

САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

Ли Биеонгхюн

**Выпускная квалификационная работа**

**Изучение влияния мутаций в гене *UPF1* на жизнеспособность дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, несущих мутации в генах *SUP35* и *SUP45***

Уровень образования: бакалавриат

Направление 06.03.01 «Биология»

Основная образовательная программа СВ.5017.2020 «Биология»

Работа выполнена на  
кафедре генетики и биотехнологии СПбГУ

Научный руководитель:  
старший преподаватель кафедры генетики и биотехнологии СПбГУ  
к.б.н. Рогоза Татьяна Михайловна

Рецензент:  
ведущий научный сотрудник Федерального государственного бюджетного  
научного учреждения "Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии  
и репродуктологии имени Д.О. Отта"  
к.б.н. Егорова Анна Алексеевна

Санкт-Петербург  
2024

## Оглавление

1. Список использованных сокращений .....	4
2. Введение .....	5
3. Обзор литературы .....	7
3.1. Эукариотические факторы терминации трансляции.....	7
3.2. Эффективность терминации трансляции и влияющие на нее факторы .....	8
3.3. Система деградации нонсенс-содержащих мРНК (NMD).....	9
3.4. Белок Upf1 и его взаимодействие с факторами терминации трансляции .....	13
3.4.1. Структура белка Upf1 .....	13
3.4.2. Взаимодействие Upf1 с факторами терминации трансляции .....	14
4. Материалы и методы .....	18
4.1. Штаммы .....	18
4.2. Плазмиды.....	19
4.3. Праймеры .....	22
4.4. Среды и условия культивирования .....	24
4.4.1. Среды и условия культивирования бактерий.....	24
4.4.2. Среды и условия культивирования дрожжей .....	24
4.5. Генетические и микробиологические методы .....	25
4.5.1. Бактериальная трансформация компетентных клеток .....	25
4.5.2. Трансформация дрожжей .....	25
4.5.3. Дрожжевой двугибридный анализ .....	25
4.6. Методы работы с ДНК .....	26
4.6.1. Выделение плазмидной ДНК.....	26
4.6.2. Рестрикция.....	27
4.6.3. Выделение дрожжевой ДНК.....	27
4.6.4. Очистка дрожжевой ДНК фенолом и хлороформом .....	27
4.6.5. ПЦР и электрофорез ДНК в агарозном геле.....	28
4.6.6. Секвенирование .....	29
4.6.7. Програмное обеспечение .....	29
5. Результаты и обсуждение .....	30
5.1. Оценка жизнеспособности дрожжевых штаммов с нонсенс-мутациями в гене <i>SUP45</i> на фоне делеции гена <i>UPF1</i> по сравнению со штаммом без делеции	30
5.2. Анализ взаимодействия белков Sup35 и Sup45 с различными доменами белка Upf1 .....	32
5.3. Получение плазмид, содержащих точковые мутации гена <i>UPF1</i> , приводящих к аминокислотным заменам продукта гена: C72S, C84S, C125S, K436E, RR793AA .....	36
5.4. Получение штаммов U-1A-D1628-uk.1 и U-14-D1690-uk.3 с мутациями гена <i>UPF1</i> на хромосоме .....	38
5.5. Оценка жизнеспособности штаммов, содержащих точковые мутации по гену <i>UPF1</i> на фоне нонсенс-мутации <i>sup45-105</i> .....	43
6. Обсуждение .....	46
7. Выводы.....	48

8. Список литературы .....	49
9. Благодарности .....	55

## 1. Список использованных сокращений

- ПЦР – полимеразная цепная реакция
- RF – «release factor» - фактор терминации трансляции
- eRF – «eucaryotic RF» - эукариотический фактор терминации трансляции
- sup35(sup45)-m* - («m» от «missense»)- миссенс-мутации в гене *SUP35(SUP45)*
- sup35(sup45)-n* - («n» от «nonsense»)- нонсенс-мутации в гене *SUP35(SUP45)*
- LB – «Lysogeny broth» - среда для выращивания культур бактерий *E. coli*
- YEPD – «yeast extract/peptone/dextrose» – полная среда на основе дрожжевого экстракта
- NMD – «Nonsense-mediated mRNA decay» - Нонсенс-опосредованный распад мРНК
- 3-АТ - 3-амино-1,2,4-триазол
- Ura<sup>+</sup> (Leu<sup>+</sup>) - штаммы, способны синтезировать урацил (лейцин)
- SC -Leu (Ura, Ade, His) – синтетическая среда без лейцина (урацила, аденина, гистидина)
- 5-FOA – «5-Fluoroorotic acid» - 5-Фтороротовая кислота
- SDS – «sodium dodecyl sulfate» - додецилсульфат натрия
- РАВРС – «poly(A) binding protein complex» - комплекс цитоплазматического поли-А-связывающего белка
- РТС – «premature termination codon» - преждевременный стоп-кодон

## 2. Введение

Терминация трансляции является заключительным этапом биосинтеза белка и в этом процессе основную роль у эукариот играют факторы eRF1 и eRF3, которые кодируются у дрожжей генами *SUP45* и *SUP35*. eRF1 распознает стоп-кодон на мРНК, а eRF3, обладая ГТФ-азной активностью, участвует в освобождении полипептидной цепи от тРНК на рибосоме. Взаимодействие между eRF1 и eRF3 играет ключевую роль в эффективной терминации трансляции и последующем рибосомном рециклинге для подготовки к новому раунду синтеза белка (см. Hellen 2018).

Нонсенс-мутация — это тип мутации, при которой в результате изменения одного нуклеотида в гене возникает преждевременный стоп-кодон (PTC - premature termination codon), что приводит к досрочному прекращению синтеза белка во время трансляции. Это приводит к образованию неполноценного, укороченного белка, который может быть токсичен для клетки что может оказать влияние на функционирование организма и привести к различным генетическим заболеваниям человека. Показано, что 11% из всех мутаций, которые вызывают генетические заболевания у человека, являются нонсенс мутациями (Mort *et al.* 2008). Например, нонсенс-мутации могут быть причиной ряда наследственных заболеваний, таких как кистозный фиброз, мускулярная дистрофия и другие (Hirawat *et al.* 2007; Huang *et al.* 2019; Nagel-Wolfrum *et al.* 2016; Welch *et al.* 2007; Liu *et al.* 2020).

Однако существует явление нонсенс-супрессии — при которой преждевременный стоп-кодон в мРНК прочитывается как значащий, что позволяет клетке синтезировать полноразмерный белок, несмотря на нонсенс-мутацию в гене (Jeffrey H. Miller and A. Albertini, 1983). Нонсенс-супрессия возникает за счет нескольких механизмов, одним из которых является наличие мутаций в генах факторов терминации трансляции eRF1 и eRF3. Такие мутации приводят к снижению эффективности терминации трансляции и прочтению стоп-кодона как значащего за счет присутствия в клетке естественных супрессорных тРНК.

С другой стороны, в клетке существует несколько систем контроля качества мРНК, одной из которых является система NMD (nonsense-mediated mRNA decay - Нонсенс-опосредованный распад мРНК) — это механизм, который обеспечивает распад дефектных мРНК, содержащих преждевременные стоп-кодона. В процессе NMD, мРНК с преждевременными стоп-кодонами распознаются и разрушаются, что предотвращает синтез дефектных белков. Этот механизм важен для поддержания качества трансляции и предотвращения накопления дефектных белков в клетке. Существуют разные модели, описывающие механизм этой системы деградации главную роль в этом процессе, играет комплекс белков Upf1-3.

Мутации в гене *UPF1*, которые приводят к нарушению функции продукта этого гена, усиливают нонсенс-супрессию, (Weng *et al.* 1996). Такие мутации, в частности, приводят к заменам в цистеин-гистидин-богатом домене белка Upf1 (CH-домен), который в свою очередь является РНК-связывающим доменом; и в геликазном домене.

В нашей лаборатории получены нонсенс-мутанты по генам *SUP35* и *SUP45* у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Такие мутации приводят к снижению жизнеспособности штамма, однако не являются летальными поскольку в таких

клетках, несмотря на наличие нонсенс-мутации в одном из генов факторов терминации трансляции, присутствует небольшое количество полноразмерного белка Sup35 или Sup45 (т.е. очевидно, происходит нонсенс-супрессия таких мутаций). При этом у многих нонсенс мутантов по гену *SUP45* и *SUP35* наблюдается амплификация гена с нонсенс-мутацией, дисомия района хромосомы, содержащей *sup35-n* или *sup45-n*, что в итоге приводит к повышению частоты транскрипции этого гена. Вероятно, такие изменения являются адаптацией, помогающей клеткам синтезировать небольшое количество полноразмерных белков Sup35 и Sup45 за счет супрессии нонсенс-мутации (Maksiutenko et al., 2021). Однако окончательно механизмы, обеспечивающие жизнеспособность мутантов по генам *sup45-n*, *sup35-n* не ясны.

Ранее в нашей лаборатории было показано, что делеция гена *UPF1* приводит к повышению жизнеспособности нонсенс- и миссенс-мутантов по гену *SUP35* или *SUP45* (Журавлева и Грызина, 2012). Однако, не известен механизм повышения жизнеспособности таких мутантов при нарушении работы системы NMD. В работе Weng с соавторами показано, что делеция любого участка гена *UPF1* приводит к потере функциональности его продукта (Weng et al. 1996). В нашей работе мы использовали мутационный анализ для выявления участков белка Upf1, связанных с жизнеспособностью нонсенс мутантов гена *SUP35* и *SUP45*.

## 3. Обзор литературы

### 3.1. Эукариотические факторы терминации трансляции

Трансляция является этапом реализации генетической информации, в процессе которого происходит биосинтез белка. Трансляция состоит из трех этапов: инициации, элонгации и терминации. Процесс терминации трансляции осуществляется тогда, когда рибосома встречает в мРНК один из стоп-кодонов (нонсенс-кодон, терминирующий кодон) - UAA (ochre), UGA (opal), UAG (amber).

У эукариотического организма, после того как стоп-кодон на мРНК доходит до А сайта рибосомы, происходит связывание eRF1/eRF3-ГТФ комплекса, который состоит из двух факторов терминации трансляции и ГТФ.

- eRF1 (Sup45 у дрожжей) – осуществляет распознавание всех стоп-кодонов (Frolova *et al.* 1994)
- eRF3 (Sup35 у дрожжей) – обладает ГТФ-азной активностью. Он является фактором высвобождения пептида, который связывается с eRF1 и рибосомой для завершения синтеза белка (Frolova *et al.* 1996).

Фактор терминации трансляции eRF1 (Sup45) содержит 3 домена:

- N-концевой домен, который обеспечивает взаимодействие с А-сайтом на малой субъединице рибосомы 40S (Bertram *et al.* 2000) и отвечает за распознавание всех трех стоп-кодонов. Точковые мутации в этом домене изменяют кодоновую специфичность eRF1 *in vivo* (Frolova *et al.* 1994; Bertram *et al.* 2000)
- М домен (средний домен) содержит консервативную последовательность аминокислот (GGQ – глицин-глицин-глутамин). Глутамин у этого триплета участвует в гидролизе пептидной связи и отсоединении полипептидной цепи от Р-сайта рибосомы (Frolova *et al.* 1994; Frolova *et al.* 1999). Кроме того, обнаружено стимулирующее действие GGQ мотива на ГТФазную активность фактора терминации трансляции — eRF3 (Preis *et al.* 2014).
- С-концевой домен, который обеспечивает взаимодействие с другим фактором терминации трансляции eRF3 и белком ABCE1, который необходим для диссоциации рибосомы (Frolova *et al.* 1999; Mantsyzov 2010).

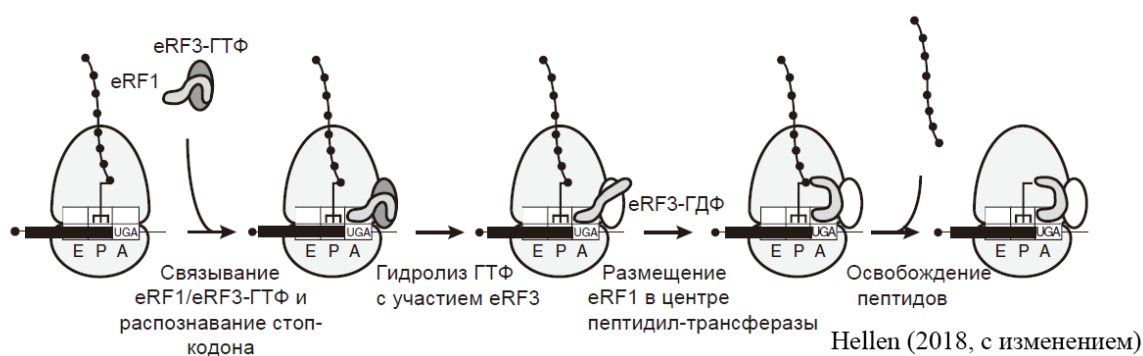
Другой фактор терминации трансляции у дрожжей – eRF3 (Sup35), также подразделяют на три домена:

- N-домен у eRF3 не участвует в терминации трансляции, однако, консервативен у всех эукариот от дрожжей до млекопитающих. Этот домен необходим для связывания PABP (poly A-binding protein - поли А-связывающий белок) с фактором NMD (nonsense-mediated decay - Нонсенс-опосредованный распад мРНК) Upf3b (Hoshino *et al.* 1999; Kozlov, Gehring 2010; Neu-Yilik *et al.* 2017).

У Sup35p N домен богат глицином, тирозином, аспарагином и глутамином (Xu *et al.* 2001) и необходим для формирования, распространения приона [PSI+] *in vivo*. [PSI+] — это амилоид белка Sup35, который является примером приона у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Агрегация белка Sup35 в штамме [PSI+] оставляет мало свободного и функционального Sup35p в клетке, что приводит к нарушению терминации трансляции, что в свою очередь является причиной нонсенс-

супрессии (Liebman *et al.* 2012; Trubitsina *et al.* 2020). N-домен белка Sup35 играет ключевую роль в образовании конденсатов, которые обеспечивают защиту клетки во время стресса. Эти конденсаты, образующие гель, способствуют быстрому восстановлению клетки после стрессовых условий (Franzmann *et al.* 2018)

- М-домен – средний домен, который положительно заряжен и участвует в формировании  $[PSI^+]$  *in vivo*.
- С-концевой домен, который содержит консервативную последовательность GRFTLRD и является основным участком связывания eRF1. В С-концевом домене находится ГТФ-связывающий домен (G домен), где локализованы сайты связывания с ГТФ (Ebihara & Nakamura 1999; Salas-Marco, Bedwell 2004) и 2  $\beta$ -цилиндрических домена, которые гомологичны ГТФ-связывающим доменам бактериального фактора элонгации трансляции EF-Tu, эукариотического фактора элонгации трансляции eEF1A и С-концевой области эукариотического фактора высвобождения рибосомы Hbs1 (Kong, Chunguang *et al.* 2004; Atkinson *et al.* 2008; Van Den Elzen, Antonia *et al.* 2010).



**Рисунок 1. Терминация трансляции эукариот.** Пре-терминирующий комплекс (pre-TC) содержит тРНК в Р-сайте. eRF1/eRF3-ГТФ комплекс прикреплен к А-сайту pre-TC, и eRF1 распознает стоп-кодон, после гидролиза ГТФ, который осуществляет eRF3, происходит высвобождение пептидной цепи. eRF1 и, возможно, eRF3-ГДФ комплекс остаются ассоциированными в пост-трансляционном комплексе (post-TCs) (см. Hellen 2018).

Перед терминацией трансляции образуется комплекс eRF1-eRF3 и ГТФ (Рис. 1) (Alkalaeva *et al.* 2006), с этим комплексом взаимодействует стоп-кодон и начинается терминация трансляции. Происходит изменение конформации рибосомы, у фактора eRF1 последовательность GGQ оказывается в Р-сайте рибосомы. Это связывание сопровождается гидролизом ГТФ и после этого уходит фактор eRF3 с ГДФ. Далее присоединяется белок ABCE1/Rli1, освобождается полипептидная цепь, происходит гидролиз АТФ и идет рециклинг рибосомы.

### 3.2. Эффективность терминации трансляции и влияющие на нее факторы

Нонсенс-мутация — это тип мутации, при которой нормальный кодон, обычно кодирующий аминокислоту, заменяется преждевременным стоп-кодоном. Это приводит к преждевременной остановке синтеза белка во время трансляции, что может привести к образованию неполноценного или недействующего белка.



Точность терминации трансляции не абсолютна. Существует тип ошибок, когда РТС в рамке считывания прочитывается как значащий. Это приводит к явлению нонсенс-супрессии, которая является естественным механизмом нейтрализации последствий нонсенс-мутации, и осуществляется за счет присутствия естественных слабых супрессорных тРНК или тРНК, содержащих мутации в антикодоне (Inge-Vechtomov *et al.* 1994). Выявлено, что 11% из всех мутаций, которые вызывают генетические заболевания у человека, является нонсенс мутациями (Mort *et al.* 2008).

Супрессорная тРНК — это специальный тип транспортной РНК, который способен распознавать стоп-кодона (триплеты, указывающие на завершение синтеза белка) и вместо завершения синтеза белка вставлять аминокислоту, продолжая трансляцию. Супрессорные тРНК могут подавлять терминацию трансляции на стоп-кодонах, что приводит к продолжению синтеза белка (Hatfield *et al.* 1985; Drugeon *et al.* 1996). Существует конкуренция между супрессорной тРНК и фактором терминации трансляции (например, eRF1) в процессе трансляции при наличии супрессорной мутации, которая позволяет супрессорной тРНК распознавать стоп-кодона и продолжать синтез белка за ними.

Специфические нуклеотидные последовательности, окружающие стоп-кодона в молекуле мРНК, могут оказывать различное влияние на процесс трансляции (Tate & Mannering 1996; Moskalenko *et al.* 2003; Trubitsina *et al.* 2019). Контекст окружающих нуклеотидов, как перед, так и после стоп-кодона, может влиять на эффективность завершения синтеза белка. Например, исследования показали, что изменение 3' (+4) нуклеотида амберного (UAG) нонсенс-кодона приводит к увеличению эффективности трансляции с помощью супрессорной тРНК (Tate & Mannering, 1996).

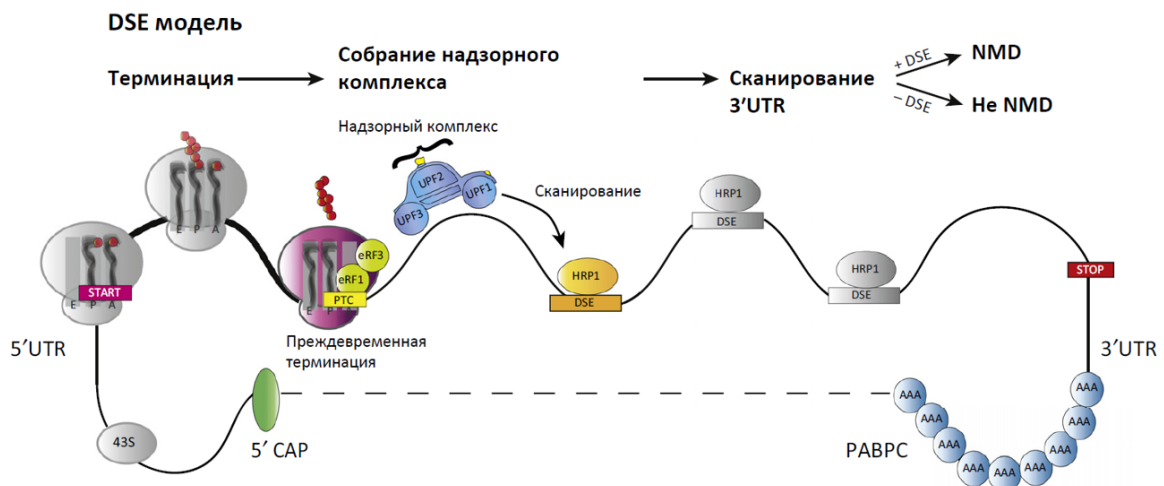
Существует связь между эффективностью терминации трансляции и продолжительностью жизни дефектной цитоплазматической мРНК (Daag & Maquat, 1988). Отдельная молекула мРНК в цитоплазме может проходить много раундов трансляции, однако рано или поздно будет подвержена деградации. Дефектные цитоплазматические мРНК могут содержать преждевременный стоп-кодон или не иметь терминирующего кодона, или содержать последовательности, влекущие остановку синтеза белка. Перечисленные aberrации запускают ускоренный распад мРНК, который у эукариот осуществляют три системы контроля качества: NGD (No-Go Decay), NSD (Non-Stop Decay), NMD (Nonsense Mediated Decay).

### **3.3. Система деградации нонсенс-содержащих мРНК (NMD)**

NMD (Nonsense Mediated Decay - Нонсенс-опосредованный распад мРНК, или деградации нонсенс-содержащих мРНК) является путем деградации мРНК, у которой есть преждевременный стоп-кодон (РТС) в открытой рамке считывания. Главную роль в NMD играет комплекс белков Upf1-3. Распознавание преждевременного стоп-кодона происходит в первом раунде трансляции мРНК в цитоплазме, сразу после экспорта из ядра, когда мРНК связана с рядом специфичных белков. Одна из предложенных моделей NMD – DSE модель. Эта модель предложена для дрожжевых клеток, поскольку в генах дрожжей редко встречаются интроны. Согласно этой модели, существуют одна или больше последовательностей DSE (downstream sequence elements), которые находятся в открытой рамке считывания существенно чаще, чем в

3'-некодирующей области (Czaplinski *et al.* 1998; Wang *et al.* 2001). Модель полагает, что комплекс NMD, в состав которого входят белки Upf1, Upf2 и Upf3, собирается, когда рибосома встречает стоп-кодон и факторы терминации трансляции взаимодействуют с Upf1, который потом привлекает Upf2 и Upf3.

Важным участником NMD является HRP1, который является РНК-связывающим белком, взаимодействует специфично с DSE *in vitro* и Upf1 у дрожжей *S. cerevisiae* (González *et al.* 2000). Он также участвует в процессинге 3'-конца пре-мРНК, в терминации транскрипции и является переносчиком мРНК между ядром и цитоплазмой. DSE модель предлагает, что Hrp1 присоединяется к DSE еще в ядре, и остается связанным с DSE после экспорта мРНК. Взаимодействие Upf1 с HRP1, связанным с DSE означает, что стоп-кодон был преждевременным и запускается деградация мРНК (рис 2). Несмотря на то, что DSE модель считают устаревшей после того как стало известно, что отсутствует сходство между DSE последовательностями в разных мРНК (Ruiz-Echevarría *et al.* 1998), концепция того, что NMD-вызывающие РТС отличаются от нормальных стоп-кодонов маркером или сигналом в кодирующей части мРНК, стала основой для моделей NMD, таким маркером у клеток млекопитающих может служить наличие EJC (комплекса белков, остающихся на экзон-экзонной границе мРНК после сплайсинга).

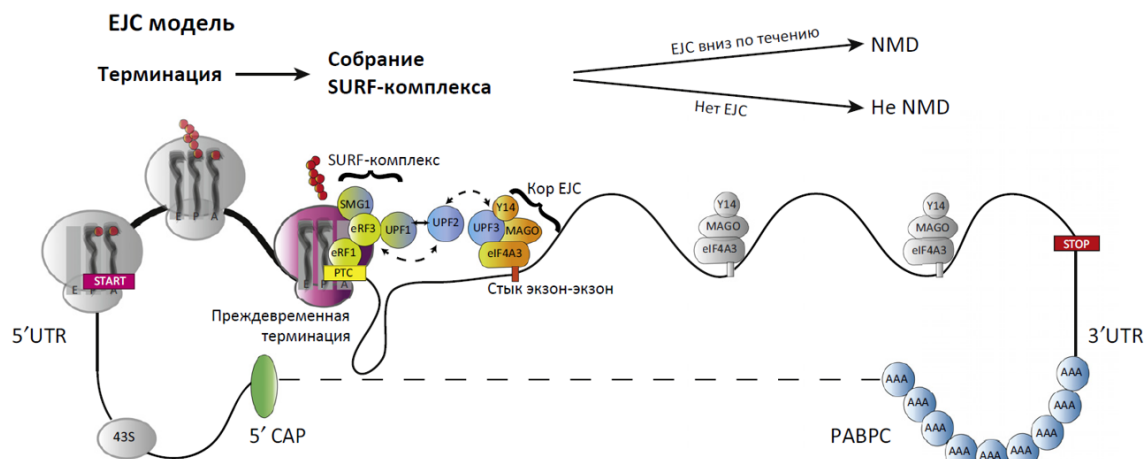


Brogna *et al.* (2016, с изменением)

**Рисунок 2. Схематическая иллюстрация DSE модели NMD.** РНК-связывающий белок HRP1 одновременно связывается с консервативной последовательностью DSE и белком NMD комплекса Upf1. Upf1 с другими белками Upf2 и Upf3 образуют NMD комплекс, или надзорный комплекс (surveillance complex), который после трансляции и выхода пептидной цепи начинает сканировать 3'-участок мРНК. Если комплекс встречает DSE, взаимодействие Upf1 и HRP1, связанного с DSE, приводит к тому, что стоп-кодон распознается как преждевременный (РТС) и это вызывает ускоренную деградацию мРНК. (Brogna *et al.* 2016). Образование комплекса факторов терминации трансляции eRF1/3 с белками NMD стимулирует/активирует белок Upf1, который входит в состав комплекса белков NMD. И Upf1 уже стимулирует как активность деаденилазы Pan2p (Wolf, 2008) с 3'-конца, так и декэпирование с 5'-конца.

Другая модель механизма NMD – EJC (Exon Junction complex, комплекс экзонального стыка или комплекс экзон-экзон) (рис. 3) также полагает, что РТС отличается от нормальных стоп-кодонов присутствием сигнала в кодирующей части мРНК, которым является по этой модели – сплайсинговый стык (splice junction) – консенсусная последовательность на границе экзона и интрона, участвующая в сплайсинге пре-РНК экзоны эукариот, разделенных интронами. EJC – мультипротеиновый комплекс, также располагается на мРНК вовремя сплайсинга в ядре, и остается связанным с экзон-экзонной границей при экспорте мРНК в цитоплазму (Le Hir *et al.* 2001; Le Hir *et al.* 2000). Чтобы сформировать EJC, три коровых белка eIF4A3, Y14 и MAGO взаимодействуют с дополнительными белками, включая Upf2 и Upf3 (Gehring *et al.* 2003; Chamieh *et al.* 2008). В настоящее время полагают, что SMG1, который является киназой Upf1, и Upf1 собираются на всех рибосомах в процессе терминации трансляции, где они образуют комплекс с эукариотическими факторами терминации трансляции. Этот комплекс называют SURF (Kashima *et al.* 2006). По EJC модели, когда терминация трансляции происходит в РТС, то SURF комплекс, который содержит SMG1, Upf1, eRF1 и eRF3, собирается и взаимодействует с EJC в кодирующей части мРНК и распознает, что терминация является преждевременной и вызывает деградацию мРНК.

Поскольку *in vitro* коровые белки EJC связываются с Upf3, было предложено, что Upf2 за счет взаимодействия с Upf1 и Upf3 образует физический мост между комплексом SURF и EJC. Хотя модель EJC дает логическое объяснение, как сплайсинг влияет на NMD не только у клеток млекопитающих, но и у других организмов (Kerényi *et al.* 2008; Zhang & Sachs, 2015; Wittkopp *et al.* 2009), существуют явления, которые EJC модель не может объяснить (Brognna & Wen 2009). Например, возможна активация Upf1 за счет взаимодействия Upf2 с SURF, независимо от Upf3 и EJC в клетках человека (Lopez-Perrote *et al.* 2016), что противоречит классической модели SURF-EJC (Kashima *et al.* 2006). Кроме того, у *Schizosaccharomyces pombe* интрон усиливает NMD независимо от того, размещен ли он до или после РТС и что белки, составляющие основу EJC, не требуются для такого сплайсинг-зависимого NMD. Такое явление также не соответствует предсказаниям EJC модели (Wen and Brognna 2010).



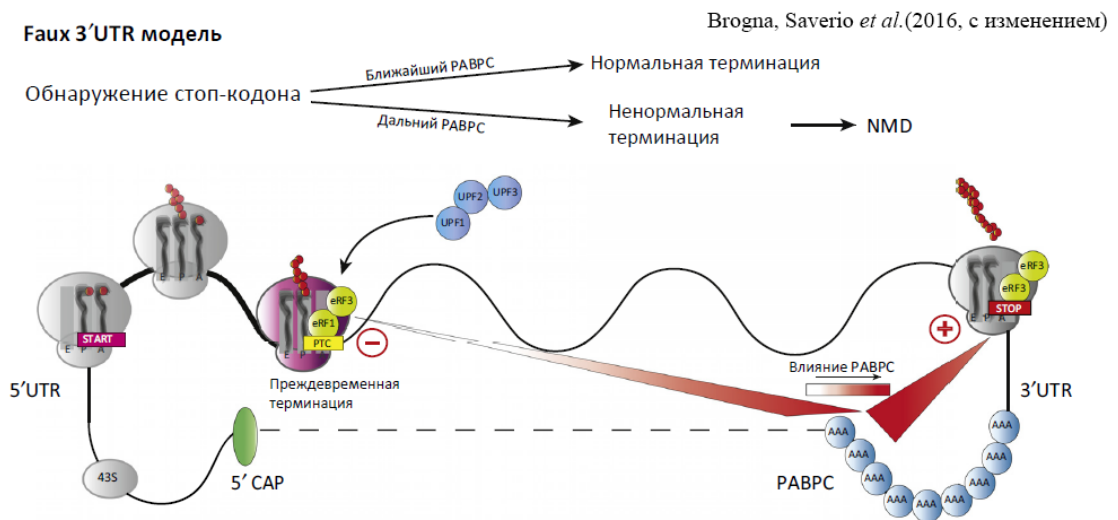
Brogna *et al.* (2016, с изменением)

**Рисунок 3. Схематическая иллюстрация EJC модели NMD.** Согласно модели комплекса экзонного стыка (EJC), после терминации формируется комплекс SURF, состоящий из SMG1, UPF1, eRF1 и eRF3. Ассоциация SURF с EJC, который располагается вниз по течению (downstream) определяет, что терминация является преждевременной и вызывает распад мРНК.

В настоящее время общепринятая модель NMD основана на идее, что терминация трансляции на РТС биохимически отличается от терминации на обычном стоп-кодоне, поскольку это происходит далеко от нормального 3'-конца мРНК или 3'UTR – (3'-нетранслируемая область), который находится на 3'-конце мРНК (Hilleren, Parker, 1999). Для дрожжей *S. cerevisiae* предложена модель Faux 3'UTR (рис. 4) (Amrani *et al.* 2004).

Комплекс цитоплазматического поли-А-связывающего белка (PABPC, poly(A) binding protein complex), который связывается с поли-А последовательностью мРНК, взаимодействует также с фактором терминации трансляции eRF3, связанным с терминирующей рибосомой (Hoshino *et al.* 1999; Cosson *et al.* 2002).

Взаимодействие PABPC с eRF3 стимулирует терминацию трансляции (Cosson *et al.* 2002), а при отсутствии взаимодействия с PABPC, задерживается либо терминация, либо высвобождение рибосомы от мРНК, что приводит к сборке и активации компонентов NMD комплекса, например, Upf1, в результате запускается деградация мРНК (Amrani *et al.* 2004). Известно, что Upf1 взаимодействует с eRF1 и eRF3 (He & Jacobson 2015; Журавлева и др., 2022), что хорошо согласуется с этой моделью (Wang *et al.* 2001; Maderazo *et al.* 2000; Ivanov *et al.* 2008).



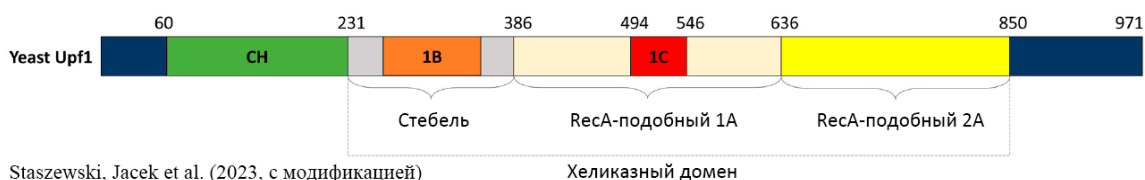
**Рисунок 4. Фаух 3'UTR модель NMD.** Аномальная терминация трансляции возникает в PTC. Когда терминирующая рибосома находится проксимально от белка PABPC, то терминация трансляции с участием eRF3, завершается нормально. Когда терминирующая рибосома находится дистально от белка PABPC, терминация трансляции с участием eRF3 завершается аномально, что приводит к активации механизма NMD. Преждевременная терминация трансляции распознается по низкому уровню взаимодействия с PABPC (красный градиент показывает этот уровень), в результате чего собирается комплекс NMD. Пунктиром представлено предполагаемое взаимодействие 5'-кэпа с PABPC, которое, полагают, обеспечивает конформацию закрытой петли в мРНК.

### 3.4. Белок Upf1 и его взаимодействие с факторами терминации трансляции

#### 3.4.1. Структура белка Upf1

Белок Upf1 (Up-frameshift protein 1) играет важную роль в цитоплазматическом контроле качества транскриптов, поскольку белки, синтезированные с мРНК с PTC, могут оказаться не просто нефункциональными, но и токсичными для клетки. Upf1 специфически разрушает продукты, содержащие преждевременный стоп кодон (PTC), в рамках механизма деградации мРНК, известного как NMD. Кроме того, Upf1 может действовать как E3 лигаза и разрушать целевые белки независимо от путей деградации мРНК, защищая клетки от накопления неправильно свернутых полипептидов (Staszewski *et al.* 2023).

Дрожжевой белок Upf1, также известный как Nam7 (Nuclear Accommodation of Mitochondria - ядерная аккомодация митохондрий), представляет собой белок массой 109 кДа (Leeds *et al.* 1992.). Домены белка Upf1 включают ResA-подобный домен 1A, ResA-подобный домен 2A, цистидин- и гистидин-богатый домен (CH-домен) и регуляторные субдомены 1B и 1C. Геликазный домен дрожжевого белка Upf1 состоит из  $\alpha$ -спирального стебля и двух ResA-подобных  $\alpha/\beta$  доменов, обозначенных как 1A и 2A, с двумя вставленными субдоменами 1B и 1C (рис. 5). Домен 1A формирует десять  $\alpha$ -спиралей, в то время как домен 2A образует  $\beta$ -лист, окруженный шестью  $\alpha$ -спиральями (Staszewski *et al.* 2023).



**Рисунок 5. Структура домена дрожжевого белка Upf1.** Цистеин- и гистидин-богатый домен (СН) отмечен зеленым цветом. Геликазный домен связан пунктирной линией, содержащей область стебля в сером цвете, РесА-подобный 1А в пшеничном цвете, РесА-подобный 2А в желтом цвете, а субдомены 1В и 1С в оранжевом и красном цветах соответственно.

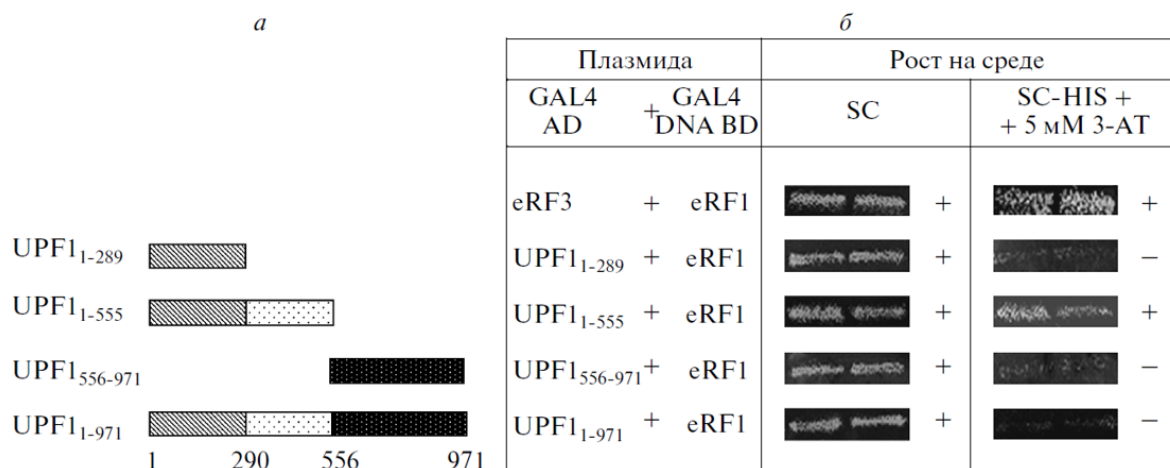
В литературе описан ряд мутаций, приводящих к аминокислотным заменам в разных доменах и влияющих на функцию Upf1. Мутации С72S, С84S, С125S и RR793AA в белке Upf1 были изучены в контексте их влияния на различные свойства белка и способность к исцелению [PSI+] приона в работе (Son and Wickner. 2018). Исследование показывает, что мутации С72S, С125S и RR793AA в белке Upf1 имеют положительное влияние на подавление нонсенс-супрессии. Эти мутации связаны с механизмом нонсенс-опосредованного распада мРНК (NMD), влияя на различные функциональные характеристики белка Upf1p, такие как способность подавления нонсенс-супрессии, активность геликазы, активность АТРаза, связывание с РНК и другие взаимодействия, которые могут влиять на эффективность NMD.

Мутация К436Е приводит к нарушению функций Upf1 и функционирование NMD и подавляет нонсенс-супрессию (Weng, Y *et al.* 1996).

Мутация D4 (R779C) затрагивает геликазный домен и РесА-подобный домен 2А нарушает функционирование NMD (Leeds *et al.* 1992.).

### 3.4.2. Взаимодействие Upf1 с факторами терминации трансляции

Ранее было показано, что факторы терминации трансляции взаимодействуют с Upf1 (Wang *et al.*, 2001). Также известно, что аминокислотная замена К436А в Upf1 нарушает взаимодействие Upf1 с Sup45, и предложено, что N-концевая область Upf1 взаимодействует с Sup45 (Журавлева & Грызина. 2012; Czaplinski *et al.* 1998). Аминокислотная замена в положении 779 (R779C, замена аргинина на цистеин, обозначается как D4), которая затрагивает геликазный домен и РесА-подобный домен 2А нарушает функционирование NMD (Leeds *et al.* 1992.). В нашей лаборатории с помощью двугибридной дрожжевой системы было показано, что участок 1–555 белка Upf1 взаимодействует с eRF1, но очень слабое, при этом взаимодействия с полноразмерным eRF1 выявлено не было (Журавлева & Грызина. 2012).



(Журавлева и Грызина, 2012)

**Рисунок 6. Двугибридный анализ, показывающий физическое взаимодействие фрагментов белка *Urp1* с *eRF1*.** *a* – схема расположения фрагментов *Urp1*. *б* – оценка взаимодействия по жизнеспособности трансформантов в присутствии 3-АТ. Плазмиды, кодирующие *eRF1*, слитый с ДНК-связывающим доменом белка *Gal4* (*GAL4 DNA BD*). Также использовали плазмиды, кодирующие белки *eRF3* или *Urp1*, слитые с активирующим доменом *Gal4* (*GAL4 AD*).

Проведенный в нашей лаборатории анализ с помощью двугибридной дрожжевой системы, позволяющей выявить взаимодействие между белками, показал слабое взаимодействие N-концевой части *Urp1* (аминокислотная область – 1 - 555) с *eRF1* (рис. 6). В нашей работе, используя эту систему мы повторно проверили взаимодействие различных фрагментов белка *Urp1* с белком *eRF1*, добавив в анализ белок *eRF3*.

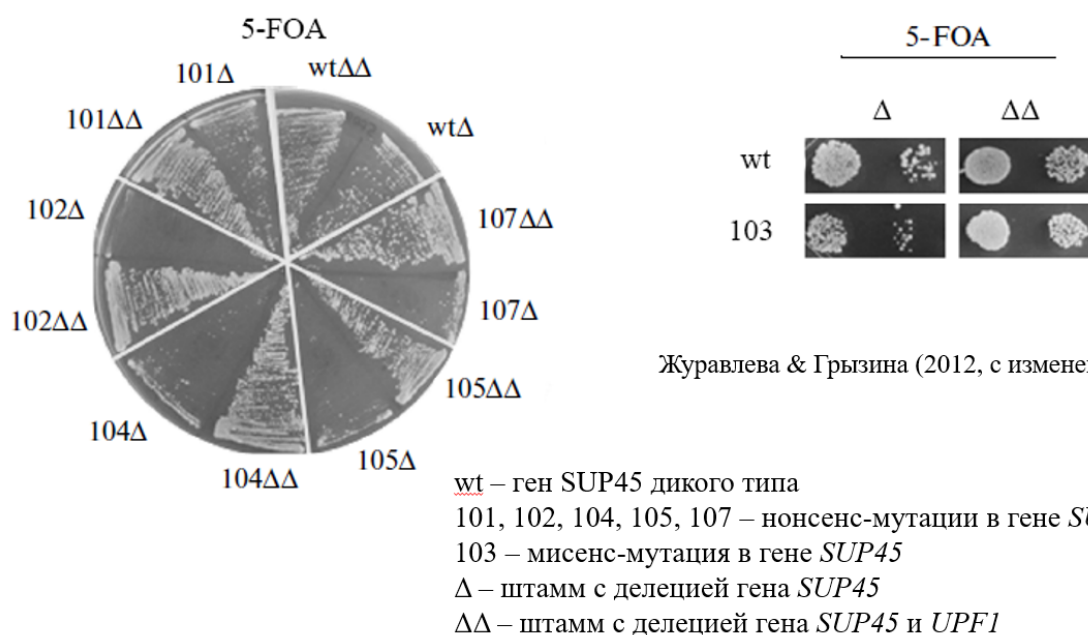
В работе Weng с соавторами показано, что делеция любого участка гена *UPF1* приводит к потере функциональности его продукта (Weng *et al.* 1996). В нашей работе мы использовали мутационный анализ для выявления участков белка *Urp1*, связанных с жизнеспособностью нонсенс мутантов гена *SUP35* и *SUP45*. Повышение жизнеспособности штаммов с мутациями по гену *SUP35* и *SUP45* на фоне точечной мутации в гене *UPF1* будет свидетельствовать об участии участка, затронутого мутацией, в изучаемом процессе.

Нонсенс-мутации в генах *SUP35* и *SUP45* приводят к синтезу укороченного, нефункционального белка, однако такие мутанты жизнеспособны (хотя их жизнеспособность существенно снижена), поскольку небольшая часть полноразмерного белка в клетках синтезируется за счет нонсенс-супрессии. (Moskalenko *et al.* 2003). При шаффлинге плазмиды, несущей аллель гена *SUP35* и *SUP45*, на плазмиду с нонсенс-мутацией этого гена, наблюдается снижение жизнеспособности у мутантов по гену *SUP35* и *SUP45*. Стоит отметить, что при этом у этих мутантов наблюдается амплификация одного из генов факторов терминации трансляции. Механизмами такой амплификации служат высокая копияность плазмид, несущих аллель гена *sup35-n* и *sup45-n*. Исследование показало, что у нонсенс-мутантов *sup45-n* и *sup35-n* было обнаружено увеличение числа копий центромерной плазмиды. Оценка числа копий показала, что у *sup35-n* количество копий плазмиды



составляло от 4,3 до 11,7, а у *sup45-n* - от 1,8 до 7,8, что превышает норму в несколько копий. Кроме того, у некоторых мутантов была обнаружена дисомия целой хромосомы II, а для одной нонсенс-мутации *sup35-218* наблюдалось локальное удвоение сегмента хромосомы IV, содержащего ген *SUP35*. Полагают, что таким образом осуществляется механизм адаптации у дрожжей к нонсенс-мутации гена факторов терминации трансляции (Moskalenko *et al.* 2003; Maksiukenko *et al.* 2021).

Делеция гена *upf1* приводит к улучшению жизнеспособности нонсенс- и мисенс-мутантов по гену *sup35* и *sup45*. На настоящий момент описано наиболее сильное увеличение жизнеспособности при делеции *upf1* у нонсенс- и мисенс-мутантов *sup45*, таких как: 101, 102, 103, 105 (рис. 7) (информация о мутации *SUP45* см. таблица 3). (Журавлева & Грызина 2012; Chabelskaya *et al.* 2007).



**Рисунок 7. Повышение жизнеспособности нонсенс- и мисенс мутантов *sup45-n* на фоне делеции по гену *UPF1*.** Исходный штамм содержит либо дизрупцию гена *SUP45* и плазмиду с *SUP45* дикого типа, либо дизрупцию гена *SUP45*, компенсаторную плазмиду и делецию гена *UPF1*. На рисунке представлена эффективность шаффлинга плазмиды, содержащей *SUP45* на плазмиду, содержащую *sup45-n* с мутацией на среде с 5-FOA («5-Fluoroorotic acid» - 5-фтороротовая кислота).

Возможных механизмов улучшения жизнеспособности можно предложить два:

Если NMD функционирует, то большая часть мРНК *SUP35* и *SUP45* с РТС подвергается деградации, нонсенс-супрессия обеспечивает синтез небольшого количества полноразмерного Sup35 и Sup45, которого не хватает для корректной терминации трансляции и усиливается супрессия. Вместе с ней синтезируется больше полноразмерного Sup35 и Sup45, эффективность терминации повышается, но до определенного уровня, поскольку это снижает супрессию и синтез полноразмерного Sup35 и Sup45, таким образом, существует петля обратной связи и жизнеспособность мутантов по генам *SUP35* и *SUP45* снижена. Баланс нарушается при нарушении работы системы NMD. В этом случае в цитоплазме идет накопление мРНК *SUP35* и *SUP45* с РТС, и вероятность супрессии РТС может увеличиваться, что приводит к



продукции большего количества полноразмерного белка Sup35 и Sup45, увеличение количества функционирующих комплексов Sup35 и Sup45 приводит к повышению жизнеспособности.

Другой предлагаемый механизм улучшения – отсутствие взаимодействия белка Upf1 с факторами терминации трансляции Sup35 и Sup45, возможно, Upf1 образует комплексы со свободными факторами терминации трансляции в цитоплазме, что мешает их участию в терминации, таким образом, отсутствие основного компонента NMD может увеличивать число свободных комплексов факторов терминации трансляции в цитоплазме, что в свою очередь может усиливать жизнеспособность.

В литературе описан ряд мутаций в гене *UPF1*, влияющих на взаимодействие его продукта с факторами терминации трансляции, на супрессию, на поддержание различных вариантов [*PSI+*]. В частности, показано, что в дрожжевой клетке при нормальном уровне продукции компонентов NMD для контроля качества мРНК - Upf1, Upf2 и Upf3, распространение новых вариантов прионов [*PSI+*] блокируется. Кроме того, мутации в генах *UPF1* и *UPF3* улучшают продукцию белка с нонсенс-мутантной аллели, например *ura3-14*, за счет более длительного существования мРНК гена (нет системы NMD) и снижения эффективности терминации (Son and Wickner. 2018).

Таким образом, можно сказать, что в настоящее время остается много вопросов о взаимодействии Upf1 с факторами терминации, не изучен механизм влияния делеции гена *UPF1* на повышение жизнеспособности мутантов *sup35-n* и *sup45-n*. В связи с этим поиск домена белка Upf1, который теснее всего связан с жизнеспособностью этих мутантов, представляет большую ценность и может помочь понять возможные механизмы NMD при мутации гена одного из факторов терминации трансляции. В связи с чем целью нашей работы является изучением влияния точковых мутаций гена *UPF1*, приводящих к аминокислотной замене белка продукта этого гена, на жизнеспособность штаммов дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, содержащих нонсенс-мутации *sup35-n* и *sup45-n*.

**Цель работы:** изучить влияние точковых мутаций в гене *UPF1* на жизнеспособность штаммов дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, содержащих нонсенс-мутации в гене *SUP45* и *SUP35*.

**Задачи:**

1. Оценить жизнеспособность дрожжевых штаммов с нонсенс-мутациями в гене *SUP45* на фоне делеции гена *UPF1* по сравнению со штаммом без делеции.
2. С помощью двугибридной дрожжевой системы провести анализ взаимодействия белков Sup35 и Sup45 с фрагментами белка Upf1.
3. Получить штаммы, содержащие точковые мутации хромосомной копии гена *UPF1*, приводящие к аминокислотным заменам: C72S, C84S, C125S, K436E, RR793AA.
4. Проверить, как полученные точковые мутации гена *UPF1* на хромосоме влияют на жизнеспособность дрожжевых штаммов с нонсенс-мутацией по гену *SUP35* и *SUP45*.

## 4. Материалы и методы

### 4.1. Штаммы

В таблице 1 представлены дрожжевые и бактериальные штаммы, которые использованы в работе.

**Таблица 1. Генотип штаммов, использованных в работе.**

Штамм	Генотип	Организм	Источник
Y2HGOLD	<i>MATa trp1-901 leu2-3,112 ura3-52 his3-200 gal4 Δ gal80 Δ LYS2;; GAL1<sub>UAS</sub>-Gal1<sub>TATA</sub>-His3, GAL2<sub>UAS</sub>-GAL2<sub>TATA</sub>-ADE2 URA3;; MEL1<sub>UAS</sub>-MEL1<sub>TATA</sub> AUR1-C MEL1</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Clontech
PJ69-4A	<i>MATa trp1-901 leu2-3,112 ura3-52 his3-200 gal14Δ gal180Δ LYS2::GAL1-HIS3 GAL2-ADE2 met2::GAL7-lacZ</i>		James <i>et al.</i> 1996
U-1A-D1628-uk.1 (сокращенно 1A Δ <i>upf1.1</i> )	<i>MATa ade1-14 trp1-289 his3-Δ200 lys2 ura3-52 leu2-3,112 sup45::HIS3MX UPF1::kanMX [pRS316-Sup45]</i>		Матвеевко и др., 2024
U-1A-D1628-uk.1 (сокращенно 1A Δ <i>upf1.3</i> )	<i>MATa ade1-14 trp1-289 his3-Δ200 lys2 ura3-52 leu2-3,112 sup45::HIS3MX UPF1::kanMX [pRS316-Sup45]</i>		Матвеевко и др., 2024
U-14-D1690-uk.3 (сокращенно U-14 Δ <i>upf1</i> )	<i>MATa ade1-14 trp1-289 his3-Δ200 lys2 ura3-52 leu2-3,112 sup35::HIS3MX UPF1::kanMX [pRSU2]</i>		Матвеевко и др., 2024
U-1A-Д1628 (сокращенно 1A)	<i>MATa ade1-14 trp1-289 his3 lys2 ura3-52 leu2-3,112 SUP45::HIS3MX [pRS316-Sup45]</i>		Moskalenko <i>et al.</i> 2003
U-14-D1690 (сокращенно U-14)	<i>MATa ade1-14 trp1-289 his3-Δ200 lys2 ura3-52 leu2-3,112 sup35::HIS3MX [pRSU2]</i>		Матвеевко и др., 2024
DH5α	<i>supE44 ΔlacU169 (φ80 lacZAM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>		<i>E.coli</i>

Дрожжевой штамм 1A Δ*upf1.3* и 1A Δ*upf1.1* получены независимо. Генотипически они не отличаются.

## 4.2. Плазмиды

Взаимодействие фрагментов белка Urf1 и одного из факторов терминации трансляции оценивали в двугибридной дрожжевой системе, используя плазмиды pGBT9, pGADGH и ряд плазмид с различными фрагментами гена *UPF1*: рHF 1668, рHF 1161, рHF 1169, рHF 1165, рHF 1011 (He F *et al.* 1997) (рис. 8, 9). В таблице 2 указаны номера аминокислот фрагментов белка Urf1, продуцирующихся с этих плазмид.

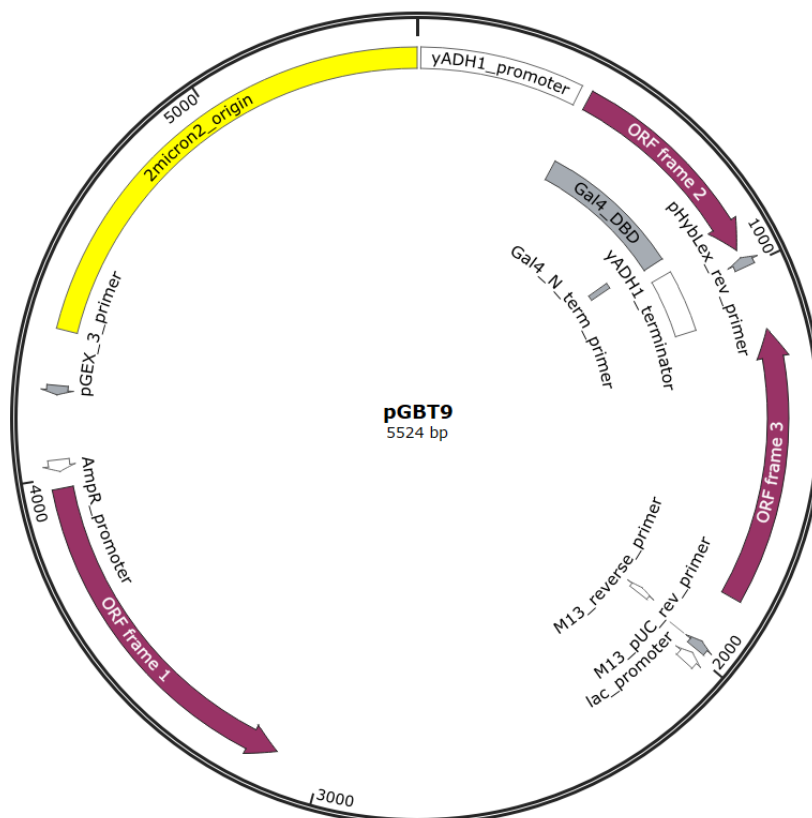


Рисунок 8. Физическая карта плазмиды pGBT9.

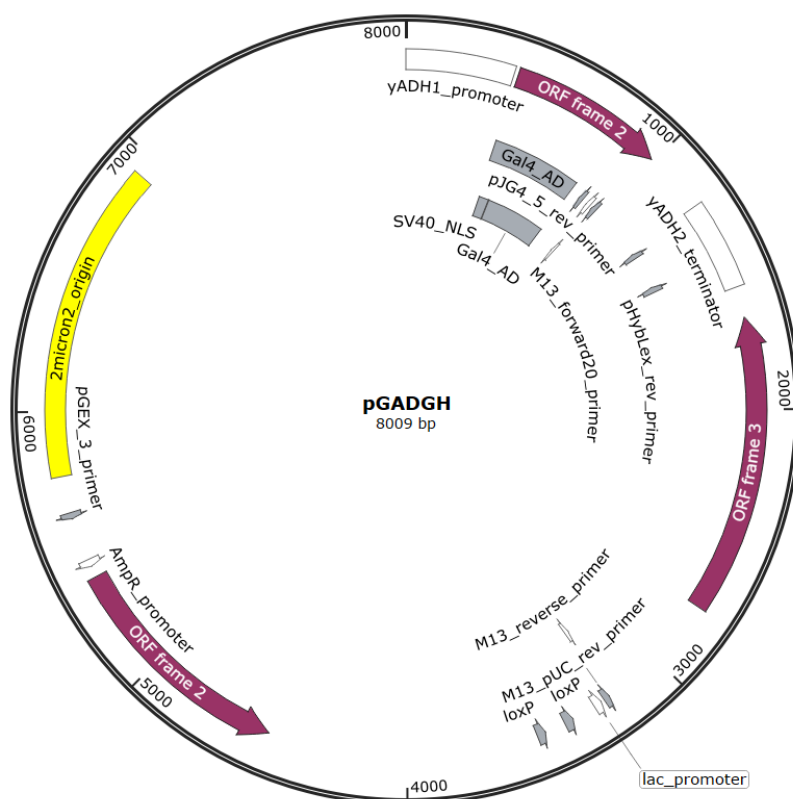


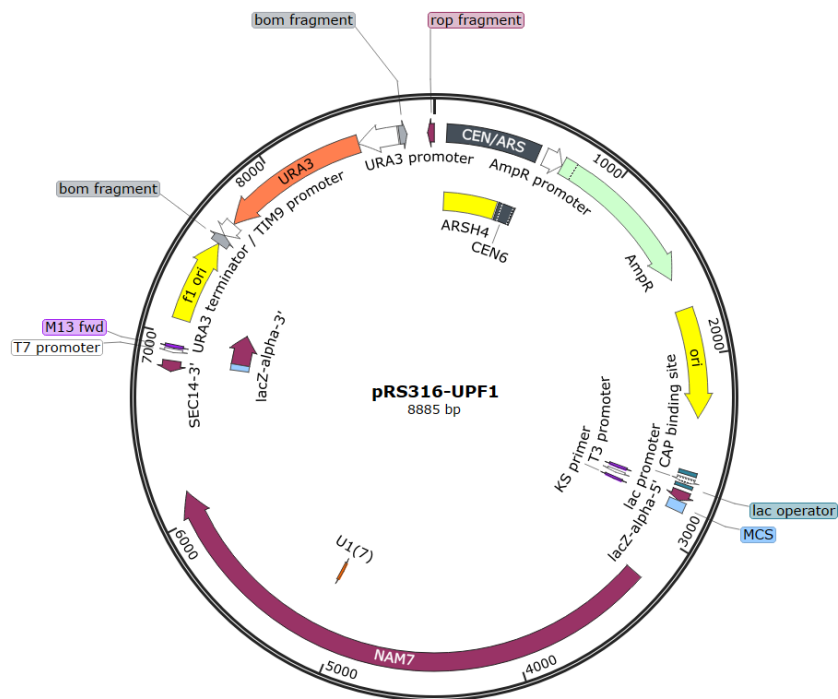
Рисунок 9. Физическая карта плазмиды pGADGH.

Таблица 2. Плазмиды с разными участками гена белка Upf1, которые были использованы в двугибридном анализе.

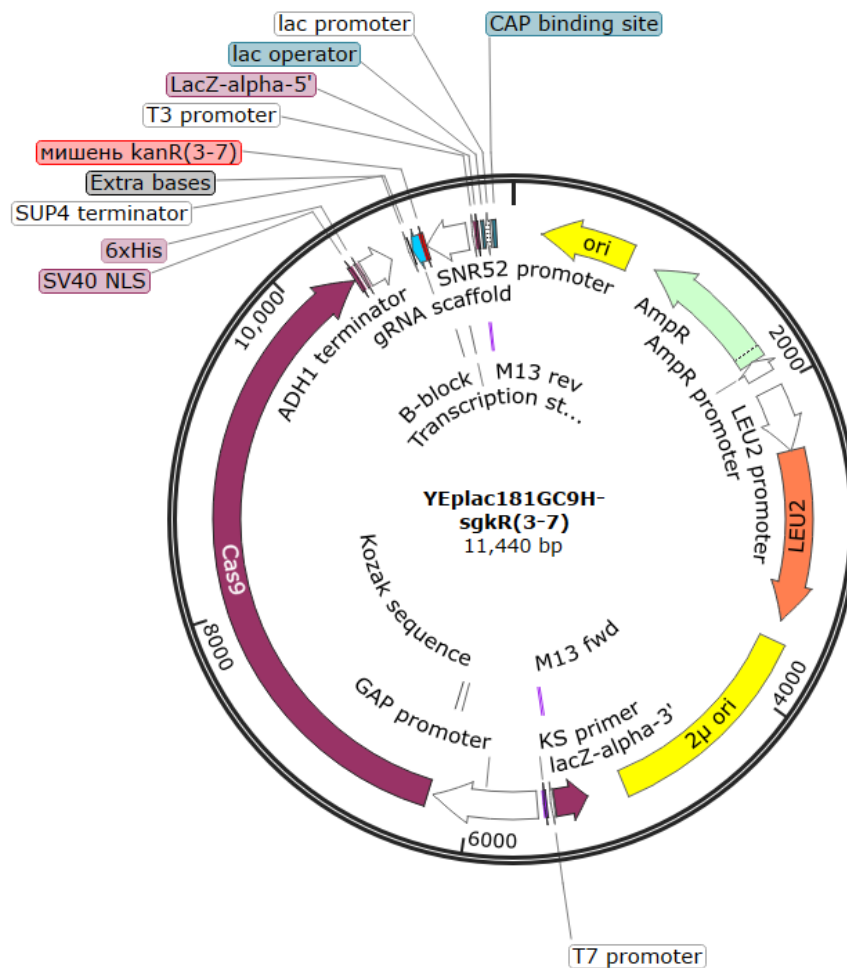
	Аминокислотный фрагмент Upf1	Источник
pHF 1011	1 – 289	He <i>et al.</i> 1997
pHF 1161	1 – 555	
pHF 1165	289 – 971	
pHF 1169	556 – 971	
pHF 1668	1 – 971 (полноразмерный)	

В качестве основы для конструирования серии плазмид, несущих ген *UPF1* с различными точковыми мутациями, с помощью сайт-направленного мутагенеза, была использована плаزمида pRS316-*UPF1* (рис. 10). Кроме того, была использована плазмида pRS316 *upf1-D4* (приводит к аминокислотной замене R779C в белке Upf1, Leeds, P *et al.* 1992).

Для получения мутаций в гене *UPF1* на хромосоме была использована плазмиды для редактирования генома системой CRISPR-Cas YEplac181GC9H-sgkR(3-7), полученная на основе плазмиды YEplac181GC9H-sgS35(-25)B, путем замещения мишени (таргета) в последовательности гидовой РНК S35(-25)B на *KanR(3-7)*. Новая последовательность мишени была подобрана для гена устойчивости к антибиотику канамицину *KanMX* (Матвеевко и др., 2024) (рис. 11).



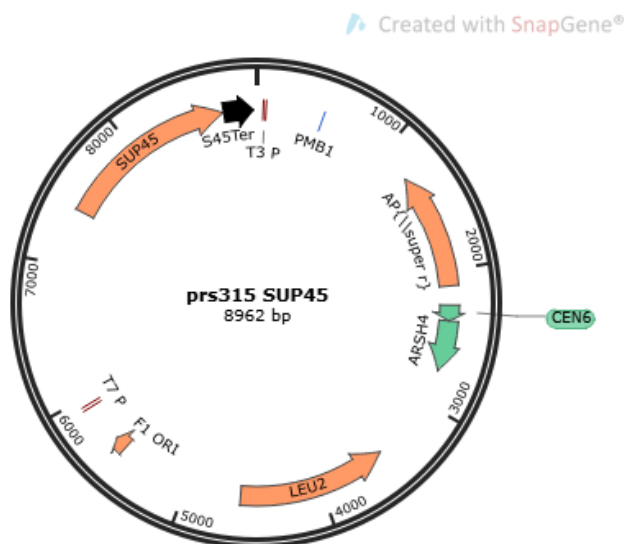
**Рисунок 10. Физическая карта плазмиды pRS316-UPF1.** Она была использована для сайт-направленного мутагенеза для получения плазмиды с мутацией по гену *UPF1*, приводящей к аминокислотной замене продукта этого гена.



**Рисунок 11. Физическая карта плазмиды YEplac181GC9H-sgkR(3-7).**

Для проверки жизнеспособности мутантов с нонсенс-мутацией в гене *SUP45* на среде 5-FOA использованы плазмиды, ранее полученные в нашей лаборатории (рис. 12) (таблица 3.) (Журавлева & Грызина, 2012; Moskalenko *et al.* 2003).

На рисунке 12 представлена физическая карта плазмиды pRS315-*SUP45*, на основе которой были получены плазмиды с мутациями в гене *SUP45*. В таблице 3 описана молекулярная природа мутаций в гене *SUP45*, использованных в работе.



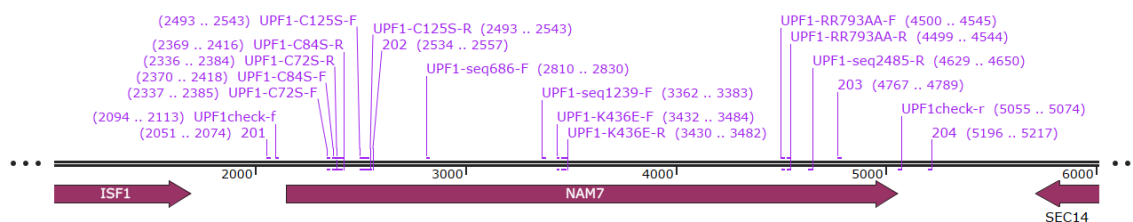
**Рисунок 12. Физическая карта плазмиды pRS315-*SUP45*.**

**Таблица 3. Плазмиды, содержащие нонсенс- и мисенс-мутантов *SUP45*.**

Название плазмиды	Замена нуклеотида	Замена аминокислотного остатка
pRS315- <i>SUP45</i> -wt или pRS315- <i>SUP45</i>	-	-
pRS315 или pRS315-Ø	-	-
pRS315- <i>sup45</i> -101	796 G на T	266 Glu на (TAA)
pRS315- <i>sup45</i> -102	159 T на A	53 Tyr на (TAA)
pRS315- <i>sup45</i> -103	62 T на C	21 Leu на Ser
pRS315- <i>sup45</i> -105	1153 G на T	385 Glu на (TAA)

### 4.3. Праймеры

На рисунке 13 представлена физическая карта гена *UPF1* и праймеры, которые использованы в этой работе.



**Рисунок 13. Схема гена *UPF1(NAM7)* с расположением на нем праймеров, которые использованы в работе.**

В таблице 4 представлены праймеры для сайт-направленного мутагенеза с помощью ПЦР в гене *UPF1*, проверки наличия гена *UPF1* на хромосоме штамма и секвенирования.

**Таблица 4. Праймеры, использованные в работе.**

Название	Последовательность 5'-3'	Назначение
upf1-C72S-F	TGTGGTATAGATTCTGCAAAGTcT GTCATCAAATGTAATTCATGTAA GA	ПЦР-мутагенез
upf1-C72S-R	CTTACATGAATTACATTTGATGAC AgACTTTGCAGAATCTATACCAC AA	
upf1-C84S-F	TGTAATTCATGTAAGAAATGGTT TtTAACACTAAAAACGGTACAA GCA	
upf1-C84S-R	CTTGTACCGTTTTTAGTGTTAgAA AACCATTTCTTACATGAATTACAT	
upf1-C125S-F	GATACCGTTTTGGAATGTTATAAC TcTGGACGTAAGAACGTGTTTTT ATTG	
upf1-C125S-R	CAATAAAAACACGTTCTTACGTC CAgAGTTATAACATTCCAAAACG GTATC	
upf1-K436E-F	GGCCCACCAGGCACTGGTgAAA CAGTACTTCAGCAACGATTGTG TATCACCT	
upf1-K436E-R	GTGATACACAATCGTTGCTGAAG TAACTGTTTcACCAGTGCCTGGT GGGCCTT	
upf1-RR793AA-F	ATTGGTTTCTTACGTGATCCTgcTg cTCTAAACGTGGGTCTAACCC	
upf1-RR793AA-R	GGTTAGACCCACGTTTAGAgcAgc AGGATCACGTAAGAAACCAATG	

UPF1-seq2485-R	CGACTAAACAACCCTTCTCTCT	Проверка наличия хромосомной копии гена <i>UPF1</i> трансформантов, Секвенирование
UPF1-seq1239-F	TGCACAATTAAACTCATCCCAG	
UPF1-seq686-F	GGAAGCAATCCCACCTTTACT	
201	CAGCCAACAAACGTTGAAGATT TC	
202	GCGGAAACAAATCCCAATAAAA AC	
203	CCGAAGTTCAGGATTTTGATGC	
204	GATAGATGCACCTCCGAAAAG	
UPF1-check-R	CAGGGTTCACCGAATTATAT	
UPF1-check-F	CAGCAAGACCGAATATACTT	

#### 4.4. Среды и условия культивирования

##### 4.4.1. Среды и условия для культивирования бактерий

Для культивирования бактерий *E. coli* DH5 $\alpha$  использовали среду LB (Lysogeny broth, лизогенная среда) (Sambrook *et al.*, 1989) с добавлением ампициллина в концентрации 100 мкг/мл. Бактериальные культуры растили при температуре 37°C.

##### 4.4.2. Среды и условия для культивирования дрожжей

Штаммы дрожжей культивировали при 30 °C. Мы использовали полную среду (YEPD), селективные среды на основе минимальной среды YNB (SC), СПГ среду (среда с неферментируемым источником углеводов) с целью проверки активности митохондрий.

Для двугибридного анализа в работе использованы селективные среды, которые содержат 3-АТ в различных концентрациях (0;0,2мМ;1мМ;4мМ)



Для проверки чувствительности штаммов к канамицину использовали полную среду YEPD с канамицином, концентрация которого составляла 100 мкг/мл.

Для приготовления среды для селекции мутантов с маркером [*URA3*], использовали 5-FOA в концентрации 1 мг/мл среды YNB.

#### **4.5. Генетические и микробиологические методы**

##### **4.5.1. Бактериальная трансформация компетентных клеток**

Для проведения бактериальной трансформации использовали предварительно полученные компетентные клетки *E. coli* (штамм *DH5α*). размораживали во льду в течение 20 минут. Для приготовления одной трансформационной смеси к 50 мкл компетентных клеток добавляли до 0,1 мкг плазмидной ДНК. Полученные смеси инкубировали во льду в течение 30 минут, затем — в водяной бане при 42°C в течение одной минуты. На следующем этапе к смеси добавляли жидкую среду LB до конечного объема 1 мл и оставляли их инкубироваться при 37°C при постоянном перемешивании со скоростью 250 об/мин на 1 час. Далее клетки осаждали посредством центрифугирования (5 минут при скорости 5000 об/мин), сливали 850-900 мкл надосадочной жидкости, ресуспендировали клеточный осадок в оставшемся объеме и получившуюся суспензию высевали на селективную среду LВа. Чашку Петри с высеянными клетками оставляли в инкубаторе при 37 °C на 12-16 часов.

##### **4.5.2. Трансформация дрожжей**

Ночную культуру дрожжевых штаммов использовали для проведения рутинной дрожжевой трансформации (fast & low-efficiency) по протоколу Gietz *et al.*, 1998. Клетки осаждали центрифугированием в пробирке при скорости 5000 оборотов/мин, в течение 2 минут. Отмывали от среды водой, затем ресуспендировали клетки в 0,1 LiAc, и инкубировали клетки в течение 20 минут, при 30 °C. После инкубации центрифугировали клетки при тех же условиях, сливали около 450 мкл LiAc и ресуспендировали клетки в оставшемся объеме (50 мкл). На следующем этапе добавляли трансформационную смесь: 240 мкл 50% ПЭГ (полиэтилен-гликоль), 36 мкл 1M LiAc, 20 мкл балластной ДНК (5 мг/мл), от 500 нг до 1 мкг ДНК на трансформацию. Все компоненты тщательно перемешивали и инкубировали смесь при 30 °C, 30 минут. После этого проводили температурный шок 15 минут при 42°C, центрифугировали смесь при скорости 5000 оборотов/мин 30 секунд, после чего удаляли жидкость микропипеткой, ресуспендировали осадок в 100 мкл воды.

Трансформантов высевали на селективную среду SC -Leu или -Leu -Ura и выращивали при 30 °C.

##### **4.5.3. Дрожжевой двугибридный анализ**

Для получения трансформантов проводили дрожжевую трансформацию High-efficiency по протоколу Agater *et al.*, 1998. Разбавляли культуры в 10 раз с 900 мкл воды и 100 мкл культуры. Подсчёт клеток в 1 мл среды проводили с использованием камеры Горяева по формуле:  $(N \cdot 10^6 / 20) \cdot 10$ , где N — количество клеток в больших квадратах.

В случае, если количество клеток было больше  $5 \cdot 10^6$  клеток/мл, то их разбавляли со средой и культурой. После определения концентрации клеток, инкубировали культуру при 30 °C на качалке при скорости 200 оборотов/мин 3 часа. После этого центрифугировали клетки при скорости 5000 оборотов/мин, 5 минут. Среду слили и смешали осадок клетки в 30 мл воды, смесь еще раз при тех же

условиях центрифугировали. После этого слили жидкость. Потом смешали осадок с 1 мл 0,1 М LiAc, и перенесли смесь в пробирку. Центрифугировали пробирку при скорости 5000 оборотов/мин, 1 минут. Убрали микропипеткой LiAc. Добавляя 0,1М LiAc, довели объем смеси до 500 мкл. Потом готовили 12 Эффендорф (пробирки) и налили 50 мл смеси каждому. После этого центрифугировали пробирки и убрали жидкость микропипеткой. Потом в пробирке сделали трансформационной смеси с 240 мкл 50% ПЭГ, 36 мкл 1М LiAc, 20 мкл балластной ДНК (5 мг/мл). 2 Раствора плазмиды, которые содержат сайты DBD или AD, добавили по-разному (таблица 5.).

**Таблица 5. Объем ДНК в трансформации двугибридного анализа.**

Название плазмиды	Объем
pHF 1011	2 мкл
pHF 1165	
pHF 1169	
pHF 1161	
pHF 1668	
pGBT9 SUP45	3 мкл
pGBT9 SUP35	
pGBT9	
pGADGH SUP45	
pGADGH	

После добавления ДНК добавили воду 59 мкл. Смесь инкубировали при 30°C, 30 минут, потом их инкубировали в бане при 42 °C, 15 минут. После этого центрифугировали смесь при 5000 оборотов/мин 15 секунд, и убрали потом жидкость. Осадок ресуспендировали в 100 мкл воды и высеяли на чашку селективной среды:

1. -Leu, -Trp
2. -Leu, -Trp, -Ade
3. -Leu, -Trp, -His
4. -Leu, -Trp, -His с различной концентрацией антибиотика 3-АТ(3-Аминотриазол)
5. YEPD
6. Среда СПГ

Использовали -Leu среду для проверки активаторного домена, -Trp среду для проверки ДНК-связывающего домена, -His среду для проверки активности двугибридной системы, 3-АТ для отбора штаммов с высоким уровнем экспрессии гена *HIS3*. Среда СПГ использовали для проверки активности митохондрий.

#### **4.6. Методы работы с ДНК**

##### **4.6.1. Выделение плазмидной ДНК**

Выделение плазмидной ДНК проводилось с использованием коммерческого набора Thermo Scientific Gene JET Plasmid MiniPrep Kit и Евроген Plasmid MiniPrep согласно предлагаемому производителем протоколу. Концентрацию полученной плазмидной ДНК оценили спектрофотометром Thermo Scientific NanoDrop 2000.

#### 4.6.2. Рестрикция

Продолжительность рестрикции и количество единиц активности фермента на пробу определяли, исходя из количества ДНК в пробе, согласно инструкции фирмы производителя.

Перед дрожжевой трансформацией High-efficiency проводили рестрикцию, и в реакции использованы плаزمиды pGBT9-sup45, и набор рестриктаз, как:

1. EcoRI + PstI и буфер Orange
2. BamHI + BglII и буфер 2x Yellow

При получении мутаций в гене *UPF1* использовали ПЦР-мутагенез плазмиды pRS316 *UPF1*, далее, чтобы избавиться от исходной метилированной матрицы проводили рестрикцию полученных ПЦР продуктов с помощью рестриктазы DpnI, в буфере 10x Yellow Tango. Реакцию проводили при 37°C. После реакции проводили инактивацию фермента при 65°C. Полученные продукты рестрикции использовали для рутинной дрожжевой трансформации.

Перед рутинной дрожжевой трансформацией плазмиды pRS316-*upf1-n* с мутацией, подвергали рестрикции с помощью эндонуклеаз рестрикции BamHI и EcoRI. Был использован 10x BamHI buffer, Реакцию проводили при 37°C. После реакции эндонуклеазу рестрикции инактивировали при 65°C.

#### 4.6.3. Выделение дрожжевой ДНК

Выделение ДНК из дрожжевых штаммов проводили по протоколу Kaiser *et al.*, 1994.

Также с целью быстрого получения геномной ДНК из дрожжевой колонии использовали следующий протокол: ресуспензировали отобранную колонию трансформантов в 100 мкл буфера с 0,2% LiAc, 1% SDS. Суспензию нагревали в термоблоке 10 минут при 70°C. Потом в суспензию добавили 300 мкл 96% EtOH и ресуспензировали. После этого центрифугировали смесь 10 минут при 4°C, на максимальной скорости (примерно 14600 оборотов/мин). Добавляли 500 мкл 70% EtOH к осадку и центрифугировали при тех же условиях 5 минут. Осадок высушивали с помощью вакуумного концентратора и растворяли в 100 мкл воды и хранили при -20°C (Löoke *et al.* 2011).

#### 4.6.4. Очистка дрожжевой ДНК фенолом и хлороформом

Для повышения качества геномной ДНК дрожжей производили ее очистку фенолом и хлороформом.

К раствору ДНК добавили равный объем фенола и перемещали, потом центрифугировали смесь со скоростью 14,000 оборотов/мин в течение 5 минут. После этого перенесли только верхнюю фракцию в новую пробирку. Потом добавили к раствору ½ объема фенола и ½ объема хлороформа с изоамиловым спиртом и перемешали. Аналогичным образом центрифугировали и перенесли верхнюю фракцию в новую пробирку. Потом добавили к раствору равный объем хлороформа с изоамиловым спиртом и перемещали. Аналогичным образом центрифугировали и перенесли верхнюю фракцию в новую пробирку. Добавили 1/10 объема 3M NaAc, а затем – 2 объема охлажденного 96% этанола и перемещали, потом инкубировали смесь на ночь при температуре -20 °C. Потом центрифугировали смесь при скорости 14,000

оборотов/мин при 4 °С в течение 20 минут. Потом удалили надосадочную фракцию и добавили 300 мкл охлажденного 70% этанола и центрифугировали при температуре 4 °С в течение 2 минут, максимальной скоростью. После этого слили спирт и повторили процедуру добавление 70% этанола и центрифугирование аналогичным образом. После этого добавили 200 мкл охлажденного 96% этанола и центрифугировали максимальной скоростью при температуре 4 °С в течение 2 минут. Удалили спирт. Потом в вакуумном концентраторе высушили осадок ДНК при скорости 2000 оборотов/мин при 20 °С, в течение 15 минут.

Осадок ДНК растворили в 50 мкл MQ воде, которую нагрели предварительно до 65°С.

#### 4.6.5. ПЦР и электрофорез ДНК в агарозном геле

Для проверки наличия хромосомной копии гена *UPF1* с помощью ПЦР использовали Hot start Taq ДНК полимеразу. Праймеры представлены в таблице 4. Температура отжига составляла 54°С (таблица 6).

Для ПЦР мутагенеза использована точная и высокоэффективная полимеразы Pfx. Программа для ПЦР-мутагенеза представлена в таблице 6.

**Таблица 6. Программа для получения ПЦР-продукта с хромосомной копии гена *UPF1*.**

Этапы	Температура	Время (мин:сек)
1 – первоначальная денатурация ДНК	95°С	5:00
2 – денатурация ДНК	95°С	0:30
3 – отжиг (связывание праймеров)	54°С	0:30
4 – элонгация (синтез цепи ДНК)	72°С	2:00
5	Вернуться на этап 2. Повторяется 29 раз	
6 – окончательная элонгация	72°С	15:00
7 – охлаждение (до выключения)	10°С	∞

Электрофорез продуктов ПЦР в агарозном геле проводили на основе трис-фосфатного буфера (TBE), концентрация агарозы составляла 1%. Электрофорез проводили 40 минут при напряжении 80 В в камере с буфером TBE. Для окрашивания ДНК гель выдерживали в растворе бромистого этидия (концентрация - 0.5г/л) в течение 10-15 минут. Детекция флуоресценции бромистого этидия, связавшегося с ДНК, проводилась с использованием транс-иллюминатора.

Для электрофореза использован маркер 1Кб ДНК маркер (производитель: SibEnzyme).

#### 4.6.6. Секвенирование

Секвенирование плазмид, содержащих ген *UPF1* с мутациями проводили на базе Ресурсного центра "РМиКТ" НП СПбГУ.

Для того, чтобы убедиться, что редактированные с помощью системы CRISPR-Cas дрожжевые штаммы содержат мутантную копию гена *UPF1*, было проведено секвенирование ПЦР-продуктов гена *UPF1* у этих штаммов (таблица 7.).

**Таблица 7. Праймеры, использованные для секвенирования ПЦР продуктов хромосомной копии гена *UPF1*.**

ДНК	Праймер
U-1A-D1628- <i>upf1-K436E</i> №3	202, 203, UPF1-check-f, UPF1-check-r, UPF1-seq1239-F, UPF1-seq2485-R, UPF1-seq686-F
U-1A-D1628- <i>upf1-RR793AA</i>	202, 203, UPF1-check-f, UPF1-check-r, UPF1-seq1239-F, UPF1-seq2485-R, UPF1-seq686-F
U-14-D1690- <i>upf1-K436E</i>	UPF1-seq1239-F, UPF1-seq686-F

#### 4.6.7. Программное обеспечение.

Дизайн праймеров для ПЦР-мутагенеза и секвенирования проводили в программе SnapGene (<https://www.snapgene.com/>).

Для оценки концентрации полученной выделенной плазмидной ДНК была использована программа NanoDrop 2000 (<https://www.thermofisher.com/>)

Для анализа результатов секвенирования и конструирования плазмиды YEplac181GC9H-sgkR(3-7) была использована программа Unipro UGENE (<https://ugene.net/>).

## 5. Результаты и обсуждение

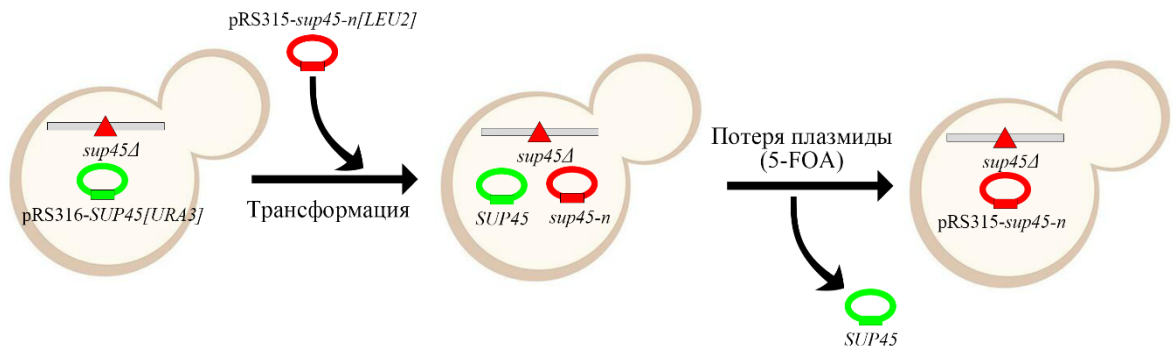
### 5.1. Оценка жизнеспособности дрожжевых штаммов с нонсенс-мутациями в гене *SUP45* на фоне делеции гена *UPF1* по сравнению со штаммом без делеции

Для проверки жизнеспособности мутантов с нонсенс-мутациями в гене *SUP45* на фоне делеции гена *UPF1* и без делеции, проведена трансформация дрожжевых штаммов 1А-Д1628, U-1А-D1628-uk.1, U-1А-D1628-uk.3 (последние два штамма являются независимо полученными штаммами с делецией гена *UPF1*) плазмидами pRS315, содержащими ген *sup45-105* или *sup45-101* (нонсенс-мутации) и маркерный ген *LEU2*. На фоне этих мутаций, согласно нашим данным, делеция гена *UPF1* дает наиболее сильный эффект на жизнеспособность (рис. 7) (Журавлева & Грызина. 2012).

Исходно дрожжевые штаммы несут дезрупцию гена *SUP45* на хромосоме и компенсаторную плазмиду pRS316-*SUP45-wt* (поскольку ген *SUP45* является жизненно-важным) с маркерный ген *URA3*. Трансформантов Ura<sup>+</sup> Leu<sup>+</sup> (содержащих одновременно две плазмиды pRS315-*sup45-n* pRS316-*SUP45*) отсеивали на среде 5-FOA для селекции против плазмиды pRS316-*SUP45* (рис. 14).

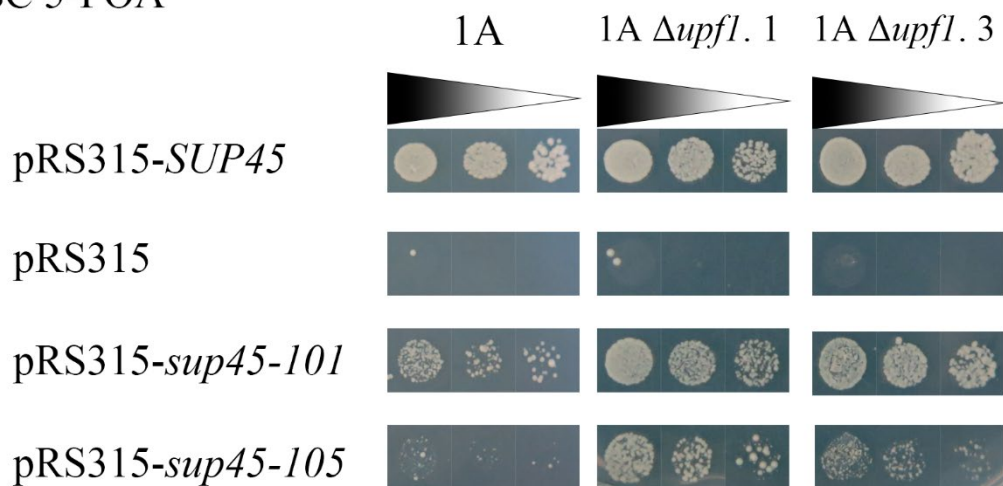
Механизм действия 5-фтороротовой кислоты (5-FOA) заключается в том, что 5-FOA является предшественником 5-фторурацила (5-FU), который является токсичным для клеток, способных преобразовывать его в активную форму. Клетки, обладающие геном *URA3*, могут метаболизировать 5-FOA в токсичный 5-FU, что приводит к гибели этих клеток. Таким образом на среде 5-FOA выживают только клетки, у которых нарушен биосинтез урацила, т.е. клетки, содержащие только плазмиду pRS315-*sup45-n* (Боеке *et al.* 1987).

В качестве положительного контроля для оценки жизнеспособности штаммов использовали штаммы, трансформированные плазмидой pRS315-*SUP45* (содержит *SUP45* без мутации, следовательно дают хороший рост на среде с 5-FOA), а в качестве отрицательного – эти же штаммы, трансформированные вектором pRS315, не содержащим копии гена *sup45* (не выживают на среде с 5-FOA, поскольку ген *SUP45* является жизненно-важным). (рис. 15).



**Рисунок 14. Схема шаффлинга плазмид, содержащих *SUP45-wt* на плазмиду *sup45-n* (plasmid shuffling, замена плазмиды).** Изначально штамм имеет делецию гена *SUP45* на хромосоме, но у него компенсаторная плаزمид, которая носит ген *SUP45* дикого типа, обеспечивает синтез Sup45. Проведена трансформация с плазмидой, которая носит *sup45-n*. Далее, отсевали трансформантов на среде 5-FOA для потери плазмиды с урациловым маркером *URA3*. В итоге остается только плазмиды pRS315-*sup45-n*.

 : Степень разведения  
 SC 5-FOA



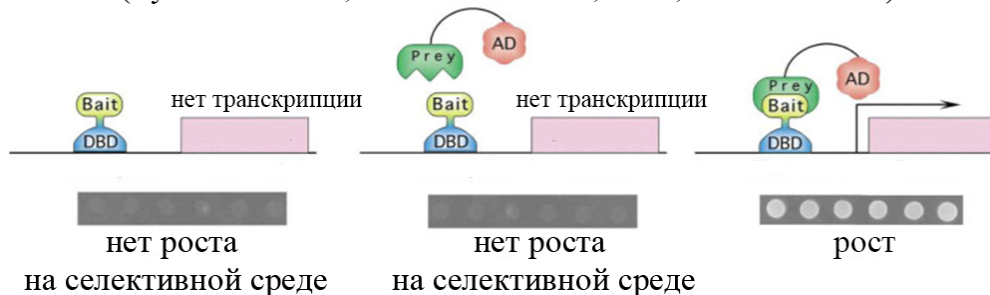
**Рисунок 15. Сравнение роста трансформантов на среде 5-FOA.** Посев выполнен с использованием серии пятикратных разведений. Градиентом указана степень разведения. Представлен рост трансформантов после 6 дней отсева на среде 5-FOA.

Как ранее показано в работе Moskalenko *et al.* 2003, здесь также наблюдается снижение жизнеспособности у мутантов, которые содержат плазмиду гена *sup45-n*, по сравнению с трансформантами с геном *SUP45*. Делеция гена *upf1* приводит к повышению жизнеспособности штаммов, содержащих нонсенс-мутации по гену *sup45-n*. Наибольший эффект делеции *UPF1* на жизнеспособность был выявлен на фоне мутации *sup45-105* у штамма 1A  $\Delta upf1. 1$ , поэтому для дальнейшего анализа была выбрана мутация *sup45-105* и использован именно этот штамм.

## 5.2. Анализ взаимодействия белков Sup35 и Sup45 с различными доменами белка Upf1.

Цель двугибридного анализа заключается в проверке физического взаимодействия двух белков интереса (рис. 16), в нашем случае – различных участков Upf1 и Sup35 или Sup45.

(Плю Serebriiskii, Erica A. Golemis, 2004, с изменением)



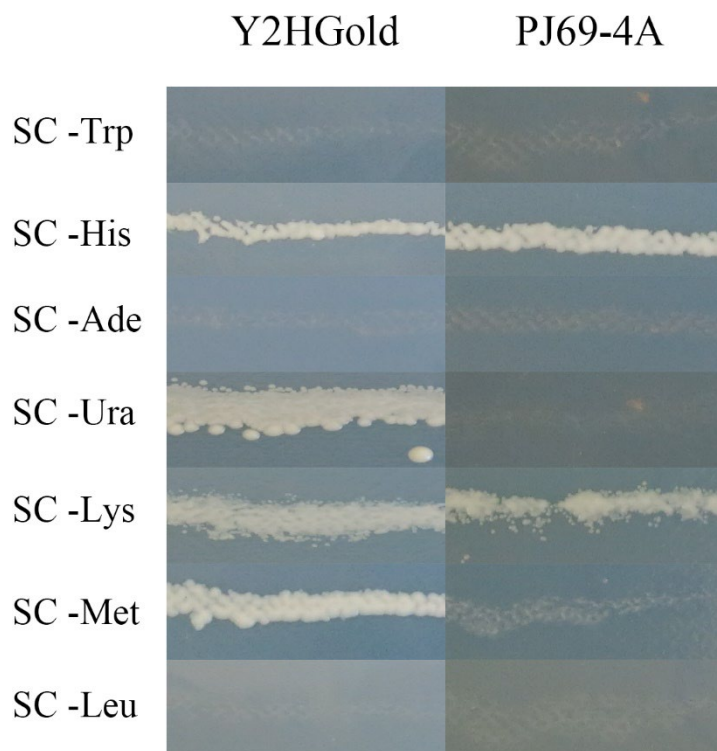
**Рисунок 16. Схема работы двугибридной системы с ауксотрофным репортерным геном** (например, *HIS3* под промотором, который распознает транскрипционный фактор активирующий и ДНК-связывающий домены которого использованы в этой системе). Рост штамма наблюдается только при физическом взаимодействии двух белков интереса, которое приводит к взаимодействию ДНК-связывающего и активаторного доменов – AD и DBD. Один белок интереса «bait» («наживка») слит с ДНК-связывающим доменом (DBD) транскрипционного фактора, а второй белок интереса «prey» («жертва») - активирующим доменом (AD) транскрипционного фактора. При физическом взаимодействии двух белков интереса DBD и AD оказываются сближены и способны активировать транскрипцию репортерного гена.

Ранее с помощью двугибридного анализа в нашей лаборатории было показано слабое взаимодействие фрагмента белка, Upf1<sub>1-555</sub>(pHF 1161), и белка Sup45 (Г. А. Журавлева & В.А. Грызина. 2012), но полноразмерный белок Upf1<sub>1-971</sub>(pHF 1668) не взаимодействует с Sup45 (полноразмерным) и предложено, что такое отсутствие взаимодействия может объясняться особенностями проведения двугибридного анализа. Также в другой работе показано, что аминокислотная замена K436A в Upf1 нарушала взаимодействие Upf1 с Sup45 (Trubitsina N.P. *et al.* 2020).

В нашем распоряжении имелось два штамма: коммерческий штамм Y2HGGold и штамм, использованный в работе Журавлевой и Грызиной - PJ69-4A. Поскольку взаимодействие, которое наблюдается в них работе, слабое, в наших экспериментах мы использовали оба, в надежде получить более четкий результат. Перед проведением двугибридного анализа был проведен фенотипический анализ штаммов Y2HGGold и PJ69-4A на средах Trp-, His-, Ade-, Ura-, Lys-, Met-, Leu-) (рис. 17).

Фенотип штаммов в целом соответствовал ожидаемому, однако оба штамма проявляли заметный рост на среде His- несмотря на наличие мутации *his3-200* и то, что репортерный ген *HIS3* был под промотором *GAL1*, который не должен был активироваться без взаимодействия AD-DBD.





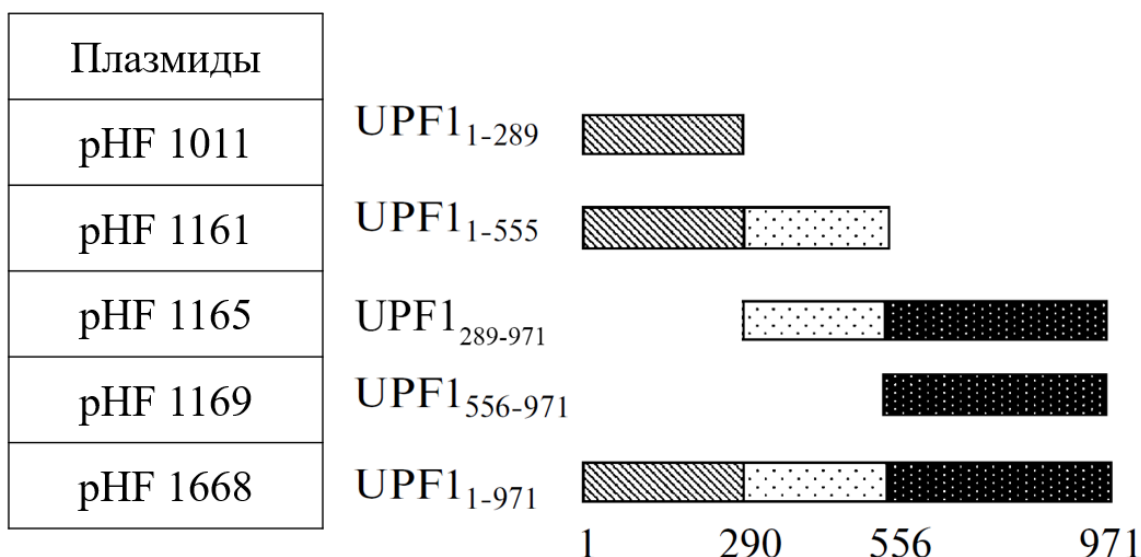
**Рисунок 17.** Фенотип штаммов для дрожжевой двугибридной системы на серии селективных сред.

В работе были использованы конструкции на основе плазмиды pGBT9, в которых полноразмерный ген, кодирующий один из белков интереса Sup45 или Sup35, слит с ДНК-связывающим доменом (DBD – DNA-binding domain). Плаزمида pGBT9 имеет триптофановый маркер, позволяющий расти штамму с этой плазмидой на среде без триптофана.

Второй тип конструкций на основе плазмиды pHF, содержал различные фрагменты гена *UPFI*, слитые с доменом- активатором транскрипции (AD – activating domain) (рис. 18), и в качестве положительного контроля использована плазмида pGADGH, которая содержит ген *SUP35*, также слитый с AD. Плазмиды pHF, pGADGH содержат лейциновый маркер (см. «Материалы и методы 4.2.»).

Если белки интереса физически взаимодействуют друг с другом, AD и DBD сближаются и могут взаимодействовать, в результате чего активируется репортерный ген. В нашей системе их два: ген *HIS3* и *ADE*. Активация гена *HIS3*, *ADE* за счет взаимодействия DBD и AD позволяет клеткам расти на селективной среде без гистидина, триптофана, лейцина и среде без аденина, триптофана и лейцина.

Для того, чтобы избежать ложнопозитивных результатов в двугибридном анализе, необходимо использовать 3-АТ, поскольку 3-АТ (3-aminotriazole) является ингибитором гистидинового биосинтеза и подавляется рост штаммов дрожжей, которые экспрессируют гистидиновые гены (Kłopotowski *et al.* 1965). Так как оптимальная концентрация 3-АТ для двугибридной дрожжевой системы зависит от штамма мы использовали серию сред Leu-Trp-His-, содержащую разную концентрацию 3-АТ: 0; 0,2; 1; 4 мМ.



Г. А. Журавлева и В.А, Грызина. (2012 , с изменением)

**Рисунок 18.** Аминокислотные участки Upf1, и плазмиды, которые содержат их. Эти плазмиды в дальнейшем были использованы при трансформации дрожжевых клеток, в результате они образовали активаторный домен (AD).

На следующем этапе после фенотипического анализа штаммов мы проводили дрожжевую трансформацию (см. «материалы и методы»), одновременно двумя плазмидами чтобы сформировать пару, содержащую активаторный и ДНК-связывающий домен одновременно. В качестве положительного контроля использовали плазмиды *pGADGH-SUP45* и *pGBT9-SUP35*. Полученных трансформантов отсеивали на серию сред -Leu-Trp, -Leu-Trp-Ade, а также сред -Leu-Trp-His, содержащих различную концентрацию 3-AT: 0; 0,2; 1; 4 мМ используя два пятикратных разведения. Результат роста анализировали на 5-й, 10-й и 15-й день роста (рис. 19).

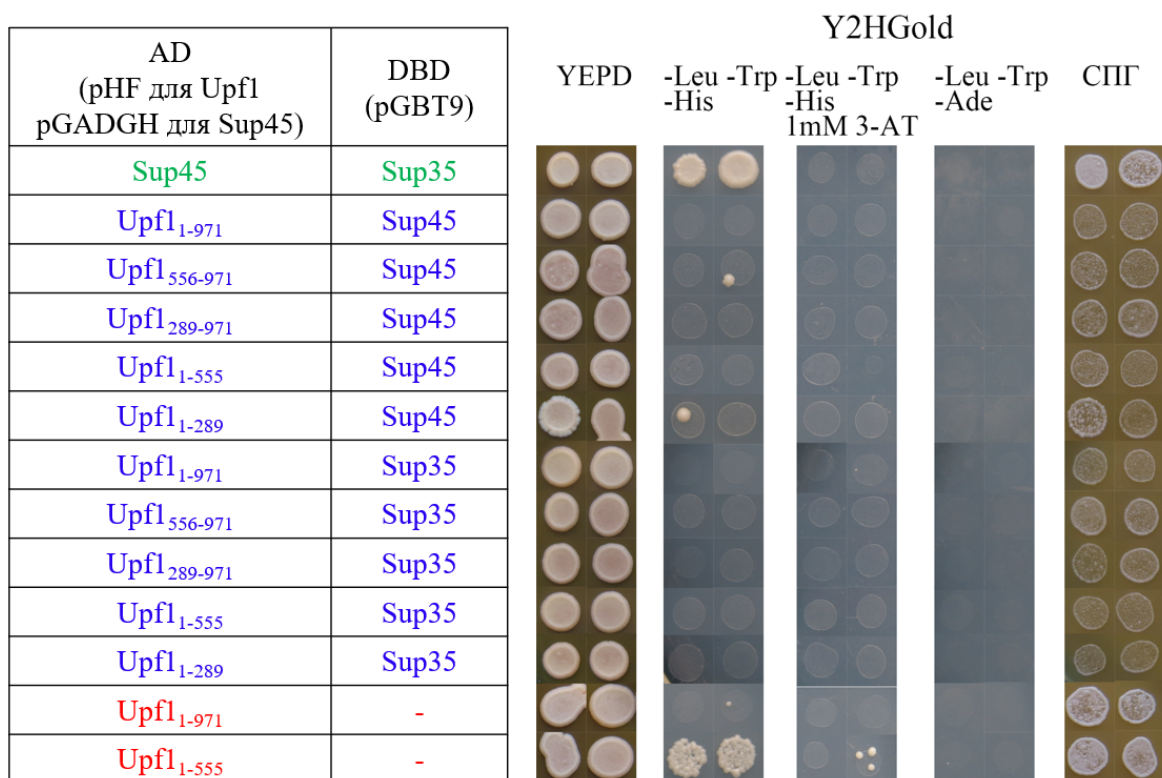
AD (pHF для Upf1 pGADGH для Sup45)	DBD (pGBT9)	PJ69-4A SC-Leu-Trp-His		
		5 дней	10 дней	15 дней
Sup45	Sup35			
-	Sup35			
-	Sup45			
-	-			
Upf1 <sub>1-555</sub>	-			
Upf1 <sub>1-971</sub>	-			
Upf1 <sub>1-555</sub>	Sup45			
Upf1 <sub>1-555</sub>	Sup35			
Upf1 <sub>1-971</sub>	Sup45			
Upf1 <sub>1-971</sub>	Sup35			

**Рисунок 19. Результат двугибридного анализа трансформантов штамма PJ69-4A на среде -Leu -Trp -His 1мМ 3-АТ.** Зеленым цветом отмечены штаммы положительного контроля. В качестве положительного контроля взято взаимодействие белков Sup35 и Sup45. Красным цветом отмечены штаммы отрицательного контроля. В качестве отрицательного контроля брали плазмиды, несущие различные участки гена *UPF1* и вектор без гена интереса (обозначен как -) с ДНК-связывающим доменом. синим цветом отмечены опыт – сочетание плазмид, несущих ген *SUP35* или *SUP45*, а также плазмид, содержащих фрагменты гена *UPF1*. Фотографию проводили с интервалом в пять дней.

Взаимодействие DBD и AD оценивали по росту на -Leu-Trp-His средах, поскольку на средах Leu- Trp- Ade- не было роста даже для положительного контроля. Оптимальной концентрацией 3-АТ оказалась 1мМ, при этом не было роста большинства отрицательных контролей, но хорошо был виден рост положительного контроля. (рис. 20). У обоих штаммов Y2HGold, и у PJ69-4A, несущих плазмиды pGBT-*SUP35* + pGADGH-*SUP45*, наблюдается рост. Этот вариант является положительным контролем.

Нам не удалось выявить рост на селективных средах ни у одного штамма, содержащего плазмиду с фрагментом гена *UPF1* (и полноразмерным *UPF1*) и плазмиду с полноразмерным *SUP35* или *SUP45*, что свидетельствует об отсутствии взаимодействия белковых продуктов этих генов в дрожжевой двугибридной системе. Неожиданно мы обнаружили, рост штаммов плазмидами pGBT9 + pHF1161, которые являются отрицательными контролями, что свидетельствует о ложно-положительном результате. Кроме того, штамм Y2HGold, несущий pGBT-*SUP35* и pGADGH-*SUP45* на

среде -Leu -Trp -His 1мМ 3-АТ и -Leu -Trp -Ade не показывает рост, который должен был обнаружен для положительного контроля.



**Рисунок 20. Результат двугибридного анализа трансформантов штамма Y2HGold.** Зеленым цветом отмечены штаммы положительного контроля. В качестве положительного контроля взято взаимодействие белков Sup35 и Sup45. Красным цветом отмечены штаммы отрицательного контроля. В качестве отрицательного контроля брали плазмиды, несущие различные участки *UPF1* и пустые вектора с ДНК-связывающим доменом. синим цветом отмечены опыт.

Возможно, данный метод не подходит для этой задачи, поскольку известно, что двугибридная система лучше работает для гетерологичных белков (не дрожжевых).

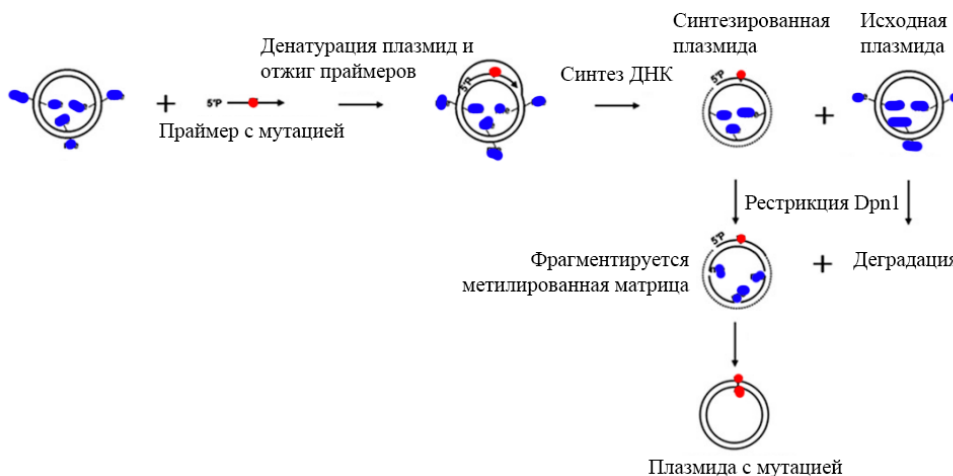
Таким образом, в дальнейшем мы планируем оценивать взаимодействие фрагментов Upf1 с факторами терминации трансляции другими методами (например, FRET - Fluorescence resonance energy transfer, флуоресцентный резонансный перенос энергии).

### 5.3. Получение плазмид, содержащих точковые мутации гена *UPF1*, приводящих к аминокислотным заменам продукта гена: C72S, C84S, C125S, K436E, RR793AA

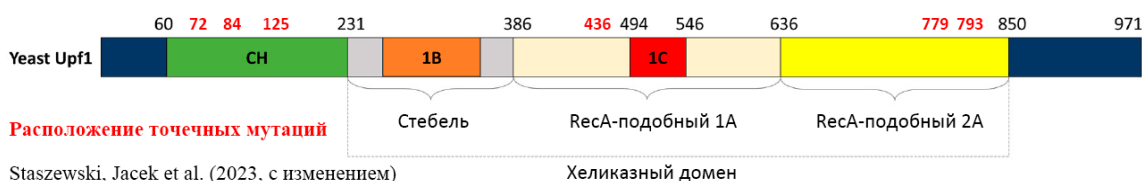
Первым этапом для получения штаммов, содержащих точковые мутации гена *UPF1* на хромосоме был ПЦР-мутагенез гена *UPF1*, содержащегося на плазмиде pRS316-*UPF1* (рис 21 и 22.).

Для этого мы выбрали праймеры и провели ПЦР-мутагенез, используя точную и высокоэффективную полимеразу Pfx.

Huang, Y., & Zhang, L. (2016, с изменением)

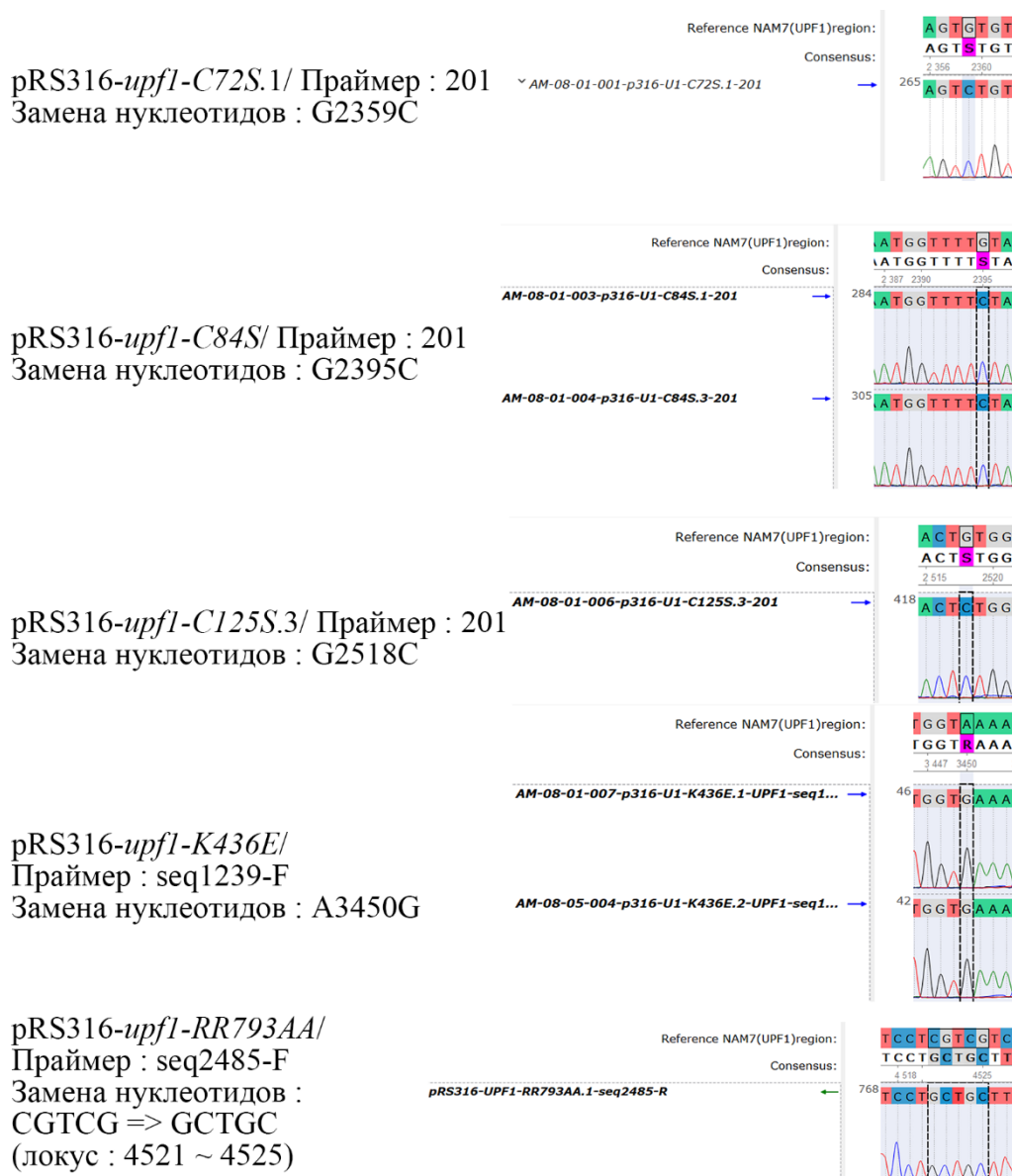


**Рисунок 21. Схема сайт-направленного ПЦР-мутагенеза.** Исходная плазмиды (содержит ген *UPF1* дикого типа) метилирована (метильная группа отмечена синим цветом), и при 95°C идет денатурация плазмид, и при 54°C – отжиг праймера. Потом рестриктаза *DpnI* расщепляет только метилированные ДНК цепи, исходной плазмиды. Мутация отмечена красным цветом.



**Рисунок 22. Структура доменов белка *Upf1* и расположение точечных мутаций, которые приводят к аминокислотным заменам в различных доменах *Upf1*.** Замены отмечены красным шрифтом.

Полученный ПЦР-продукт, обработали рестриктазой *DpnI*, разрезающей только метилированную ДНК, следовательно, только исходную плазмиду, содержащую *UPF1* без мутации. Полученным ПЦР-продуктом плазмид трансформировали штамм бактерий *DH5α*, отобрали клоны, выделяли плазмиды и секвенировали ген *UPF1*, чтобы убедиться, что он, с одной стороны, содержит нужную мутацию, а с другой стороны, не содержит каких-то дополнительных мутаций, которые могли бы возникнуть при ошибках ПЦР (рис. 23).



**Рисунок 23. Хроматограмма секвенирования фрагмента гена *upf1-n*. Пунктирной линией выделены полученные мутации.**

Секвенирование подтвердило наличие мутаций в плаزمидах, которые мы получали ПЦР-мутагенезом: pRS316 *upf1-C72S*, pRS316 *upf1-C84S*, pRS316 *upf1-C125S*, pRS316 *upf1-K436E*, pRS316 *upf1-RR793AA* и отсутствие каких-либо дополнительных мутаций в гене *UPF1*.

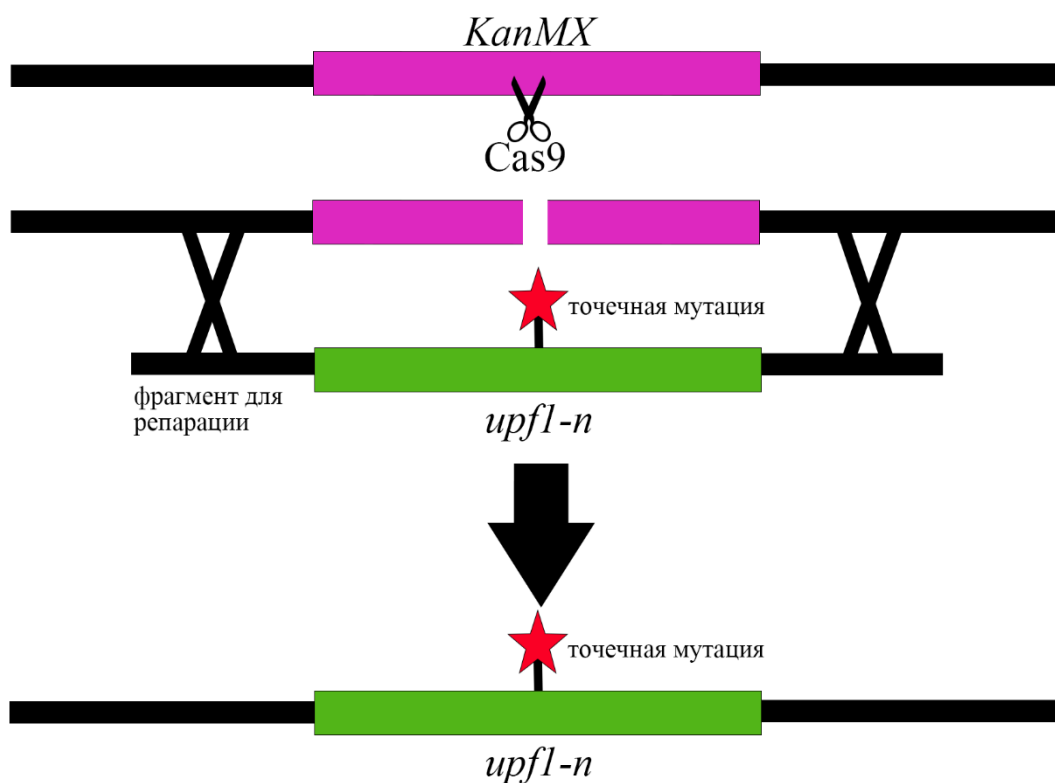
#### 5.4. Получение штаммов U-1A-D1628-uk.1 и U-14-D1690-uk.3 с мутациями гена *UPF1* на хромосоме

В ходе работы планировалось получение точковых мутаций в гене *UPF1* в двух штаммах: U-1A-D1628-uk.1 и U-14-D1690-uk.3, содержащих делецию гена *upf1* (вместо гена *UPF1* - ген *KanMX* на хромосоме) – далее в работе эти штаммы будут обозначены как: 1A  $\Delta upf1$  и U-14  $\Delta upf1$ . Это позволит оценить жизнеспособность мутантов по гену *UPF1* на фоне мутаций по гену *SUP45* (1A  $\Delta upf1$ ) и *SUP35* (U-14  $\Delta upf1$ ). Штаммы 1A  $\Delta upf1$  и U-14  $\Delta upf1$  трансформировали одновременно плазмидой



для геномного редактирования с помощью системы CRISPR-Cas9, YEplac181 GC9H-sgkR(3-7) (рис 11), и подвергнутой рестрикции по сайтам BamHI и EcoRI плазмидой pRS316-*upf1* с мутацией, в качестве матрицы для гомологичной рекомбинации. Рестриктию плазмид проводили, чтобы избежать присутствия нативной плазмиды pRS316-*upf1* в клетке. Рестриктазы подбирали так, чтобы не был затронут ген *UPF1* (сайты BamHI и EcoRI присутствуют только на острове плазмиды).

У обоих штаммов ген *UPF1* замещен на ген *KanMX*, за счет которого штаммы получают устойчивость к антибиотику канамицину. В ходе трансформации продукт гена *Cas9*, содержащийся на плазмиде YEplac181GC9H-sgkR(3-7) производит двунитевой разрыв в сайте-мишени (таргете) гена *KanMX* благодаря гидовой РНК. Далее двунитевой разрыв будет репарироваться с помощью гомологичной рекомбинации, характерной для дрожжевых клеток, используя ген *UPF1* с мутацией с плазмид, подвергнутой рестрикции (pRS316-*upf1-n*), в качестве матрицы. При этом ген устойчивости к канамицину *KanMX* может быть замещен мутантной копией гена *upf1-n*, и трансформанты потеряют устойчивость к канамицину (рис. 24).



**Рисунок 24. Схема процесса трансформации с помощью Cas9.** В ген *KanMX* вносит двунитевой разрыв Cas9. Репарация двунитевого разрыва происходит по механизму гомологичной рекомбинации, используя ген *upf1-n* в качестве матрицы. В итоге идет замена гена *KanMX* на ген *upf1-n*.

Трансформантов штаммов 1А  $\Delta upf1$  и U-14  $\Delta upf1$  с плазмидой YEplac181GC9H-sgkR(3-7) и одной из рестрицированных плазмид: pRS316 *upf1-C72S*, pRS316 *upf1-C84S*, pRS316 *upf1-C125S*, pRS316 *upf1-K436E*, pRS316 *upf1-RR793AA*, pRS316 *upf1-*

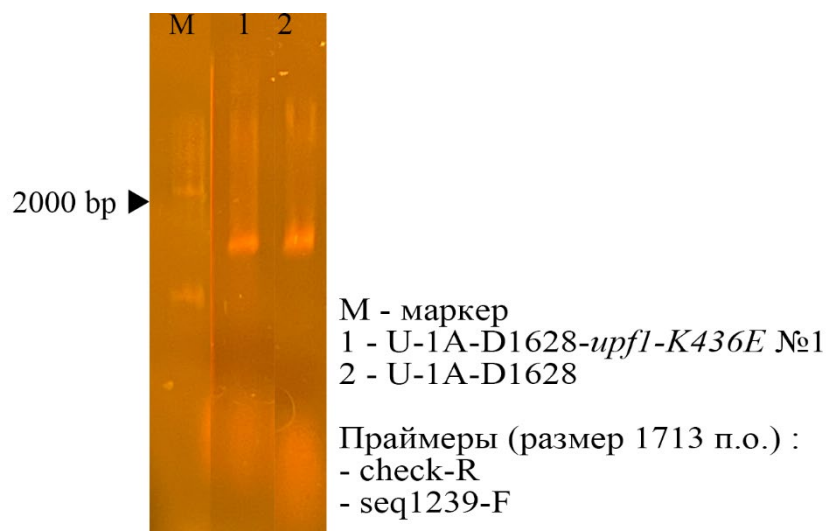
*D4*, pRS316 *UPF1-WT* высевали на среду SC -Leu. Полученных трансформантов отсеивали на полную среду YEPD для потери плазмиды YEplac181GC9H-sgkR(3-7), далее их переносили на среду YEPD, содержащую аналог канамицина G418. Часть полученных трансформантов оказалась чувствительна к канамицину (таблица 8.), но большинство штаммов сохранили свою устойчивость к канамицину.

На следующем этапе анализировали наличие гена *UPF1* у трансформантов, чувствительных к канамицину, с помощью ПЦР. Для того, чтобы проверить произошло ли замещение гена *KanMX* на копию гена *upf1-n*, из чувствительных к канамицину трансформантов выделяли геномную ДНК и проводили ПЦР с праймерами к последовательности гена *upf1-n* (таблица 8., праймеры в таблице 4.) (Рис. 25).

**Таблица 8. Количество трансформантов, полученных после трансформации плазмидами pRS316-*upf1-n* и чувствительных к канамицину G418.**

Штамм	Количество чувствительных к канамицину штаммов	Количество штаммов, у которых подтверждено наличие гена <i>upf1-n</i> с помощью ПЦР	Носит <i>SUP45</i> или <i>SUP35</i> в виде плазмиды
U-1A-D1628- <i>upf1-C72S</i>	15	-	<i>SUP45</i>
U-1A-D1628- <i>upf1-C84S</i>	19	-	
U-1A-D1628- <i>upf1-C125S</i>	19	1	
U-1A-D1628- <i>upf1-K436E</i>	16	2	
U-1A-D1628- <i>upf1-D4</i> (R779C)	16	-	
U-1A-D1628- <i>upf1-RR793AA</i>	17	1	
U-1A-D1628- <i>upf1-WT</i>	12	-	
U-14-D1690- <i>upf1-C72S</i>	12	-	<i>SUP35</i>
U-14-D1690- <i>upf1-C84S</i>	5	-	
U-14-D1690- <i>upf1-C125S</i>	8	-	
U-14-D1690- <i>upf1-K436E</i>	10	1	
U-14-D1690- <i>upf1-D4</i> (R779C)	6	-	
U-14-D1690- <i>upf1-RR793AA</i>	11	-	
U-14-D1690- <i>upf1-WT</i>	13	-	



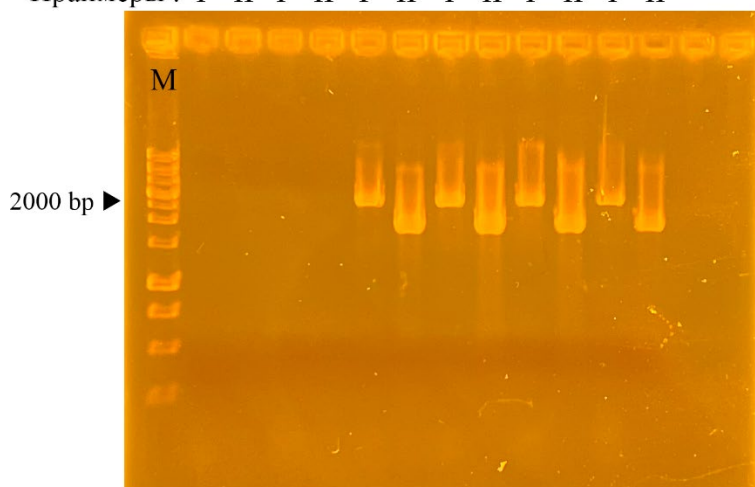


**Рисунок 25. Электрофореграмма продуктов ПЦР с геномной ДНК дрожжевых штаммов.**

Далее отбирали только трансформантов, у которых визуализировался ПЦР-продукт с гена *upf1-n*.

На следующем этапе мы секвенировали аллели гена *UPF1* для подтверждения мутаций на хромосоме отобранных штаммов. Для этого необходимо было получить ПЦР-продукт с хромосомной копии гена *upf1-n*. Поскольку ген *UPF1* большой (около 3 тыс. п.о.), получали по два ПЦР-продукта: с праймеров 201 и seq2485-R - 2600 п.о. и с праймеров 204 и seq1239-F - 1856 п.о. К сожалению, для двух отобранных ранее штаммов не было получено ПЦР-продуктов, вероятно, эти штаммы изначально были отобраны ошибочно (рис. 26).

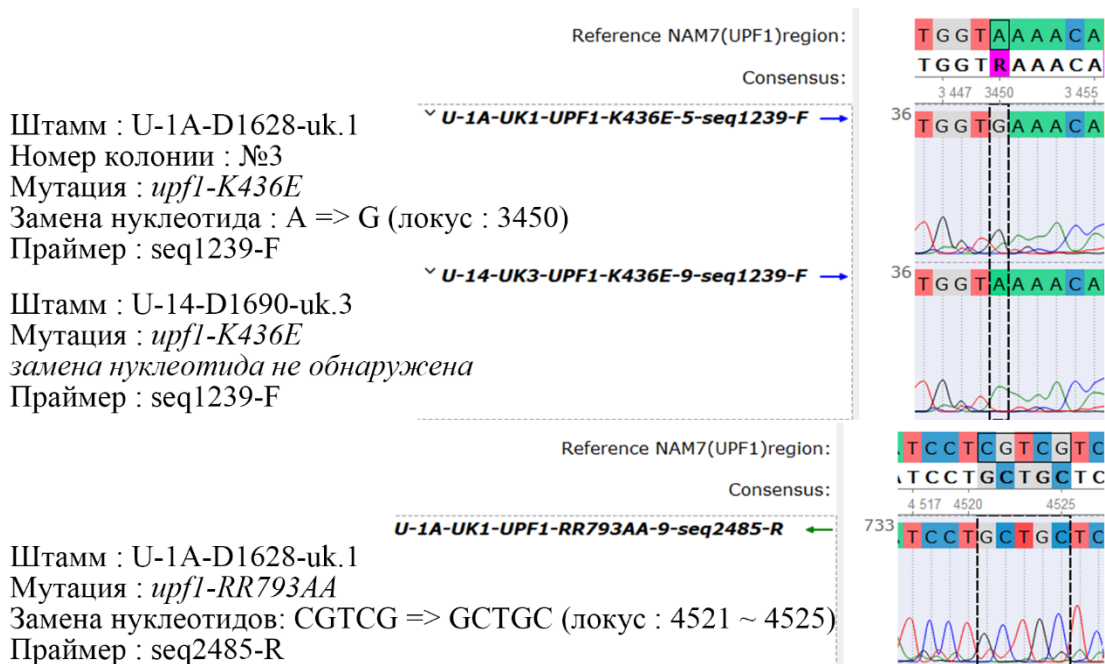
Штамм :	1A-uk.1				U-14				1A			
Мутация :	C125S		K436E		RR793 AA		K436E					
Номер колонии :			№1		№3							
Праймеры :	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II



1A : U-1A-D1628	Набор праймеров :
1A-uk.1: U-1A-D1628-uk.1	I : 201 + seq2485-R (2600 bp)
U-14: U-14-D1690-uk.3	II : 204 + seq1239-F (1856 bp)

**Рисунок 26.** Электрофореграмма продуктов ПЦР с геномной ДНК дрожжевых штаммов с праймерами 201, 204, seq2485-R, seq1239-F. Представлены ПЦР продуктов трансформантов и 1A, который был взят в качестве контроля. М – маркер.

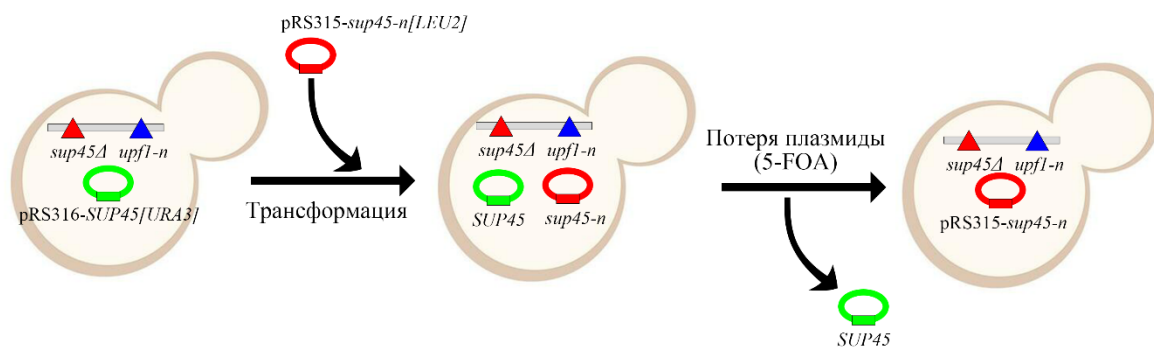
Анализ последовательностей секвенированных аллелей показал, что у штаммов U-1A-D1628-*upf1*-K436E №3 и U-1A-D1628-*upf1*-RR793AA присутствуют искомые точковые мутации по гену *UPF1* (рис. 27).



**Рисунок 27.** Результат анализа сиквенсов геномной ДНК у штаммов U-1A-D1628-*upf1-K436E* №3, U-14-D1690-*upf1-K436E* и U-1A-D1628-*upf1-RR793AA*. С помощью программы «Unipro UGENE» выявлены наличие точковых мутацией в гене *upf1* у двух штаммов - U-1A-D1628-*upf1-K436E* №3 и U-1A-D1628-*upf1-RR793AA*, и отсутствие точечной мутаций в гене *upf1* у штамма U-14-D1690-*upf1-K436E*.

### 5.5. Оценка жизнеспособности штаммов, содержащих точковые мутации по гену *UPF1* на фоне нонсенс-мутации *sup45-105*

На следующем этапе нами проведена трансформация для введения плазмиды pRS315-*sup45-105* и лейциновым маркером, при этом использованы штаммы, у которых выявлено наличие точечной мутации по гену *UPF1* путем секвенирования. Исходный штамм U-1A  $\Delta upf1$ , содержащий делецию гена *upf1* и штамм U-1A, содержащий ген *UPF1* дикого типа были использованы в качестве положительного контроля (рис. 28).



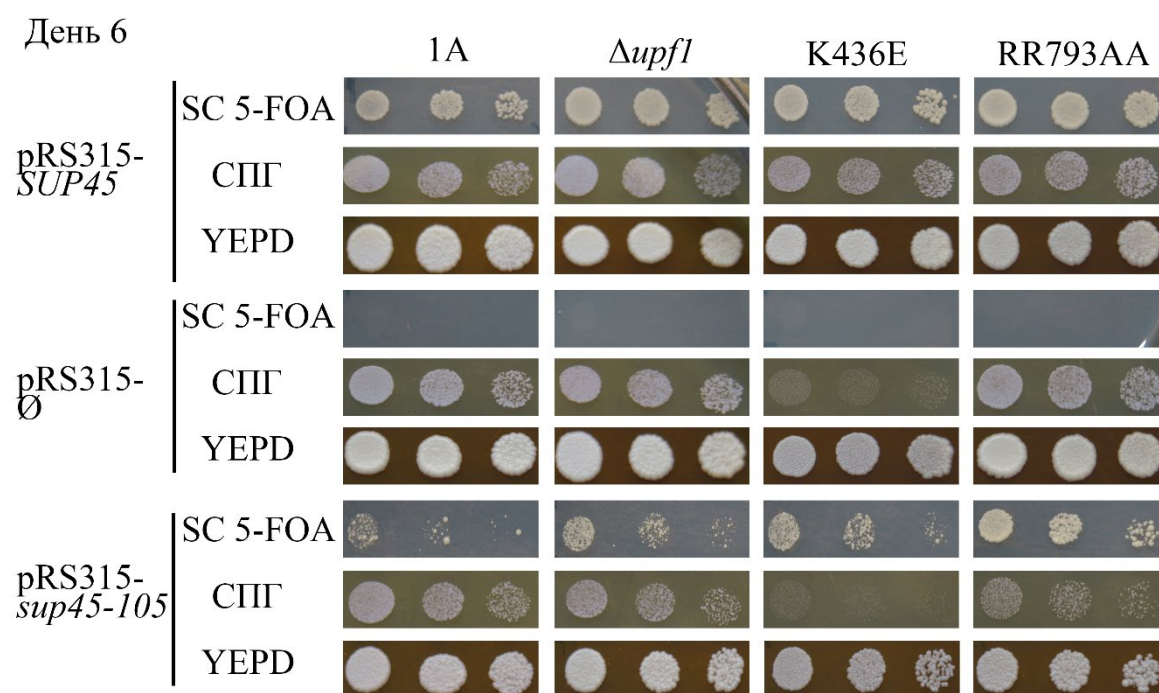
**Рисунок 28.** Схема шаффлинга плазмиды трансформантов, содержащих точечную мутацию в гене *upf1* с плазмидой, несущей нонсенс-мутацию по гену *sup45*.

Дополнительным контролем служил штамм, полученный с помощью CRISPR-Cas, содержащий ген *UPF1* без мутаций. Штамм был получен Ефремовой Е.А. и

нужен в качестве контроля работы системы CRISPR-Cas. В случае некорректной работы системы теоретически возможно возникновение мутаций в геноме дрожжей, приводящих к фенотипу сходному с фенотипом делеции гена *UPF1*.

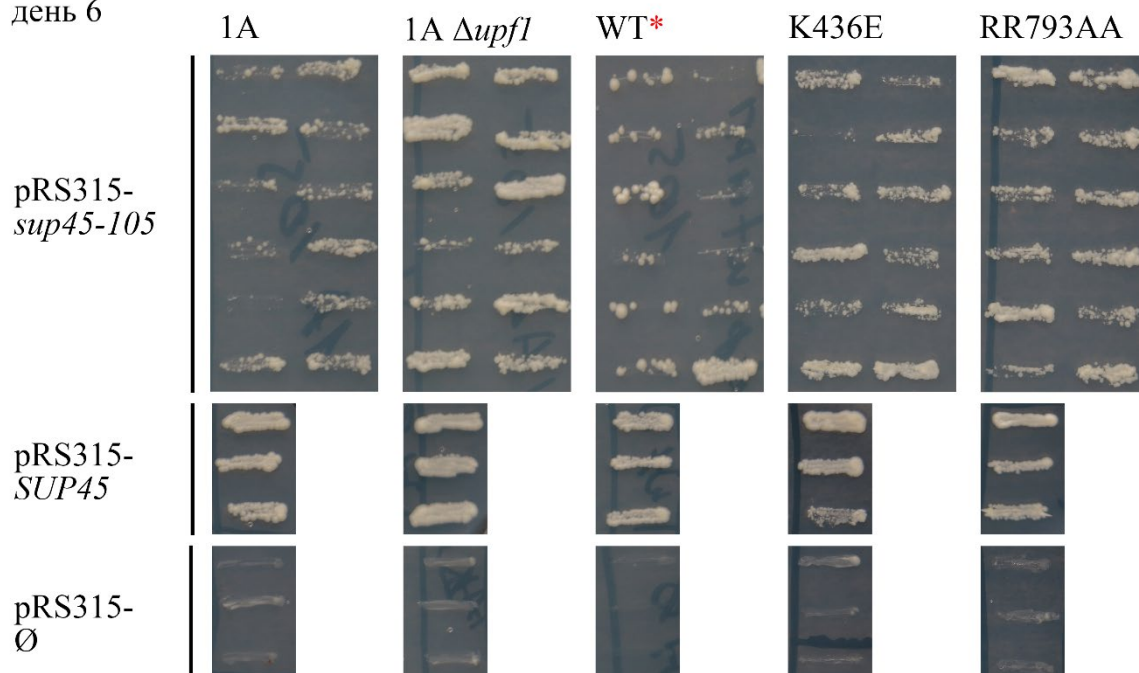
Полученные трансформанты были отсеяны сначала одновременно на среду SC - Leu -Ura, и на среду, содержащую SC 5-FOA для шаффлинга плазмид, содержащих ген *SUP45* дикого типа на мутантную версию гена.

Далее, чтобы четко наблюдать отличия по жизнеспособности трансформантов, мы проводили сравнение роста посевом штрихом и с использованием серии пятикратных разведений. Первый способ позволяет проанализировать большое количество трансформантов, однако мы не можем контролировать количество клеток, которое переносим на среду, содержащую 5-FOA. Второй метод позволяет выровнять суспензию клеток трансформантов по оптической плотности, но не дает возможности анализировать большое количество штаммов одновременно. Поэтому изначально трансформанты были посеяны методом штриха (рис. 29), а на следующем этапе один типичный трансформант был использован для посева методом 5-кратных разведений для более качественной оценки жизнеспособности (рис. 30). В итоге можно отметить, что штаммы, содержащие мутации, приводящие к аминокислотным заменам K436E и RR793AA на фоне мутации гена *sup45-105* по жизнеспособности, отличаются от штамма 1A (содержит ген *UPF1-WT*) и больше похожи на штамм, несущий делецию по этому гену. Из чего можно заключить важность геликазного и СН-доменов *Upf1* в изучаемом процессе.



**Рисунок 29.** Сравнение жизнеспособности штаммов, содержащих *UPF1-WT*,  $\Delta upf1$  либо *upf1-n* на фоне мутации *sup45-105*. Для оценки жизнеспособности использована среда 5-FOA. Посев выполнен с использованием серии пятикратных разведений.

SC 5-FOA \* - вставлен *UPF1* дикого типа с помощью системы CRISPR-Cas9  
день 6



**Рисунок 30.** Сравнение жизнеспособности штаммов, содержащих *UPF1-WT*,  $\Delta upf1$  либо *upf1-n* на фоне мутации *sup45-105* на среде 5-FOA. Посев выполнен физическим переносом колонии методом штриха.

## 6. Обсуждение

Терминация трансляции является финальным этапом биосинтеза белка. Несмотря на интенсивное изучение этого фундаментального процесса в течение последних десятилетий, остается еще очень много вопросов о регуляции этого процесса.

Нонсенс-супрессия позволяет клеткам выживать при наличии преждевременного стоп-кодона в открытой рамке считывания жизненно-важных генов. Такой является система, которую мы используем в нашей работе: штаммы, содержащие нонсенс-мутации в генах, кодирующих факторы терминации трансляции у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* (*SUP35* и *SUP45*), жизнеспособны, поскольку клетки синтезируют небольшое количество полноразмерных белков. Одновременно такого небольшого количества факторов терминации трансляции, очевидно, не достаточно для обеспечения точности трансляции и происходит нонсенс-супрессия в том числе и нонсенс-мутаций в генах *SUP35* и *SUP45*.

Однако нонсенс-супрессия не может обеспечить клетку большим количеством факторов терминации трансляции, поскольку в этом случае эффективность терминации трансляции возрастет и в свою очередь уменьшится количество полноразмерных функциональных факторов терминации трансляции. В такой ситуации жизнеспособность штаммов достаточно низкая. Штаммы, содержащие две плазмиды, с которых продуцируется как полноразмерный Sup35 и Sup45 (плазида содержит ген *SUP35* и *SUP45*), так и укороченный нефункциональный белок (плазида, содержащая *sup35-n* и *sup45-n*) плохо теряют плазмиду с *SUP35* и *SUP45*, и как следствие плохо выживают на среде с 5-FOA (Moskalenko *et al.* 2003).

Однако делеция гена *UPF1*, ключевого фактора системы NMD, повышает жизнеспособность таких штаммов (рис. 7) (Журавлева & Грызина 2012). Механизм этого явления в настоящее время неизвестен. Мы предполагаем два возможных механизма: один связан с функционированием белка Upf1, т.е. для повышения жизнеспособности необходимо нарушение функционирования NMD, тогда количество мРНК с нонсенс-мутацией будет возрастать, что повысит шанс нонсенс-супрессии за счет слабых естественных супрессорных тРНК. Другой возможный механизм связан со взаимодействием Upf1 с факторами терминации трансляции, при этом часть того небольшого количества функциональных факторов терминации трансляции, которое синтезируется в клетке, может образовывать комплексы с Upf1 и, таким образом, быть недоступным для терминации. В этом случае делеция *UPF1* тоже должна улучшать жизнеспособность штамма.

В связи с этим важным этапом данной работы является выяснение вопроса, какой именно участок белка Upf1 взаимодействует с факторами терминации трансляции. В нашей работе мы использовали дрожжевую двугибридную систему для обнаружения взаимодействий различных фрагментов Upf1 с Sup35 и Sup45. Однако несмотря на то, что в литературе показано взаимодействие факторов терминации трансляции с Upf1 (Czaplinski *et al.* 1998), нам не удалось выявить такое взаимодействие и подтвердить слабое взаимодействие участка Upf1<sub>1-555</sub> с Sup45, показанное в работе Журавлевой и Грызиной (Журавлева & Грызина 2012). Очевидно,

необходимо использовать другой метод, который позволит выявить такие белковые взаимодействия.

Далее мы проводили мутационный анализ гена *UPF1*. Для этой цели нами были выбраны хорошо описанные в литературе мутации, которые приводят к аминокислотным заменам в белке Upf1: C72S, C84S, C125S, K436E, RR793AA (Weng, Y *et al.* 1996; Son and Wickner. 2018), мутации затрагивают разные участки (домены) Upf1.

Мы планировали получение таких мутаций на двух штаммах 1A и U-14, чтобы иметь возможность оценивать жизнеспособность штаммов на фоне мутаций по генам *SUP35* и *SUP45*, однако удалось получить только две мутации, приводящие к аминокислотным заменам K436E и RR793AA у штамма 1A.

По нашим данным, обе мутации в гене *UPF1* приводят к повышению жизнеспособности штаммов на фоне мутации *sup45-105*, и следовательно, затрагивают важные функциональные центры. Обе мутации приводят к нарушению геликазной и АТФазной активности Upf1, при этом RR793AA дополнительно нарушает образование комплекса Upf1-мРНК (Weng *et al.*, 1996). Таким образом, пока сложно сказать, какой из механизмов повышения жизнеспособности реализуется (возможно, в какой-то мере оба).

## 7. Выводы

1. Показано повышение жизнеспособности мутантов *sup45-n* на фоне делеции гена *UPF1* по сравнению со штаммами, содержащими ген *UPF1* дикого типа.
2. С помощью двугибридной дрожжевой системы не удалось показать взаимодействие белковых фрагментов гена *UPF1* и белков Sup35 или Sup45.
3. Сконструированы плазмиды, содержащие ген *UPF1* с мутациями C72S, C84S, C125S, K436E, RR793AA. Получены дрожжевые штаммы U-1A-D1628-uk.1, содержащие мутации в хромосомной копии гена *UPF1*, приводящие к аминокислотным заменам K436E и RR793AA.
4. Показано, что полученные мутации, приводящие к аминокислотным заменам K436E и RR793AA повышают жизнеспособность штаммов, содержащих нонсенс-мутацию *sup45-105*.



## 8. Список литературы

1. А. Г. Матвеевко, А.С. Михайличенко, Г. А. Журавлева. Создание векторов для редактирования генома дрожжей-сахаромицетов на основе системы CRISPR-Cas9. 2024. Микробиология. Принята в печать.
2. Г. А. Журавлева & В.А. Грызина. (2012). Влияние генов Upf на проявление мутаций в гене Sup45. Молекулярная биология. 46. 285.
3. Alkalaeva, Elena Z., *et al.* "In vitro reconstitution of eukaryotic translation reveals cooperativity between release factors eRF1 and eRF3." *Cell* 125.6 (2006): 1125-1136.
4. Amrani, N., Ganesan, R., Kervestin, S., Mangus, D. A., Ghosh, S., & Jacobson, A. (2004). A faux 3'-UTR promotes aberrant termination and triggers nonsense-mediated mRNA decay. *Nature*, 432(7013), 112–118. <https://doi.org/10.1038/nature03060>
5. Atkin, A L *et al.* "Relationship between yeast polyribosomes and Upf proteins required for nonsense mRNA decay." *The Journal of biological chemistry* vol. 272,35 (1997): 22163-72. doi:10.1074/jbc.272.35.22163
6. Atkinson, Gemma C., Sandra L. Baldauf, and Vasili Hauryliuk. "Evolution of nonstop, no-go and nonsense-mediated mRNA decay and their termination factor-derived components." *BMC evolutionary biology* 8.1 (2008): 1-18.
7. Bertram G, Bell HA, Ritchie DW, Fullerton G, Stansfield I. Terminating eukaryote translation: domain 1 of release factor eRF1 functions in stop codon recognition. *RNA*. 2000 Sep;6(9):1236-47. doi: 10.1017/s1355838200000777. PMID: 10999601; PMCID: PMC1369997.
8. Boeke JD, Trueheart J, Natsoulis G, Fink GR. 5-Fluoroorotic acid as a selective agent in yeast molecular genetics. *Methods Enzymol.* 1987;154:164-75. doi: 10.1016/0076-6879(87)54076-9. PMID: 3323810.
9. Brogna S, McLeod T, Petric M. The Meaning of NMD: Translate or Perish. *Trends Genet.* 2016 Jul;32(7):395-407. doi: 10.1016/j.tig.2016.04.007. Epub 2016 May 14. PMID: 27185236.
10. Brogna, Saverio, and Jikai Wen. "Nonsense-mediated mRNA decay (NMD) mechanisms." *Nature structural & molecular biology* vol. 16,2 (2009): 107-13. doi:10.1038/nsmb.1550
11. Chabelskaya S, Gryzina V, Moskalenko S, Le Goff C, Zhouravleva G. Inactivation of NMD increases viability of sup45 nonsense mutants in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Mol Biol.* 2007;8:71. Published 2007 Aug 16. doi:10.1186/1471-2199-8-71
12. Chamieh, Hala *et al.* "NMD factors Upf2 and Upf3 bridge Upf1 to the exon junction complex and stimulate its RNA helicase activity." *Nature structural & molecular biology* vol. 15,1 (2008): 85-93. doi:10.1038/nsmb1330
13. Cheng, Zhihong, *et al.* "Structural insights into eRF3 and stop codon recognition by eRF1." *Genes & development* 23.9 (2009): 1106-1118.
14. Cosson, B., Couturier, A., Chabelskaya, S., Kiktev, D., Inge-Vechtomov, S., Philippe, M., & Zhouravleva, G. (2002). Poly(A)-binding protein acts in translation termination via eukaryotic release factor 3 interaction and does not influence [PSI(+)] propagation. *Molecular and cellular biology*, 22(10), 3301–3315. <https://doi.org/10.1128/MCB.22.10.3301-3315.2002>
15. Czaplinski K, Ruiz-Echevarria MJ, Paushkin SV, *et al.* The surveillance complex interacts with the translation release factors to enhance termination and degrade aberrant mRNAs. *Genes Dev.* 1998;12(11):1665-1677. doi:10.1101/gad.12.11.1665
16. D. Hatfield *et al.* "Suppression of termination codons in higher eukaryotes." *Trends in Biochemical Sciences*, 10 (1985): 201-204. [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(85\)90192-6](https://doi.org/10.1016/0968-0004(85)90192-6).

17. Daar, I., & Maquat, L. (1988). Premature translation termination mediates triosephosphate isomerase mRNA degradation. *Molecular and Cellular Biology*, 8, 802 - 813. <https://doi.org/10.1128/mcb.8.2.802-813.1988>.
18. des Georges, Amedee, *et al.* "Structure of the mammalian ribosomal pre-termination complex associated with eRF1• eRF3• GDPNP." *Nucleic acids research* 42.5 (2014): 3409-3418.
19. Doma MK, Parker R. RNA quality control in eukaryotes. *Cell*. 2007 Nov 16;131(4):660-8. doi: 10.1016/j.cell.2007.10.041. PMID: 18022361.
20. Franzmann TM, Jahnel M, Pozniakovskiy A, Mahamid J, Holehouse AS, Nüske E, Richter D, Baumeister W, Grill SW, Pappu RV, Hyman AA, Alberti S. Phase separation of a yeast prion protein promotes cellular fitness. *Science*. 2018 Jan 5;359(6371):eaao5654. doi: 10.1126/science.aao5654. PMID: 29301985.
21. Frolova LY, Tsivkovskii RY, Sivolobova GF, Oparina NY, Serpinsky OI, Blinov VM, Tatkov SI, Kisselev LL. Mutations in the highly conserved GGQ motif of class 1 polypeptide release factors abolish ability of human eRF1 to trigger peptidyl-tRNA hydrolysis. *RNA*. 1999 Aug;5(8):1014-20. doi: 10.1017/s135583829999043x. PMID: 10445876; PMCID: PMC1369825.
22. Frolova. L *et al.* "Eukaryotic polypeptide chain release factor eRF3 is an eRF1- and ribosome-dependent guanosine triphosphatase." *RNA (New York, N.Y.)* vol. 2,4 (1996): 334-41.
23. Frolova. L.; Le Goff, X.; Rasmussen, H.H.; Cheperegin, S.; Drugeon, G.; Kress, M.; Arman, I.; Haenni, A.L.; Celis, J.E.; Philippe, M. A highly conserved eukaryotic protein family possessing properties of polypeptide chain release factor. *Nature* 1994, 372, 701–703.
24. G. Drugeon *et al.* "Eukaryotic release factor 1 (eRF1) abolishes readthrough and competes with suppressor tRNAs at all three termination codons in messenger RNA.." *Nucleic acids research*, 25 12 (1997): 2254-8 . <https://doi.org/10.1093/NAR/25.12.2254>.
25. Garneau NL, Wilusz J, Wilusz CJ. The highways and byways of mRNA decay. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007 Feb;8(2):113-26. doi: 10.1038/nrm2104. PMID: 17245413.
26. Gehring, Niels H *et al.* "Y14 and hUpf3b form an NMD-activating complex." *Molecular cell* vol. 11,4 (2003): 939-49. doi:10.1016/s1097-2765(03)00142-4
27. Genomic Libraries and a Host Strain Designed for Highly Efficient Two-Hybrid Selection in Yeast. *Genetics*, 1996 Dec;144(4):1425-36. doi: 10.1093/genetics/144.4.1425
28. González, C I *et al.* "The yeast hnRNP-like protein Hrp1/Nab4 marks a transcript for nonsense-mediated mRNA decay." *Molecular cell* vol. 5,3 (2000): 489-99. doi:10.1016/s1097-2765(00)80443-8
29. Guo C, Ma X, Gao F, Guo Y. Off-target effects in CRISPR/Cas9 gene editing. *Front Bioeng Biotechnol*. 2023 Mar 9;11:1143157. doi: 10.3389/fbioe.2023.1143157. PMID: 36970624; PMCID: PMC10034092.
30. Hauryliuk, Vasili, *et al.* "Class-1 release factor eRF1 promotes GTP binding by class-2 release factor eRF3." *Biochimie* 88.7 (2006): 747-757.
31. He, F *et al.* "Upf1p, Nmd2p, and Upf3p are interacting components of the yeast nonsense-mediated mRNA decay pathway." *Molecular and cellular biology* vol. 17,3 (1997): 1580-94. doi:10.1128/MCB.17.3.1580
32. He, F., & Jacobson, A. (2015). Nonsense-Mediated mRNA Decay: Degradation of Defective Transcripts Is Only Part of the Story. *Annual review of genetics*, 49, 339–366. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-112414-054639>

33. Hellen, Christopher UT. "Translation termination and ribosome recycling in eukaryotes." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 10.10 (2018): a032656..
34. Hilleren, P., & Parker, R. (1999). mRNA surveillance in eukaryotes: kinetic proofreading of proper translation termination as assessed by mRNP domain organization?. *RNA* (New York, N.Y.), 5(6), 711–719. <https://doi.org/10.1017/s1355838299990519>
35. Hoshino S, Imai M, Kobayashi T, Uchida N, Katada T. The eukaryotic polypeptide chain releasing factor (eRF3/GSPT) carrying the translation termination signal to the 3'-Poly(A) tail of mRNA. Direct association of erf3/GSPT with polyadenylate-binding protein. *J Biol Chem.* 1999 Jun 11;274(24):16677-80. doi: 10.1074/jbc.274.24.16677. PMID: 10358005.
36. Huang, Lulu et al. "Targeting Translation Termination Machinery with Antisense Oligonucleotides for Diseases Caused by Nonsense Mutations." *Nucleic acid therapeutics* vol. 29,4 (2019): 175-186. doi:10.1089/nat.2019.0779
37. Huang, Y., & Zhang, L. (2016). An In Vitro Single-Primer Site-Directed Mutagenesis Method for Use in Biotechnology. *In Vitro Mutagenesis*, 375–383. doi:10.1007/978-1-4939-6472-7\_26
38. Ilya Serebriiskii, Erica A. Golemis, Two-Hybrid Protein–Protein Interactions, Editor(s): William J. Lennarz, M. Daniel Lane, Encyclopedia of Biological Chemistry, Elsevier, 2004, Pages 290-293, ISBN 9780124437104, <https://doi.org/10.1016/B0-12-443710-9/00694-3>.
39. Inge-Vechtomov, S.G.; Mironova, L.N.; Ter-Avanessian, M.D. Ambiguity of translation: an eukaryotic version? *Genetika* 1994, 30, 1022–1035.
40. Ivanov, Pavel V *et al.* "Interactions between Upf1, eRFs, PABP and the exon junction complex suggest an integrated model for mammalian NMD pathways." *The EMBO journal* vol. 27,5 (2008): 736-47. doi:10.1038/emboj.2008.17
41. Jeffrey H. Miller and A. Albertini. "Effects of surrounding sequence on the suppression of nonsense codons.." *Journal of molecular biology*, 164 1 (1983): 59-71 . [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(83\)90087-6](https://doi.org/10.1016/0022-2836(83)90087-6).
42. Kashima, Isao *et al.* "Binding of a novel SMG-1-Upf1-eRF1-eRF3 complex (SURF) to the exon junction complex triggers Upf1 phosphorylation and nonsense-mediated mRNA decay." *Genes & development* vol. 20,3 (2006): 355-67. doi:10.1101/gad.1389006
43. Kashima, Isao *et al.* "Binding of a novel SMG-1-Upf1-eRF1-eRF3 complex (SURF) to the exon junction complex triggers Upf1 phosphorylation and nonsense-mediated mRNA decay." *Genes & development* vol. 20,3 (2006): 355-67. doi:10.1101/gad.1389006
44. Kerényi, Zoltán *et al.* "Inter-kingdom conservation of mechanism of nonsense-mediated mRNA decay." *The EMBO journal* vol. 27,11 (2008): 1585-95. doi:10.1038/emboj.2008.88
45. Kim, Y. K., & Maquat, L. E. (2019). UPF1 front and center in RNA decay: UPF1 in nonsense-mediated mRNA decay and beyond. *RNA* (New York, N.Y.), 25(4), 407–422. <https://doi.org/10.1261/rna.070136.118>
46. Kong, Chunguang, *et al.* "Crystal structure and functional analysis of the eukaryotic class II release factor eRF3 from *S. pombe*." *Molecular cell* 14.2 (2004): 233-245.
47. Kozlov G, Gehring K (2010) Molecular Basis of eRF3 Recognition by the MLLD Domain of Poly(A)-Binding Protein. *PLoS ONE* 5(4): e10169. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010169>

48. Le Hir, H *et al.* "The exon-exon junction complex provides a binding platform for factors involved in mRNA export and nonsense-mediated mRNA decay." *The EMBO journal* vol. 20,17 (2001): 4987-97. doi:10.1093/emboj/20.17.4987
49. Le Hir, H *et al.* "The spliceosome deposits multiple proteins 20-24 nucleotides upstream of mRNA exon-exon junctions." *The EMBO journal* vol. 19,24 (2000): 6860-9. doi:10.1093/emboj/19.24.6860
50. Leeds, P *et al.* "Gene products that promote mRNA turnover in *Saccharomyces cerevisiae*." *Molecular and cellular biology* vol. 12,5 (1992): 2165-77. doi:10.1128/mcb.12.5.2165-2177.1992
51. Liebman, Susan W, and Yury O Chernoff. "Prions in yeast." *Genetics* vol. 191,4 (2012): 1041-72. doi:10.1534/genetics.111.137760
52. Liu, Jiang *et al.* "Identification of a nonsense mutation in TNNI3K associated with cardiac conduction disease." *Journal of clinical laboratory analysis* vol. 34,9 (2020): e23418. doi:10.1002/jcla.23418
53. López-Perrote, Andrés *et al.* "Human nonsense-mediated mRNA decay factor UPF2 interacts directly with eRF3 and the SURF complex." *Nucleic acids research* vol. 44,4 (2016): 1909-23. doi:10.1093/nar/gkv1527
54. M. Mort *et al.* "A meta-analysis of nonsense mutations causing human genetic disease." *Human Mutation*, 29 (2008). <https://doi.org/10.1002/humu.20763>.
55. Maderazo, A B *et al.* "Upf1 control of nonsense mRNA translation is regulated by Nmd2p and Upf3p." *Molecular and cellular biology* vol. 20,13 (2000): 4591-603. doi:10.1128/MCB.20.13.4591-4603.2000
56. Maksiutenko EM, Barbitoff YA, Matveenko AG, Moskalenko, S.E. , Zhouravleva GA. Gene Amplification as a Mechanism of Yeast Adaptation to Nonsense Mutations in Release Factor Genes. *Genes (Basel)*. 2021 Dec 19;12(12):2019.
57. Mantsyzov AB, Ivanova EV, Birdsall B, Alkalaeva EZ, Kryuchkova PN, Kelly G, Frolova LY, Polshakov VI. NMR solution structure and function of the C-terminal domain of eukaryotic class 1 polypeptide chain release factor. *FEBS J*. 2010 Jun;277(12):2611-27. doi: 10.1111/j.1742-464X.2010.07672.x. PMID: 20553496; PMCID: PMC2909394.
58. Mitkevich, Vladimir A., *et al.* "Termination of translation in eukaryotes is mediated by the quaternary eRF1• eRF3• GTP• Mg<sup>2+</sup> complex. The biological roles of eRF3 and prokaryotic RF3 are profoundly distinct." *Nucleic acids research* 34.14 (2006): 3947-3954.
59. Mort M, Ivanov D, Cooper DN, Chuzhanova NA. A meta-analysis of nonsense mutations causing human genetic disease. *Hum Mutat*. 2008 Aug;29(8):1037-47. doi: 10.1002/humu.20763. PMID: 18454449.
60. Moskalenko, S.E., Chabelskaya SV, Inge-Vechtomov SG, Philippe M, Zhouravleva GA. Viable nonsense mutants for the essential gene Sup45 of *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Mol Biol*. 2003 Feb 10; 4:2.
61. Nagel-Wolfrum, Kerstin *et al.* "Targeting Nonsense Mutations in Diseases with Translational Read-Through-Inducing Drugs (TRIDs)." *BioDrugs : clinical immunotherapeutics, biopharmaceuticals and gene therapy* vol. 30,2 (2016): 49-74. doi:10.1007/s40259-016-0157-6
62. Neu-Yilik G, Raimondeau E, Eliseev B, Yeramala L, Amthor B, Deniaud A, Huard K, Kerschgens K, Hentze MW, Schaffitzel C, Kulozik AE. Dual function of Upf3B in early and late translation termination. *EMBO J*. 2017 Oct 16;36(20):2968-2986. doi: 10.15252/embj.201797079. Epub 2017 Sep 12. PMID: 28899899; PMCID: PMC5641913.

63. Pisareva, Vera P., *et al.* "Kinetic analysis of interaction of eukaryotic release factor 3 with guanine nucleotides." *Journal of Biological Chemistry* 281.52 (2006): 40224-40235
64. Preis, Anne, *et al.* "Cryoelectron microscopic structures of eukaryotic translation termination complexes containing eRF1-eRF3 or eRF1-ABCE1." *Cell reports* 8.1 (2014): 59-65.
65. Ruiz-Echevarría, M J *et al.* "Identifying the right stop: determining how the surveillance complex recognizes and degrades an aberrant mRNA." *The EMBO journal* vol. 17,2 (1998): 575-89. doi:10.1093/emboj/17.2.575
66. S. Hirawat *et al.* "Safety, Tolerability, and Pharmacokinetics of PTC124, a Nonaminoglycoside Nonsense Mutation Suppressor, Following Single- and Multiple-Dose Administration to Healthy Male and Female Adult Volunteers." *The Journal of Clinical Pharmacology*, 47 (2007). <https://doi.org/10.1177/0091270006297140>.
67. Schmid M, Jensen TH. The exosome: a multipurpose RNA-decay machine. *Trends Biochem Sci.* 2008 Oct;33(10):501-10. doi: 10.1016/j.tibs.2008.07.003. Epub 2008 Sep 9. PMID: 18786828.
68. Shao, Sichen, *et al.* "Decoding mammalian ribosome-mRNA states by translational GTPase complexes." *Cell* 167.5 (2016): 1229-1240.
69. Son M, Wickner RB. Antiprion systems in yeast cooperate to cure or prevent the generation of nearly all [PSI<sup>+</sup>] and [URE3] prions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2022 Jul 12;119(28):e2205500119.
70. Son M, Wickner RB. Nonsense-mediated mRNA decay factors cure most [PSI<sup>+</sup>] prion variants. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2018 Feb 6;115(6):E1184-E1193. doi: 10.1073/pnas.1717495115. Epub 2018 Jan 22. PMID: 29358398; PMCID: PMC5819436.
71. Song H, Mugnier P, Das AK, Webb HM, Evans DR, Tuite MF, Hemmings BA, Barford D. The crystal structure of human eukaryotic release factor eRF1--mechanism of stop codon recognition and peptidyl-tRNA hydrolysis. *Cell.* 2000 Feb 4;100(3):311-21. doi: 10.1016/s0092-8674(00)80667-4. PMID: 10676813.
72. Staszewski, Jacek *et al.* "Upf1-From mRNA Degradation to Human Disorders." *Cells* vol. 12,3 419. 27 Jan. 2023, doi:10.3390/cells12030419
73. T. Kłopotowski *et al.* "Synergism of aminotriazole and phosphate on the inhibition of yeast imidazole glycerol phosphate dehydratase.." *Archives of biochemistry and biophysics*, 112 3 (1965): 562-6 . [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(65\)90096-2](https://doi.org/10.1016/0003-9861(65)90096-2).
74. Tate, W. P., & Mannering, S. A. (1996). Three, four or more: the translational stop signal at length. *Molecular microbiology*, 21(2), 213–219. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1996.6391352.x>
75. Trubitsina NP, Zemlyanko OM, Bondarev SA, Zhouravleva GA. Nonsense Mutations in the Yeast Sup35 Gene Affect the [PSI<sup>+</sup>] Prion Propagation. *Int J Mol Sci.* 2020 Feb 28;21(5):1648.
76. Trubitsina, N., Zemlyanko, O., Moskalenko, S., & Zhouravleva, G. (2019). From past to future: suppressor mutations in yeast genes encoding translation termination factors. *Biological Communications*, 64(2), 89–109. <https://doi.org/10.21638/spbu03.2019.202>
77. Van Den Elzen, Antonia MG, *et al.* "Dissection of Dom34–Hbs1 reveals independent functions in two RNA quality control pathways." *Nature structural & molecular biology* 17.12 (2010): 1446-1452.
78. Wang W, Czaplinski K, Rao Y, Peltz SW. The role of Upf proteins in modulating the translation read-through of nonsense-containing transcripts. *EMBO J.* 2001 Feb 15;20(4):880-90. doi: 10.1093/emboj/20.4.880. PMID: 11179232; PMCID: PMC145432.



79. Welch, Ellen M et al. "PTC124 targets genetic disorders caused by nonsense mutations." *Nature* vol. 447,7140 (2007): 87-91. doi:10.1038/nature05756
80. Wen, J., & Brogna, S. (2010). Splicing-dependent NMD does not require the EJC in *Schizosaccharomyces pombe*. *The EMBO journal*, 29(9), 1537–1551. <https://doi.org/10.1038/emboj.2010.48>
81. Weng Y, Czaplinski K, Peltz SW. Genetic and biochemical characterization of mutations in the ATPase and helicase regions of the Upf1 protein. *Mol Cell Biol*. 1996;16(10):5477-5490. doi:10.1128/MCB.16.10.5477
82. Weng Y, Czaplinski K, Peltz SW. Identification and characterization of mutations in the Upf1 gene that affect nonsense suppression and the formation of the Upf protein complex but not mRNA turnover. *Mol Cell Biol*. 1996 Oct;16(10):5491-506. doi: 10.1128/MCB.16.10.5491. PMID: 8816462; PMCID: PMC231549.
83. Wittkopp, Nadine *et al*. "Nonsense-mediated mRNA decay effectors are essential for zebrafish embryonic development and survival." *Molecular and cellular biology* vol. 29,13 (2009): 3517-28. doi:10.1128/MCB.00177-09
84. Wolf J, Passmore LA. mRNA deadenylation by Pan2-Pan3. *Biochem Soc Trans*. 2014 Feb;42(1):184-7. doi: 10.1042/BST20130211. PMID: 24450649; PMCID: PMC3992365.
85. Xu, S *et al*. "The assembly of amyloidogenic yeast sup35 as assessed by scanning (atomic) force microscopy: an analogy to linear colloidal aggregation?." *Biophysical journal* vol. 81,1 (2001): 446-54. doi:10.1016/S0006-3495(01)75712-8
86. Zhang, Ying, and Matthew S Sachs. "Control of mRNA Stability in Fungi by NMD, EJC and CBC Factors Through 3'UTR Introns." *Genetics* vol. 200,4 (2015): 1133-48. doi:10.1534/genetics.115.176743
87. Zhouravleva GA, Bondarev SA, Zemlyanko OM, Moskalenko SE. [Role of Proteins Interacting with the eRF1 and eRF3 Release Factors in the Regulation of Translation and Prionization]. *Mol Biol (Mosk)*. 2022 Mar-Apr;56(2):206-226. Russian. doi: 10.31857/S002689842201013X. PMID: 35403616.

## 9. Благодарности

Автор выражает самую глубокую благодарность научному руководителю Татьяне Михайловне Рогозе за объяснение темы, понимание, терпение, полезные советы и критики, и исправление при оформлении данной работы. Без нее помощи данная работа вряд ли создалась бы.

Автор рад поблагодарить Андрея Георгиевича Матвеевко за ценные советы и знания, касающихся системы CRISPR-Cas9 и помощь при оформлении данной работы.

Хочу отдельно выражать благодарность Нине Павловне Трубицине и Светлане Евгеньевне Москаленко за ценное знание по нуклеотидному контексту и супрессорной тРНК.

Автор признателен Ольге Михайловне Землянко за методические советы, практическое занятие по генетике микроорганизмов.

Хочу поблагодарить Елене Павловне Ефремове за трансформантов 1A-*UPF1-WT*, который нами использован в качестве дополнительного контроля.

Автор благодарен Анастасии Сергеевне Михайличенко и Нине Павловне Трубицине за совет по структуре ВКР.

Благодарю Галину Анатольевну Журавлеву за возможность исследовать на кафедре генетики и биотехнологии СПбГУ и, особенно, работать с системой CRISPR-Cas9.

Хочется также поблагодарить Бондарева Станислава Александровича за ценные курсы по математическим и современным методам генетики, которые, безусловно, будут пригодиться моему учебному пути.

Автор отдельно благодарен бывшему рецензенту Сергею Павловичу Задорскому за глубокий отзыв, поддерживающее слово и исправление отчета, с которого сформулирована данная работа.