // *Bioinformatics*. 2015. T. 31. № 19. C. 3210–3212.
 213. Sokolova E. E. et al. [The Influence of A/G Composition of 3' Stop Codon Contexts on Translation Termination Efficiency in Eukaryotes] // *Mol. Biol. (Mosk.)*. 2020. T. 54. № 5. C. 837–848.
 214. Song H. et al. The Crystal Structure of Human Eukaryotic Release Factor eRF1—Mechanism of Stop Codon Recognition and Peptidyl-tRNA Hydrolysis // *Cell*. 2000. T. 100. № 3. C. 311–321.
 215. Staneva D. et al. Yeast Chromatin Mutants Reveal Altered mtDNA Copy Number and Impaired Mitochondrial Membrane Potential // *J. Fungi*. 2023. T. 9. № 3. C. 329.
 216. Stanke M. et al. AUGUSTUS: a web server for gene finding in eukaryotes //

- Nucleic Acids Res. 2004. T. 32. № Web Server issue. C. W309-312.
217. Stansfield I. et al. The products of the *SUP45* (eRF1) and *SUP35* genes interact to mediate translation termination in *Saccharomyces cerevisiae*. // EMBO J. 1995. T. 14. № 17. C. 4365–4373.
218. Strobe P. K. et al. The 100-genomes strains, an *S. cerevisiae* resource that illuminates its natural phenotypic and genotypic variation and emergence as an opportunistic pathogen // Genome Res. 2015. T. 25. № 5. C. 762–774.
219. Szybalski W. My Road to Øjvind Winge, the Father of Yeast Genetics // Genetics. 2001. T. 158. № 1. C. 1–6.
220. Szymanski E., Vermeulen N., Wong M. Yeast: One cell, one reference sequence, many genomes? // New Genet. Soc. 2019. T. 38. № 4. C. 430–450.
221. Talevich E. et al. CNVkit: Genome-Wide Copy Number Detection and Visualization from Targeted DNA Sequencing // PLOS Comput. Biol. 2016. T. 12. № 4. C. e1004873.
222. Taylor S. D. et al. The conserved Mec1/Rad53 nuclear checkpoint pathway regulates mitochondrial DNA copy number in *Saccharomyces cerevisiae* // Mol. Biol. Cell. 2005. T. 16. № 6. C. 3010–3018.
223. Ter-Avanesyan M. D. et al. Deletion analysis of the *SUP35* gene of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* reveals two non-overlapping functional regions in the encoded protein // Mol. Microbiol. 1993. T. 7. № 5. C. 683–692.
224. Tieg B., Krebber H. Dbp5 — From nuclear export to translation // Biochim. Biophys. Acta BBA - Gene Regul. Mech. 2013. T. 1829. № 8. C. 791–798.
225. Torres E. M., Springer M., Amon A. No current evidence for widespread dosage compensation in *S. cerevisiae* // eLife. 2016. T. 5. C. e10996.
226. Trappl K., Joseph S. Ribosome Induces a Closed to Open Conformational Change in Release Factor 1 // J. Mol. Biol. 2016. T. 428. № 6. C. 1333–1344.
227. Trubitsina N. et al. From past to future: suppressor mutations in yeast genes encoding translation termination factors // Biol. Commun. 2019. T. 64. № 2. C. 89–109.
228. Tsai I. J. The teenage years of yeast population genomics — trace history, admixing and getting wilder // Curr. Opin. Genet. Dev. 2022. T. 75. C. 101942.
229. Tzagoloff A., Dieckmann C. L. PET genes of *Saccharomyces cerevisiae* // Microbiol. Rev. 1990. T. 54. № 3. C. 211–225.
230. Uchida N. et al. A Novel Role of the Mammalian GSPT/eRF3 Associating with

- Poly(A)-binding Protein in Cap/Poly(A)-dependent Translation // *J. Biol. Chem.* 2002. T. 277. № 52. C. 50286–50292.
231. Urakov V. N. et al. Ribosome-bound Pub1 modulates stop codon decoding during translation termination in yeast // *FEBS J.* 2017. T. 284. № 12. C. 1914–1930.
232. Valouev I. A., Kushnirov V. V., Ter-Avanesyan M. D. Yeast polypeptide chain release factors eRF1 and eRF3 are involved in cytoskeleton organization and cell cycle regulation // *Cell Motil. Cytoskeleton.* 2002. T. 52. № 3. C. 161–173.
233. Van der Auwera G. A. et al. From FastQ data to high confidence variant calls: the Genome Analysis Toolkit best practices pipeline // *Curr. Protoc. Bioinforma.* 2013. T. 43. № 1110. C. 11.10.1-11.10.33.
234. Vaser R. et al. Fast and accurate de novo genome assembly from long uncorrected reads // *Genome Res.* 2017. T. 27. № 5. C. 737–746.
235. Veatch J. R. et al. Mitochondrial dysfunction leads to nuclear genome instability via an iron-sulfur cluster defect // *Cell.* 2009. T. 137. № 7. C. 1247–1258.
236. Vinton P. J., Weinert T. A Slowed Cell Cycle Stabilizes the Budding Yeast Genome // *Genetics.* 2017. T. 206. № 2. C. 811–828.
237. Volkov K. V. et al. Novel non-Mendelian determinant involved in the control of translation accuracy in *Saccharomyces cerevisiae* // *Genetics.* 2002. T. 160. № 1. C. 25–36.
238. Wang Q.-M. et al. Surprisingly diverged populations of *Saccharomyces cerevisiae* in natural environments remote from human activity // *Mol. Ecol.* 2012. T. 21. № 22. C. 5404–5417.
239. Wang R., Burton J. L., Solomon M. J. Transcriptional and post-transcriptional regulation of Cdc20 during the spindle assembly checkpoint in *S. cerevisiae* // *Cell. Signal.* 2017. T. 33. C. 41–48.
240. Waterhouse R. M. et al. BUSCO Applications from Quality Assessments to Gene Prediction and Phylogenomics // *Mol. Biol. Evol.* 2018. T. 35. № 3. C. 543–548.
241. Whittaker S. G. et al. The detection of mitotic and meiotic aneuploidy in yeast using a gene dosage selection system // *Mol. Gen. Genet. MGG.* 1988. T. 215. № 1. C. 10–18.
242. Williams R. M. et al. The Ume6 regulon coordinates metabolic and meiotic gene expression in yeast // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2002. T. 99. № 21. C. 13431–13436.
243. Wolfe K. H. Origin of the Yeast Whole-Genome Duplication // *PLOS Biol.* 2015.

- T. 13. № 8. C. e1002221.
244. Wong L. E. et al. Selectivity of stop codon recognition in translation termination is modulated by multiple conformations of GTS loop in eRF1 // *Nucleic Acids Res.* 2012. T. 40. № 12. C. 5751–5765.
245. Xia X. *Bioinformatics and Translation Termination in Bacteria // Bioinformatics and the Cell.* Cham: Springer International Publishing, 2018. C. 239–254.
246. Yue J.-X. et al. Contrasting evolutionary genome dynamics between domesticated and wild yeasts // *Nat. Genet.* 2017. T. 49. № 6. C. 913–924.
247. Zachariae W. et al. Mass spectrometric analysis of the anaphase-promoting complex from yeast: identification of a subunit related to cullins // *Science.* 1998. T. 279. № 5354. C. 1216–1219.
248. Zadorsky S. P. et al. Chromosome VIII disomy influences the nonsense suppression efficiency and transition metal tolerance of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: Chromosome VIII disomy effects in *S. cerevisiae* // *Yeast.* 2015. T. 32. № 6. C. 479–497.
249. Zavialov A. V. et al. Release of Peptide Promoted by the GGQ Motif of Class 1 Release Factors Regulates the GTPase Activity of RF3 // *Mol. Cell.* 2002. T. 10. № 4. C. 789–798.
250. Zavialov A. V., Buckingham R. H., Ehrenberg M. A Posttermination Ribosomal Complex Is the Guanine Nucleotide Exchange Factor for Peptide Release Factor RF3 // *Cell.* 2001. T. 107. № 1. C. 115–124.
251. Zhao Y. et al. Structures of naturally evolved CUP1 tandem arrays in yeast indicate that these arrays are generated by unequal nonhomologous recombination // *G3 Bethesda Md.* 2014. T. 4. № 11. C. 2259–2269.
252. Zhou Q. et al. Cell division cycle 23 is required for mouse oocyte meiotic maturation // *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 2020. T. 34. № 7. C. 8990–9002.
253. Zhouravleva G. et al. Termination of translation in eukaryotes is governed by two interacting polypeptide chain release factors, eRF1 and eRF3. // *EMBO J.* 1995. T. 14. № 16. C. 4065–4072.
254. Zhouravleva G. et al. Evolution of translation termination factor eRF3: Is GSPT2 generated by retrotransposition of GSPT1's mRNA? // *IUBMB Life Int. Union Biochem. Mol. Biol. Life.* 2006. T. 58. № 4. C. 199–202.
255. Zhu Y. O., Sherlock G., Petrov D. A. Whole Genome Analysis of 132 Clinical

Saccharomyces cerevisiae Strains Reveals Extensive Ploidy Variation // G3

GenesGenomesGenetics. 2016. T. 6. № 8. C. 2421–2434.

256. Zubko E. I., Zubko M. K. Deficiencies in mitochondrial DNA compromise the survival of yeast cells at critically high temperatures // Microbiol. Res. 2014. T. 169. № 2–3. C. 185–195.
257. Zyrina A. N. et al. Mitochondrial retrograde signaling inhibits the survival during prolong S/G2 arrest in *Saccharomyces cerevisiae* // Oncotarget. 2015. T. 6. № 42. C. 44084–44094.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор искренне благодарит своего научного руководителя, Москаленко Светлану Евгеньевну, за чуткое и внимательное руководство, предоставленную свободу действий и полезные советы, за конструктивную критику, поддержку и помощь в написании диссертации. Я также бесконечно признательна Журавлевой Галине Анатольевне за неоценимый вклад в планирование работы, плодотворное обсуждение полученных результатов, а также за помощь в работе над текстом.

Хочу также поблагодарить Андрея Георгиевича Матвеевко, Станислава Александровича Бондарева, Трубицину Нину Павловну, Землянко Ольгу Михайловну, Белоусова Михаила Владимировича, Дроздову Полину Борисовну, Леняшину Марию Олеговну, Рогозу Татьяну Михайловну, Предеуса Александра Владимировича и Белявскую Александру Ярославовну за помощь в проведении экспериментов, освоении методов, обсуждении результатов, важные методические советы, и поддержку в ходе всей моей работы. Отдельное большое спасибо моему коллеге и мужу Барбитову Юрию Александровичу за помощь в концептуализации работы, освоении биоинформатических методов, работу над текстом, а также каждодневную моральную поддержку.

Я благодарна всем преподавателям, сотрудникам и студентам кафедры генетики СПбГУ и Института общей генетики им. Н.И.Вавилова за бесценные советы, знания и навыки полученные в ходе работы и обучения.