

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОФЛУОРИМЕТРИИ ДЛЯ ОЦЕНКИ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ МУТАНТОВ ПО ФАКТОРАМ ТЕРМИНАЦИИ ТРАНСЛЯЦИИ ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

© 2024 г. Е. П. Ефремова^а, О. М. Землянко^{а, б}, Г. А. Журавлева^{а, б, *}

^аСанкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, 199034, Россия

^бЛаборатория амилоидов СПбГУ, Санкт-Петербург, 199034, Россия

*e-mail: g.zhuravleva@spbu.ru

Поступила в редакцию 09.10.2023 г.

После доработки 08.11.2023 г.

Принята к публикации 09.11.2023 г.

Нонсенс-мутации в жизненно важных генах *SUP45* и *SUP35*, кодирующих факторы терминации трансляции, влияют на жизнеспособность клеток *Saccharomyces cerevisiae*. С помощью метода проточной цитофлуориметрии мы показали, что жизнеспособность мутантов по сравнению со штаммами дикого типа снижается в 3.5–4 раза. Кроме того, мы обнаружили повышенную чувствительность мутантных клеток к ультразвуковому воздействию.

Ключевые слова: *SUP45*, *SUP35*, нонсенс-мутации, проточная цитофлуориметрия, жизнеспособность, *Saccharomyces cerevisiae*

DOI: 10.31857/S0026365624020268

Процесс терминации трансляции в клетках эукариот обеспечивается совместной работой факторов терминации трансляции eRF1 и eRF3 (Zhuravleva et al., 1995) при участии ряда других белков (Журавлева и соавт., 2022). Белок eRF1 отвечает за распознавание стоп-кодона, а фактор eRF3 является ГТФазой, активирующей работу eRF1. У дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* белки eRF1 и eRF3 кодируются жизненно важными генами *SUP45* и *SUP35*, соответственно (Inge-Vechtomov et al., 2003). Однако ранее удалось получить коллекцию нелетальных нонсенс-мутантов по этим генам (Moskalenko et al., 2003; Chabelskaya et al., 2004). Мутации в генах *SUP45* и *SUP35* не только снижают точность терминации трансляции, но и приводят к плеiotропным эффектам. Такие мутанты характеризуются пониженной жизнеспособностью, чувствительностью к повышенной или пониженной температуре, чувствительностью к аминогликозидным антибиотикам и повышенному осмотическому давлению, а также снижением функциональной активности митохондрий, нарушением клеточного цикла и морфологии клеток (Inge-Vechtomov et al., 2003). Несмотря на подробное описание коллекций мутантов, количественная оценка жизнеспособности нонсенс-мутантов *sup45* и *sup35* еще не проводилась. Традиционно методы оценки жизнеспособности микроорганизмов подразделяются

на две группы. К первой группе относятся методы “чашечного подсчета”, основанные на способности клеток расти и размножаться в определенных контролируемых условиях. Одним из наиболее часто используемых методов данной группы является определение количества колониеобразующих единиц (КОЕ) в образце. Однако, несмотря на простоту использования и низкую стоимость, существенными недостатками этих методов являются трудоемкость и длительное время получения результата. Ко второй группе относятся методы микроскопии с использованием колориметрических или флуоресцентных красителей. Выделяют ДНК-связывающие флуоресцентные красители — пропидий йодид (PI) или этидий бромид; а также колориметрические — трипановый синий или эритрозин В. Красители данного класса не способны проникать через неповрежденную мембрану живых клеток и окрашивают только мертвые или поврежденные клетки. Кроме того, есть группа красителей, способных проникать как в живые, так и в мертвые клетки. Механизм действия данных красителей основан на свойствах клеточной мембраны. Живые клетки способны выкачивать краситель в окружающую среду (флуоресцентный краситель — флоксин В) или восстанавливать его до бесцветного состояния под действием ферментов (колориметрический краситель — метиленовый синий).

Таким образом, живые клетки остаются бесцветными, тогда как мертвые — окрашиваются в красный (флоксин В) или синий (метиленовый синий) цвет (Kwolek-Mirek, Zadrag-Tecza, 2014). Однако детекция окрашенных клеток с помощью микроскопии — это трудоемкий и длительный процесс, который заключается в визуальной и, порой, субъективной оценке жизнеспособных и мертвых клеток (Davey, Guyot, 2020; Alexandrov et al., 2021).

Альтернативным подходом для определения жизнеспособности клеток является современный и высокочувствительный метод проточной цитофлуориметрии, который получил широкое распространение, как в клинической диагностике, в промышленности, так и в научных исследованиях (Davey, Guyot, 2020). Данный метод основан на детекции параметров светорассеяния и флуоресценции отдельной клетки, когда она проходит сквозь луч лазера в проточном цитофлуориметре. Современные проточные цитофлуориметры, наряду с огромным разнообразием флуоресцентных красителей и антител, позволяют быстро и с высокой эффективностью анализировать различные характеристики клеток внутри гетерогенной популяции (морфология клеток, количество ДНК, клеточные маркеры, количество жизнеспособных и мертвых клеток). Традиционно для оценки жизнеспособности клеточной популяции суспензию клеток окрашивают ДНК-специфичными флуоресцентными красителями (например, PI) и проводят детекцию на проточном цитофлуориметре.

В настоящем исследовании мы впервые провели количественную оценку жизнеспособности мутантов по генам *SUP45* и *SUP35* по сравнению со штаммами дикого типа с помощью метода проточной цитофлуориметрии.

В работе использовали штаммы дрожжей *S. cerevisiae* U-1A-D1628 (*MAT α ade1-14 trp1-289 his3 lys2 ura3-52 leu2-3,112 SUP45::HIS3MX [pRS315-SUP45]*) (Moskalenko et al., 2003) и U14-D1690 (*MAT α ade1-14 trp1-289 his3 lys2 ura3-52 leu2-3,112 SUP35::HIS3MX [pRSU2-SUP35]*) (Maksiutenko et al., 2021). Оба штамма являются производными штамма 1A-D1628, показано, что штамм U-1A-D1628 содержит транслокации, затрагивающие гены *FLO*, и не способен к инвазивному росту (Barbitoff et al., 2021). Для получения штаммов, несущих мутантные аллели, использовали центромерные плазмиды серии pRS315 с *SUP45* или *sup45-105* (Moskalenko et al., 2003), а также серию плазмид pRSU1, несущих аллель *SUP35* (Volkov et al., 2002) или *sup35-218* (Chabelskaya et al., 2004). Штаммы выращивали при температуре 26°C с использованием стандартных сред (Kaiser et al., 1994). Трансформацию дрожжей проводили согласно методике (Gietz, 1995).

Выделение плазмид проводили с использованием штамма *Escherichia coli* DH5 α (*supE44 Δ lacU169*

(*ϕ 80 lacZ Δ M15) *hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1*) по стандартной методике (Sambrook et al., 1989).*

Окрашивание клеток дрожжей PI проводили по следующей методике: штаммы выращивали в жидкой полной (YEPD) среде до OD = 0.2; промывали клетки буфером PBS (“Sigma”, Германия), ресуспендировали в PBS с добавлением PI (“Sigma”, Германия) и РНКазы А (“Merck”, Германия) до конечной концентрации 4 и 10 мкг/мл, соответственно; инкубировали в течение 30 мин при 26°C в темноте при перемешивании; промывали и ресуспендировали в PBS буфере; обработку клеточной суспензии ультразвуком проводили во льду на соникаторе Sonopuls HD2070 (“Bandelin”, Германия) при мощности 40%.

Измерение флуоресценции проводили на проточном цитофлуориметре CytoFlex S (“Beckman Coulter”, США) на канале детекции FL3 (610/20 нм), анализировали по 50 тыс. клеток. Обработку данных выполняли в программе FlowJo10 (“BD Biosciences”, США). Для статистической обработки данных использовали Rstudio (RStudio Team, 2020).

Нонсенс-мутации в генах *SUP45* и *SUP35* приводят к снижению жизнеспособности. Для количественной оценки влияния мутаций на жизнеспособность мы сравнили интенсивность флуоресценции клеток дикого типа с мутантными клетками с помощью проточной цитофлуориметрии. В связи с тем, что используемые нами штаммы характеризуются повышенным уровнем “слипания” клеток, была проведена серия экспериментов с различными режимами соникации для оптимизации условий пробоподготовки. Так, двукратная обработка клеток ультразвуком в течение 10 с позволила получить максимальную популяцию одиночных клеток. В результате экспериментов по подбору оптимальных условий соникации мы выявили повышенную чувствительность мутантных клеток к ультразвуковой обработке по сравнению со штаммами дикого типа. Оказалось, что даже при подобранном нами шадящем режиме обработки ультразвуком, не менее 40% популяции мутантных клеток по параметрам прямого и бокового светорассеяния попадали в область клеточного дебриса, т.е. в область, близкую к нулевым значениям (левая нижняя область на графике прямого и бокового светорассеяния). Одновременно мутантные клетки характеризовались большим количеством дуплетов и кластеров клеток, которые также исключались из анализа. В связи с этим для дальнейшей оценки и статистической обработки данных были взяты только 56–58% одиночных клеток из всех популяций мутантов, в то время как у дикого типа этот показатель составил 81–83% (табл. 1).

В результате настоящего исследования мы выявили значимые различия размеров субпопуляций окрашенных, т.е. мертвых, клеток у штаммов

Таблица 1. Сравнение размера популяций одиночных и PI-позитивных клеток у дикого типа и у мутантов по генам *SUP45* и *SUP35*

Вариант	Популяция одиночных клеток, %	Популяция PI-позитивных клеток, %
<i>SUP45</i> (контроль)	81.37 ± 1.656	5.75 ± 0.597
<i>sup45-105</i>	56.03 ± 3.202	24.41 ± 3.289
<i>SUP35</i> (контроль)	83.86 ± 1.929	6.12 ± 1.019
<i>sup35-218</i>	56.4 ± 2.80	22.17 ± 0.665

Примечание. Для каждого варианта представлены средние значения со стандартными отклонениями для 6 клонов. Данные соответствуют нормальному распределению (тест Шапиро-Уилка), сравнение средних значений двух независимых выборок проведено с помощью t-критерия Стьюдента; p-уровень значимости указан для доли PI-позитивных клеток: p-value = 3.514×10^{-6} и p-value = 5.497×10^{-12} для *SUP45* и *SUP35*, соответственно.

дикого типа по сравнению с мутантом *sup45* или *sup35*, соответственно (рис. 1).

На наш взгляд, чувствительность мутантов к воздействию ультразвука дополняет уже описанные многочисленные плейотропные эффекты у мутантов *sup45* и *sup35*: чувствительность к повышенной температуре, осмочувствительность, нарушение почкования, изменения цитоскелета и пр.

(Valouev et al., 2002; Inge-Vechtomov et al., 2003; Moskalenko et al., 2003; Chabelskaya et al., 2004). Кроме того, описана измененная и специфическая морфология мутантных клеток (Merritt et al., 2010), что также неоднократно наблюдалось и в исследованиях нашей лаборатории. Вероятно, мутации в генах *SUP45* и *SUP35* оказывают влияние на цитоскелет, морфологию клеток и клеточную стенку, что и приводит к чувствительности мутантных клеток к ультразвуковому воздействию.

Таким образом, в настоящем исследовании мы провели количественную оценку жизнеспособности штаммов *S. cerevisiae*, несущих мутации по генам *SUP45* и *SUP35*. Метод проточной цитофлуориметрии позволяет эффективно разделить популяции живых и мертвых клеток дрожжей, а при использовании дополнительных красителей может помочь провести более детальные исследования для выявления различных субпопуляций клеток. Важно заметить, что, несмотря на широкое использование проточной цитофлуориметрии в разных областях, работ по применению данного метода для анализа дрожжей не так много. В ходе настоящего исследования основная сложность заключалась в оптимизации условий пробоподготовки. На основании полученных нами данных, описанную

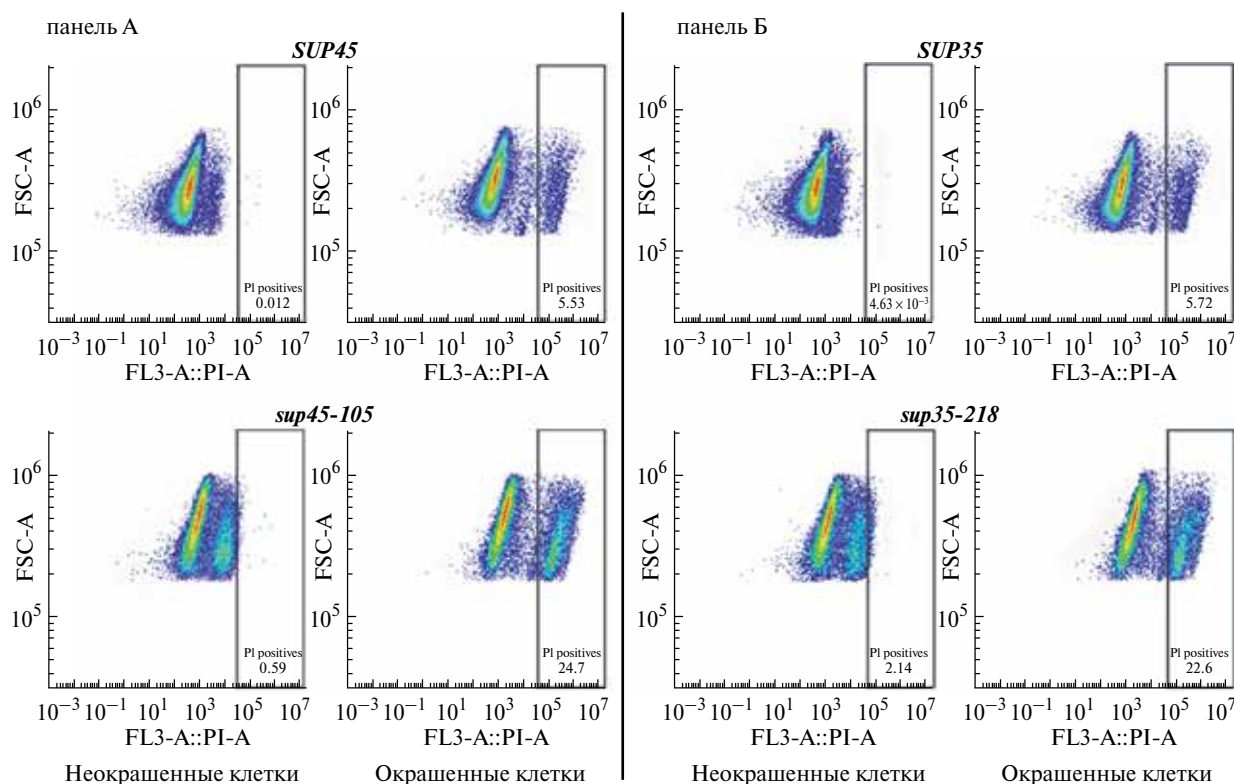


Рис. 1. Мутации в генах *SUP45* и *SUP35* приводят к снижению жизнеспособности. Представлены данные проточной цитофлуориметрии (популяции одиночных клеток) для клонов, несущих аллели *SUP45* (панель А) или *SUP35* (панель Б). FSC-A — параметр прямого светорассеяния по площади. FL3-A::PI-A — флуоресцентный канал детекции (610/20 нм), регистрирующий интенсивность флуоресцентного сигнала (в данном случае — пропидий йодида) по площади.

методику можно адаптировать для работы с другими штаммами дрожжей.

БЛАГОДАРНОСТИ

Данное исследование было выполнено на базе Ресурсного центра “Молекулярные и клеточные технологии” СПбГУ. Статья посвящается 300-летию СПбГУ.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Проект выполнен при финансовой поддержке гранта РНФ № 23-14-00063.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит результатов исследований, в которых в качестве объектов использовались люди или животные.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Журавлева Г.А., Бондарев С.А., Земляноко О.М., Москаленко С.Е.* Роль белков, взаимодействующих с факторами терминации трансляции eRF1 и eRF3, в регуляции трансляции и прионизации // Мол. биология. 2022. Т. 56. С. 206–226.
<https://doi.org/10.31857/S002689842201013X>
- Alexandrov A., Grosfeld E., Mitkevich O., Bidyuk V., Nostayeva A., Kukhovich I., Schneider R., et al.* Systematic identification of yeast mutants with increased rates of cell death reveals rapid stochastic necrosis associated with cell division // bioRxiv. 2021.
<https://doi.org/10.1101/2021.10.20.465133>
- Barbitoff Y., Matveenko A., Matiiv A., Maksiutenko E., Moskalenko S., Drozdova P., Poley D., Beliavskaia A., Danilov L., Predeus A., Zhouravleva G.* Chromosome-level genome assembly and structural variant analysis of two laboratory yeast strains from the Peterhof Genetic Collection lineage // G3: Genes, Genomes, Genetics (Bethesda). 2021. V. 11.
<https://doi.org/10.1093/g3journal/jkab029>
- Chabelskaya S., Kiktev D., Inge-Vechtomo S., Philippe M., Zhouravleva G.* Nonsense mutations in the essential gene *SUP35* of *Saccharomyces cerevisiae* are non-lethal // Mol. Genet. Genoms. 2004. V. 272. P. 297–307.
<https://doi.org/10.1007/s00438-004-1053-1>
- Davey H., Guyot S.* Estimation of microbial viability using flow cytometry // Curr. Protoc. Cytom. 2020. V. 93. Art. e72.
<https://doi.org/10.1002/cpsy.72>
- Gietz R., Schiestl R., Willems A., Woods R.* Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure // Yeast. 1995. V. 11. P. 355–360.
<https://doi.org/10.1002/yea.320110408>
- Inge-Vechtomo S., Zhouravleva G., Philippe M.* Eukaryotic release factors (eRFs) history // Biol. Cell. 2003. V. 95. P. 195–209.
[https://doi.org/10.1016/s0248-4900\(03\)00035-2](https://doi.org/10.1016/s0248-4900(03)00035-2)
- Kaiser C., Michaelis S., Mitchell A.* Spring Harbor laboratory course manual. NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1994. 234 p.
- Kwolek-Mirek M., Zadrag-Teczka R.* Comparison of methods used for assessing the viability and vitality of yeast cells // FEMS Yeast Res. 2014. V. 14. P. 1068–1079.
<https://doi.org/10.1111/1567-1364.12202>
- Maksiutenko E., Barbitoff Y., Matveenko A., Moskalenko S., Zhouravleva G.* Gene amplification as a mechanism of yeast adaptation to nonsense mutations in release factor genes // Genes (Basel). 2021. V. 12. Art. 2019.
<https://doi.org/10.3390/genes12122019>
- Merritt G., Naemi W., Mugnier P., Webb H., Tuite M., von der Haar T.* Decoding accuracy in eRF1 mutants and its correlation with pleiotropic quantitative traits in yeast // Nucl. Acids Res. 2010. V. 38. P. 5479–5492.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkq338>
- Moskalenko S., Chabelskaya S., Philippe M., Inge-Vechtomo S., Zhouravleva G.* Viable nonsense mutants for the essential gene *SUP45* of *Saccharomyces cerevisiae* // BMC Mol. Biol. 2003. V. 4.
<https://doi.org/10.1186/1471-2199-4-2>
- RStudio Team (2020). RStudio: Integrated Development for R. RStudio, PBC, Boston, MA.
 URL: <http://www.rstudio.com/>
- Sambrook J., Fritsch E., Maniatis T.* Molecular cloning: a laboratory manual // 2nd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 1659 p.
- Valouev I., Kushnirov V., Ter-Avanesyan M.* Yeast polypeptide chain release factors eRF1 and eRF3 are involved in cytoskeleton organization and cell cycle regulation // Cell Motil. Cytoskeleton. 2002. V. 52. P. 161–173.
<https://doi.org/10.1002/cm.10040>
- Volkov K., Aksenova A., Soom M., Osipov K., Svitin A., Kurischko C., Shkundina I., Ter-Avanesyan M., Inge-Vechtomo S., Mironova L.* Novel non-mendelian determinant involved in the control of translation accuracy in *Saccharomyces cerevisiae* // Genetics. 2002. V. 160. P. 25–36.
<https://doi.org/10.1093/genetics/160.1.25>
- Zhouravleva G., Frolova L., Le Goff X., Le Guellec R., Inge-Vechtomo S., Kisselev L., Philippe M.* Termination of translation in eukaryotes is governed by two interacting polypeptide chain release factors, eRF1 and eRF3 // EMBO J. 1995. V. 14. P. 4065–4072.
<https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1995.tb00078.x>

Application of Flow Cytometry for Viability Assessment of Mutants for Translation Termination Factors in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*

E. P. Efremova¹, O. M. Zemlyanko^{1, 2}, and G. A. Zhouravleva^{1, 2, *}

¹*St. Petersburg State University, St Petersburg, 199034 Russia*

²*Laboratory of Amyloid Biology SPBU, St Petersburg, 199034, Russia*

**e-mail: g.zhuravleva@spbu.ru*

Received October 9, 2023; revised November 8, 2023; accepted November 9, 2023

Abstract—Nonsense mutations in the essential *SUP45* and *SUP35* genes, encoding translation termination factors, affect the viability of *Saccharomyces cerevisiae* cells. Flow cytometry revealed that the viability of mutants was 3.5–4 times lower compared to the wild-type. Moreover, the mutants were found to have higher sensitivity to ultrasonic treatment.

Keywords: *SUP45*, *SUP35*, nonsense mutations, flow cytometry, viability, *Saccharomyces cerevisiae*