

УДК 579.253.4:582.282.23

DOI 10.17721/1728_2748.2020.82.53-58

Ю. Римар, студ.,
С. Рушковський, канд. біол. наук,
С. Демидов, д-р біол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна,
Л. Великожон, пров. інж.
Інститут фізіології рослин і генетики НАН України, Київ, Україна,
О. Проніна, пров. інж.
Б. Моргун, канд. біол. наук,
Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України, Київ, Україна

ВТОРИННИЙ РІСТ У ДИХАЛЬНО-ДЕФІЦИТНОМУ ШТАМІ ДРІЖДЖІВ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* ВНАСЛІДОК ДЕЛЕЦІЇ ГЕНА *YKU70*

Відомо, що вагомими причинами розвитку злоякісних пухлин є дестабілізація ядерного геному та порушення функціонування мітохондрій. Виникнення вторинного росту на колоніях дріжджів (поява більш пристосованих до несприятливих умов клітинних субпопуляцій в умовах загибелі вихідної культури) використовують як модель початкових етапів канцерогенезу. Для вивчення особливостей формування адаптивного росту було створено репараційно-дефектний і дихально-дефіцитний штам дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*. Як індуктор нестабільності ядерного геному застосовано термочутливу мутацію в гені *yku70* (при 37 °C викликає зупинку клітинного циклу внаслідок скорочення довжини теломерних ділянок хромосом). Пошкодження мітохондріальної ДНК *Δyku70* штаму призвело до його дихально-дефіцитного стану (петіт мутація).

Виділений петіт мутант *Δyku70* штаму культивували за оптимальної 28 °C та рестриктивної 37 °C температур, стан клітинної суспензії оцінювали за допомогою світлової та люмінесцентної мікроскопії, для визначення життєздатності клітин використовували аналіз росту мікроколоній. Проведено виділення клонів вторинного росту та аналіз їх властивостей методом серійних розведень. Для оцінювання стабільності дріжджового геному виділених клонів вторинного росту використано ПЦР-аналіз мікросателітних послідовностей YOR267C, SC8132X, SCPTS97.

При культивуванні петіт мутанта штаму *Δyku70* при рестриктивній температурі 37 °C на 7-му добу виявлено утворення життєздатних субпопуляцій, які можуть здолати зупинку клітинного циклу в G2/M фазі. Подальший аналіз виділених клонів вторинного росту показав, що вони відрізняються за виживаністю клітин при рестриктивній температурі, стійкістю до УФ випромінювання та здатністю до утворення вторинного росту на колоніях. За аналізу мікросателітних повторів у клонів вторинного росту не виявлено проявів нестабільності досліджуваних послідовностей.

Ключові слова: *Saccharomyces cerevisiae*, вторинний ріст, *YKU70*, мікросателітна нестабільність.

Вступ. Вторинний або адаптивний ріст, який спостерігається в мікроорганізмах за дії різноманітних стресових факторів, пов'язаний із появою більш пристосованих до несприятливих умов клітинних субпопуляцій в умовах загибелі вихідної культури [4, 25]. Генетична нестабільність, яка супроводжує це явище, має багато спільного з процесами, що супроводжують злоякісну трансформацію клітин ссавців. І широко використовується для вивчення канцерогенезу [14, 25].

Дріжджі *Saccharomyces cerevisiae* є модельним організмом, що застосовується у молекулярно-генетичних дослідженнях щодо мутацій у генах репараційних систем і порушеннях у функціонуванні їх продуктів, гомологи яких є антионкогенами ссавців [3, 15, 16]. Відомо, що вагомими причинами розвитку злоякісних пухлин є також порушення функціонування мітохондрій [21].

Раніше нами показано, що втрата клітинами лабораторних штамів мітохондріальної ДНК (мтДНК), які стають внаслідок цього дихально-дефіцитними, призводить до пригнічення вторинного росту у старіючих клітинних популяціях [27]. Відомо, що за дестабілізації ядерного геному, наприклад при мутаціях, які призводять до різкого скорочення теломерних ділянок хромосом, реєструється активне формування вторинного росту в штаммах з інтактною мітохондріальною ДНК [26]. Тому нами зроблено припущення, що дестабілізація геному в репараційно-дефектних штаммах може привести до появи вторинного росту у дихально-дефіцитних мутантів дріжджів. Для перевірки цього ми використовували петіт штами дріжджів, що несли мутацію *Δyku70*. Білки *YKU70/80* (Ku70/80 у ссавців) беруть участь у процесі репарації дволанцюгових розривів ДНК і в підтриманні довжин теломерів [5, 8].

У цій роботі досліджувався вплив делеції гена *yku70* та порушень у стані мтДНК на особливості формування і життєздатності клітин вторинного росту дріжджів. Крім того, проводили аналіз стану мікросателітних послідовностей, дестабілізація яких відбува-

ється у клітинах, що перебувають в умовах стресу [6, 7], і є одним із проявів дестабілізації геному за онкологічних захворювань людини [10].

Матеріали та методи

У роботі використовували гаплоїдні штами дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* DLY1412 (генотип: *MATa yku70::HIS3 RAD5 ura3 ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 can1-100 GAL+ psi+ ssd1-d2*) [24] та Y300 (генотип: *MATa trp1-1 ura3-1 his3-11,15 leu2-3,112 ade2-1 can1-100*) [22]. Штам Y300 використовували як контрольний, обидва штами походять від поширеного лабораторного штаму W303. Петіт мутанти DLY1412p та Y300p було виділено завдяки обробці бромистим етидієм (10 мкг/мл) вихідного штаму з наступним відбором петіт мутантів за втратою здатності до росту на YPG середовищі (містить гліцерин як джерело вуглецю) [13]. Втрату мітохондріального геному визначали за зникненням мітохондріальних нуклеотидів при аналізі пофарбованих DAPI дріжджових клітин за допомогою люмінесцентної мікроскопії (мікроскоп Люмам-4).

Штами культивували за оптимальної (28 °C) і рестриктивної (37 °C) температур протягом 7 днів на повному агаризованому та рідкому поживних середовищах YPD. Для дослідження загибелі клітин у колонії та виділення клонів життєздатного вторинного росту на колоніях дріжджів, що культивувалися за температур 28 °C та 37 °C, використовували щільне поживне середовище з додаванням барвника трипанового блакитного в концентрації 10 мкМ, який накопичується в мертвих клітинах та у клітинах із пошкодженою клітинною оболонкою.

За допомогою методу серійних розведень та оцінювання росту мікроколоній порівнювали колонієутворюючу здатність клітин при 28 °C та 37 °C. Мікроколонії аналізували під світловим мікроскопом ML2 за збільшення х80 та х200. Аналіз стану клітинної суспензії проводився на першу, третю та сьому доби. Мікрофотографії були зроблені фотоапаратом Canon EOS 1000D. Для

обробки фотографій використовували програму FastStone Image Viewer (FastStone Soft). Аналіз розмірів клітин проводили за допомогою програми ImageJ (Media Cybernetics, Inc).

Відбір клонів вторинного росту здійснювали на сьому добу в колоніях, які росли при 37 °C. Вторинний ріст визначали за світлим забарвленням виростів на тлі темнobarвної вихідної колонії. Для відібраних клонів визначали фенотипові ознаки за здатністю до росту на селективних середовищах. Оцінювання активності репарації ДНК визначали за виживаністю клітин після опромінювання ультрафіолетом (лампа БУВ-15, 160 Дж/м²) методом 5-кратних серійних розведень [12]. Виживаність клітин клонів вторинного росту за рестриктивної температури визначали методом 5-кратних серійних розведень після добового культивування при 37 °C. Здатність до утворення вторинного росту визначали за появою виростів на колоніях після семидобового культивування при 37 °C.

Виділення, електрофоретичне розділення ДНК і ПЛР-аналіз мікросателітних послідовностей виконували згідно із традиційними методиками [11, 19]. Послідовності мікросателітів були проаналізовані завдяки Інтернет-ресурсу Primer-BLAST (NCBI). У роботі використовували три мікросателітних локуси: SC8132X, YOR267C і SCPTS7, які широко застосовують у молекулярно-генетичних дослідженнях на *S. cerevisiae*. [19]. Як референтний ген було задіяно *PDA1* [18]. Нуклеотидні послідовності локусів та їхня локалізація наведені в табл. 1, розміри ампліконів вказано для вихідного штаму W303. Для праймерів підібрано оптимальні програми ПЛР. Локуси SC8132X, SCPTS7, YOR267C, PDA1 були ампліфіковані за такою програмою: 94 °C – 4 хв; 94 °C – 30 с; 56 °C – 45 с; 72 °C – 30 с; повтор із кроку 2 – 28 разів; 72 °C – 10 хв; 22 °C – 1 хв. Отримані ПЛР-продукти аналізували за допомогою електрофорезу у 2% агарозному гелі.

Таблиця 1. Використані праймери для ампліфікації геномних послідовностей у штаммах *S. cerevisiae*

Локус	Повтор	Хромосома	Нуклеотидна послідовність праймеру	Розмір амплікону, п. н.	Посилання
SC8132X	(gaa) ₁₆	XVI	F: 5'-CTGCTCAACTTGTGATGGGTTTGG-3' R: 5'-CCTCGTTACTATCGTCTTCATCTTGC-3'	201	[19]
YOR267C	(caa) ₂₀	XV	F: 5'-GGTGACTCTAACGGCAGAGTGG-3' R: 5'-GGATCTACTTGCAGTATACGGG-3'	389	[19]
SCPTS7	(aat) ₃₃	XIII	F: 5'-AAAAGCGTAAGCAATGGTGTAGAT-3' R: 5'-AAATGATGCCAATATTGAAAGGT-3'	285	[19]
PDA1		V	F: 5'-GGAATTTGCCCGTCGTGTT-3' R: 5'-GCGGCGGTACCCATACC-3'	58	[18]

Результати й обговорення. Отримані нами петіт мутанти *Дуки70* штаму DLY 1412 дріжджів дають змогу дослідити наслідки дестабілізації ядерного геному при пошкодженні мітохондріальної ДНК. У процесі культивування петітів штаму DLY1412 при 37 °C (рестриктивна температура) уже на першу добу на цитологічних препаратах спостерігали велику кількість мертвих клітин (77,60±2,36 %, $p<0,001$), порівняно з 28 °C (16,88±1,19 %, $p<0,001$), що узгоджується з літературними даними [14]. Оцінювання стану ядер клітин методом люмінесцентної мікроскопії свідчить про дестабілізацію ядерного геному в петіт мутанті *Дуки70* штаму вже на першу добу культивування при 37 °C. У суспензії переважають клітини, для яких характерні ядра з виросами, несиметричної форми, з ознаками руйнування та розповсюдження ядерного матеріалу по клітині. Також на цитологічних препаратах була зареєстрована зміна розмірів клітин петіт мутанта DLY1412р залежно від умов культивування. Середній розмір клітин, які культивували, при 28 °C становить 5,33±0,06 мкм, а при 37 °C – 6,93±0,20 мкм ($p<0,01$). Це свідчить про зупинку клітинного циклу, у суспензії при цьому масово реєструють типові групи з великих дочірніх і материнських клітин, які не розділяються і надалі гинуть. При подальшому культивуванні різниця в розмірах клітин не була статистично значущою, що свідчить про загибель субпопуляції гігантських клітин, які не змогли подолати зупинку клітинного циклу. На сьому добу в популяції

накопичуються неушкоджені клітини середнього розміру, які мають ядра типової морфології, що свідчить про появу субпопуляції клітин, які можуть здолати зупинку клітинного циклу.

Отримані цитологічні дані про зміну стану клітинної суспензії петіт мутанта DLY1412р у процесі культивування впродовж 7 діб було підтверджено завдяки оцінюванню життєздатності клітин методом серійних розведень (рис. 1). Так, на першу добу культивування при температурі 37 °C петіт мутанта DLY1412р відбувається значне зниження колонієутворюючої здатності клітин щодо батьківського *Дуки70* штаму, що погоджується з літературними даними про зниження виживаності петіт мутантів за підвищених температур [23]. На 7 добу здатність окремих субпопуляцій до виживання і формування колоній клітинами DLY1412р значно підвищується. Цікаво, що при цьому виживаність клітин петіт мутанта перевищує такий показник для батьківської культури, що відповідає літературним даним про позитивний вплив петіт мутації на ріст *cdc13-1* мутантів при рестриктивній температурі [1] (як і YKU70р, CDC13р бере участь у підтриманні довжини теломерів). Згідно з нашими спостереженнями, цей ефект не був стійким і його прояви коливалися залежно від повторюваності, що свідчить про залежність зростання виживаності клітин вторинного росту в рестриктивних умовах від генетичних подій, які призводять до його появи.

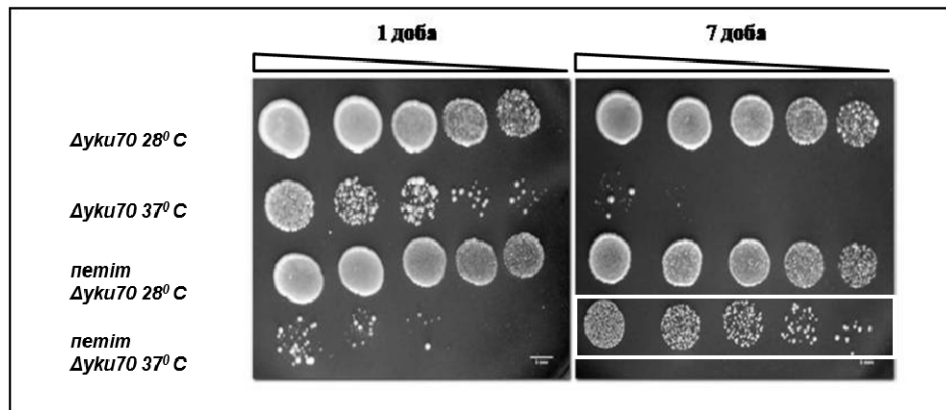


Рис. 1. Поява життєздатної субпопуляції клітин *Δuku70* петіт штаму на 7 добу культивування при 37 °С, 5-кратні серійні розведення клітинної суспензії

Для додаткового оцінювання дестабілізації ядерного геному при перебуванні клітин *Δuku70* петіт штаму в стресових умовах використовували ПЛР-аналіз розмірів мікросателітних послідовностей на першу добу культивування клітинних суспензій. Згідно з раніше наведеними даними цитологічних досліджень, під впливом *Δuku70* мутації відбувалася зупинка клітинного циклу та

дестабілізація ядерного геному у клітинах штаму. Розмір мікросателітних послідовностей залишався стабільним як при оптимальній, так і рестриктивній температурах (рис. 2), наведено на прикладі мікросателіта SC8132X) для контрольного Y300 та *Δuku70* DLY1412 штамів та їх петітів.

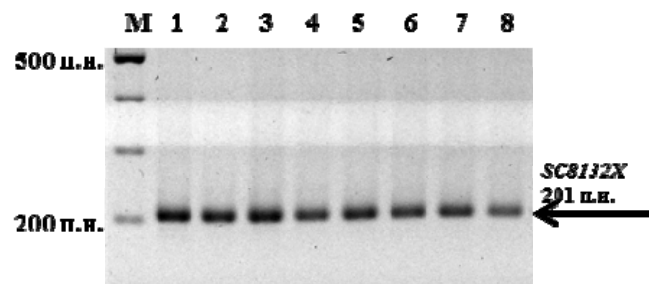


Рис. 2. Електрофореграма продукту ампліфікації нуклеотидної послідовності мікросателіта SC8132X (вказано стрілкою).

1 – культивування штаму *YKU70* при 28 °С; 2 – *YKU70* при 37 °С; 3 – петіт *YKU70* при 28 °С; 4 – петіт *YKU70* при 37 °С;

5 – *Δuku70* при 28 °С; 6 – *Δuku70* при 37 °С; 7 – петіт *Δuku70* при 37 °С; 8 – петіт *Δuku70* при 37 °С.

М – маркер молекулярної маси GeneRuler DNA Ladder Mix

У ході якісного оцінювання загибелі клітин спостерігали за розвитком окремих колоній досліджуваних штамів на щільному поживному середовищі з додаванням барвника трипанового блакитного. При культивуванні петітів штаму DLY1412p за рестриктивної температури протягом 7 діб на колоніях спостерігалось утворення білих виростів на тлі темnobарвної колонії, що свідчить

про розвиток життєздатного вторинного росту на фоні масової загибелі клітин (рис. 3). При цьому на петіті контрольного штаму Y300 вторинний ріст не зареєстровано і за оптимальної, і за підвищеної температури 37 °С (для цього штаму вона не є рестриктивною), що відповідає нашим попереднім даним про пригнічення вторинного росту у петіт мутантах [27].

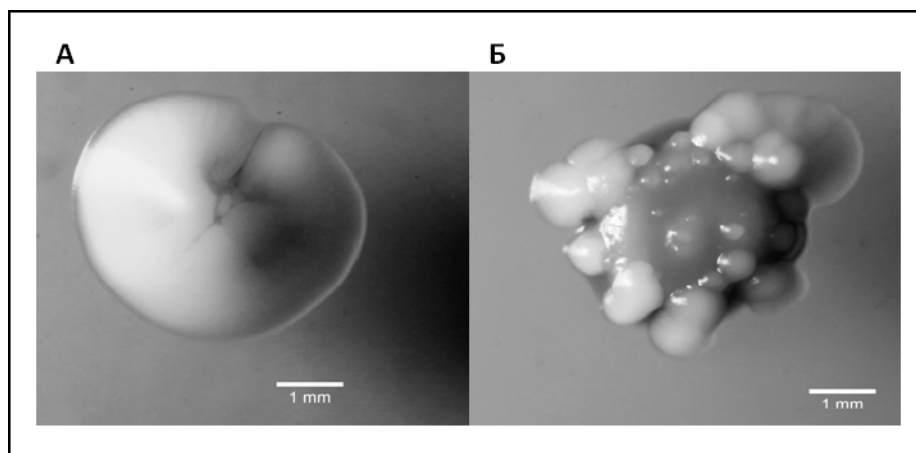


Рис. 3. Поява вторинного росту на колоніях петіт *Δuku70* штаму (Б) на відміну від петіт *YKU70* (А). YPD з додаванням трипанового блакитного, 37 °С, 7 діб

Для подальшого аналізу були виділені окремі клони петітів вторинного росту штаму DLY 1412. Морфологія колоній, утворених із клітин вторинного росту, залежала від температури культивування. При 28 °C колонії мали правильну округлу форму, майже не накопичували трипановий блакитний, вторинний ріст не формувався. При 37 °C ріст колоній пригнічувався, морфологія колоній ставала нерегулярною. Розміри колоній і поява на них вторинного росту, характер накопичення барвника внаслідок загибелі клітин значно відрізнявся між виділеними клонами. Так, спостерігалось утворення слабо забарвлених секторів, темних плям у центрі колонії, деякі колонії набували рівномірного темного забарвлення. Було оцінено колонієутворюючу здатність виділених клонів вторинного росту на селективних середовищах, їх життєздатність при рестриктивній температурі та чутливості до ультрафіоле-

тового випромінювання (УФВ). Усі клони вторинного росту мали селективні ознаки, характерні для батьківського штаму та були дихально-дефіцитними, при цьому вони відрізнялися здатністю до росту при 37 °C при та стійкістю до УФВ. Фенотипові відмінності виділених клонів наведено у табл. 2. Виявлені відмінності у властивостях клонів вторинного росту свідчать, що до їх появи могли призводити різні генетичні події, наприклад, рекомбінаційні обміни в прителомерних ділянках або мутації, які дали змогу клітинам подолати зупинку клітинного росту при рестриктивній температурі, приклади яких відомі за літературними джерелами [17]. Для виявлення впливу рекомбінаційних обмінів на формування вторинного росту в запропонованій нами системі ми в подальшому плануємо додати в генотип досліджуваного штаму мутації, які пригнічують рекомбінацію.

Таблиця 2. Відмінності у фенотипі виділених клонів вторинного росту петіт мутанта DLY1412

№ клону	Життєздатність t, 28 °C	Життєздатність t, 37 °C	Формування вторинного росту t, 37 °C	Чутливість до УФВ
1	+	-	-	+
2	+	+/-	+	+
3	+	-	-	+
4	+	-	-	+/-
5	+	+	+/-	+
6	+	+	-	+
7	+	-	-	+
8	+	-	-	+
9	+	-	+	-
10	+	+	+	+/-

Примітки: "+" – спостерігається ріст; "-" – ріст не спостерігається; "+/-" – слабкий ріст.

Надалі було проведено ПЛР-аналіз мікросателітів у виділених клонах вторинного росту, оскільки припускали, що стресові умови, які супроводжували формування вторинного росту (внаслідок тривалого культивування петіт мутантів *Δuku70* штаму при рестриктивній температурі), призведуть до дестабілізації мікросателітних послідовностей. Аналіз проводили у клонах, які куль-

ували протягом доби за оптимальної температури 28 °C. Прояву мікросателітної нестабільності у проаналізованих послідовностях (SCPTSY7, YOR267C, SC8132X не спостерігали (на рис. 4 зображено на прикладі мікросателіта SC8132X). Отже, нами не виявлено нестабільності мікросателітних повторів у ході формування вторинного росту в петіт мутантів *Δuku70*.

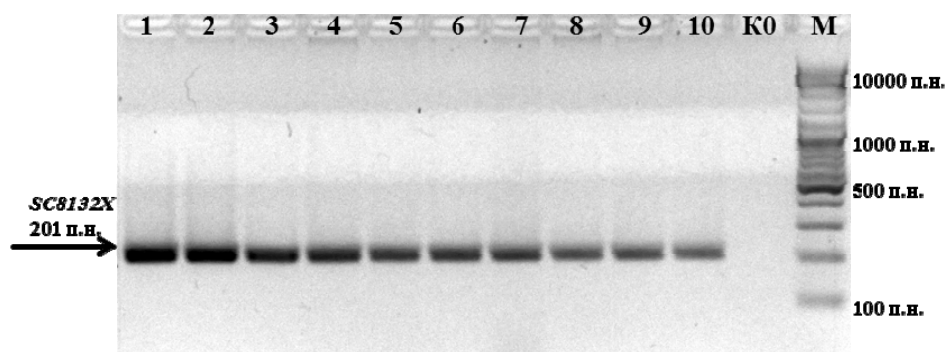


Рис. 4. Електрофореграма ПЛР-продукту мікросателіта SC8132X (вказано стрілкою) клонів вторинного росту штаму DLY1412.

1–10 – номери клонів, K0 – негативний контроль, M – маркер розмірів GeneRuler DNA Ladder Mix

Таким чином, нами виявлено явище вторинного росту в *Δuku70* штамі на тлі пригнічення дихання внаслідок пошкодження мітохондріальної ДНК, що може бути використане як дріжджова модель початкових етапів канцерогенезу. Суть цієї моделі полягає у тому, що при вивченні вторинного росту використовуються штами дріжджів, які несуть делецію гена *uku70* (індуктор нестабільності ядерного геному за рахунок порушення процесів репарації дволанцюгових розривів

ДНК, скорочення теломерів та зупинки клітинного циклу при 37 °C) [9, 20] на фоні порушень або втрати мітохондріальної ДНК (петіт мутанти).

Висновки. У ході культивування петіт мутанта штаму *Δuku70* за рестриктивної температури 37 °C на 7 добу було виявлено утворення життєздатних субпопуляцій, які можуть здолати зупинку клітинного циклу в G2/M фазі. Подальший аналіз виділених клонів вторин-

ного росту показав, що вони відрізняються за виживаністю клітин при рестриктивній температурі, стійкістю до УФ випромінювання та здатністю до утворення вторинного росту на колоніях. У процесі аналізу мікросателітних повторів у клонів вторинного росту не було виявлено проявів нестабільності досліджуваних послідовностей.

Подяка

Автори висловлюють подяку Mikhajlo K. Zubko (University of Newcastle, United Kingdom) та S. J. Elledge (Baylor College of Medicine, USA) за надані для дослідження штами дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*. Робота була фінансово підтримана відомчою тематикою НАН України (Державний реєстраційний номер 0118U003663).

Список використаних джерел

1. A genome wide suppressor and enhancer analysis of *cdc13-1* reveals varied cellular processes influencing telomere capping in *Saccharomyces cerevisiae*. / S. Addinall, M. Downey M. Yu et al. // *Genetics*. – 2008. – Vol. 180, № 4. – P.2251–2266.
2. Current Protocols in Molecular Biology / F. Ausubel, R. Brent, R. Kingston et al. – H; NJ: USA, 2001.
3. The Yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a Model for Understanding RAS Proteins and their Role in Human Tumorigenesis / G. Cazzanelli, F. Pereira, S. Alves et al. // *Cells*. – 2018. – Vol. 7, № 2:14.
4. Superoxide is a mediator of an altruistic aging program in *Saccharomyces cerevisiae*/ P. Fabrizio, L. Battistella, R. Vardavas et al. // *The Journal of Cell Biology*. – 2004. – Vol. 166, № 7. – P. 1055–1067.
5. Fell V. The Ku heterodimer: Function in DNA repair and beyond / V. Fell, C. Schild-Poulter // *Mutation Research – Reviews in Mutation Research*. – 2015. – Vol. 763. – P.15–29.
6. Field D. Abundant microsatellite polymorphism in *Saccharomyces cerevisiae*, and the different distributions of microsatellites in eight prokaryotes and *S. cerevisiae*, result from strong mutation pressures and a variety of selective forces / D. Field // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1998. – Vol. 95, № 4. – P. 1647–1652.
7. Fitzgerald D. M. Stress-Induced Mutagenesis: Implications in Cancer and Drug Resistance. / D. M. Fitzgerald, P. J. Hastings, S. M. Rosenberg // *Annu Rev Cancer Biol*. – 2017. – Vol. 1. – P. 119–140.
8. Decreased expression of DNA repair proteins *Ku70* and *Mre11* is associated with aging and may contribute to the cellular senescence / Y. Ju, K. Lee, J. Park et al. // *Experimental and Molecular Medicine*. – 2006. – Vol. 38, № 6. – P. 686–693.
9. *Saccharomyces Ku70, Mre11/Rad50* and *RPA* Proteins Regulate Adaptation to G2 / M Arrest after DNA Damage / S. Lee, J. Moore, A. Holmes et al. // *Cell*. – 1998. – Vol. 94, № 3 – P. 399–409.
10. Imbalanced adaptive responses associated with microsatellite instability in cholangiocarcinoma. / W. Lailome, S. Kadsanit, K. Muisook et al. // *Oncology Letters*. – 2017. – Vol. 13, № 2. – P. 639–646.
11. Lööke M. Extraction of genomic DNA from yeasts for PCR-based applications / M. Lööke K. Kristjuhan, A. Kristjuhan // *Biotechniques*. – 2011. – Vol. 50, № 5. – P. 325–328.
12. Mirisola M. Approaches to study yeast cell aging and death. / Mario G. Mirisola, Ralf J. Braun, Dina Petranovic // *FEMS Yeast Research*. – 2014. – Vol. 14, № 1. – P. 109–118.
13. Meyer R. DNA Biosynthesis in Mitochondria: Differential Inhibition of Mitochondrial and Nuclear DNA Polymerases by the Mutagenic Dyes Ethidium Bromide and Acriflavin / R. R. Meyer, M. V. Simpson // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1969. – Vol. 34. – P. 238–244.
14. Natali F. The Mutator Phenotype: Adapting Microbial Evolution to Cancer Biology / F. Natali, G. Rancati // *Frontiers in genetics*. – 2019. – Vol. 10. – P. 713.
15. Putnam C. Pathways and Mechanisms that Prevent Genome Instability in *Saccharomyces cerevisiae* / C. D. Putnam, R. D. Kolodner // *Genetics*. – 2017. – Vol. 206, № 3. – P. 1187–1225.
16. Skoneczna A. Genetic instability in budding and fission yeast-sources and mechanisms / A. Skoneczna, A. Kaniak, M. Skoneczny // *FEMS Microbiol Rev*. – 2015. – Vol. 39, № 6. – P. 917–967.
17. Dynamic regulation of single-stranded telomeres in *Saccharomyces cerevisiae* / S. Smith, S. Banerjee, R. Rilo, K. Myung // *Genetics*. – 2008. – Vol. 178, № 2. – P. 693–701.
18. Molecular cloning of the gene for the E1 alpha subunit of the pyruvate dehydrogenase complex from *Saccharomyces cerevisiae* / H. Steensma, L. Holterman, I. Dekker et al. // *European Journal of Biochemistry*. – 1990. – Vol. 191, № 3. – P. 769–74.
19. Vaudano E. Discrimination of *Saccharomyces cerevisiae* wine strains using microsatellite multiplex PCR and band pattern analysis / E. Vaudano, E. Garcia-Moruno // *Food Microbiology*. – 2008. – Vol. 25, № 1. – P. 56–64.
20. Vodenicharov M. Telomere capping in non-dividing yeast cells requires *Yku* and *Rap1* / M. Vodenicharov, N. Laterreux, R. J. Wellinger // *EMBO Journal*. – 2010. – Vol. 29, № 17. – P. 3007–3019.
21. Wallace D. C. A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine / D. C. Wallace // *Annu Rev Genet*. – 2005. – Vol. 39. – P. 359–407.
22. Wang H. Genetic and physical interactions between *DPB11* and *DDC1* in the yeast DNA damage response pathway / H. Wang, S. Elledge // *Genetics*. – 2002. – Vol. 160, № 4. – P. 1295–304.
23. Zubko E. Deficiencies in mitochondrial DNA compromise the survival of yeast cells at critically high temperatures / E. Zubko, M. Zubko // *Microbiological Research*. – 2014. – Vol. 169, № 2-3. – P. 185–195.
24. Zubko M. *Exo1* and *Rad 24* differentially regulate generation of ssDNA at telomeres of *Saccharomyces cerevisiae cdc13-1* mutants / M. Zubko, S. Guillard, D. Lydall // *Genetics*. – 2004. – Vol. 168, № 1. – P. 103–15.
25. Никитина Е. Т. Вторичный рост у микроорганизмов / Е. Т. Никитина. – Алматы: РИО ВАС РК, 2000. – 357 с.
26. Петрачкова Т. А. Влияние мутации *cdc13-1* на состояние клеточной популяции дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* / Т. А. Петрачкова, О. В. Пронина, С. Р. Рушковский // *Достижения и проблемы генетики, селекции и биотехнологии: сборник наук. пр.* – 2012. – Т. 4. – С. 386–390.
27. Влияние потери митохондриальной ДНК на процессы старения в колониях дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* / О. В. Пронина, Т. А. Петрачкова, Ю. Б. Шепета, С. Р. Рушковский // *Збірник наук. пр. "Фактори експериментальної еволюції організмів"*, К.: Логос, 2011. – Т. 10 – С. 69–73.

References

1. Addinall SG, Downey M, Yu M, et al. A genomewide suppressor and enhancer analysis of *cdc13-1* reveals varied cellular processes influencing telomere capping in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 2008;180(4):2251-2266.
2. Ausubel F. Current Protocols in Molecular Biology H; NJ: USA, 2001.
3. Cazzanelli G, Pereira F, Alves S, et al. The Yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a Model for Understanding RAS Proteins and their Role in Human Tumorigenesis. *Cells*. 2018;7(2):14.
4. Fabrizio P, Battistella L, Vardavas R, Gattazzo C, Longo VD Superoxide is a mediator of an altruistic aging program in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Cell Biology* 2004; 166(7):1055-1067.
5. Fell VL, Schild-Poulter C. The Ku heterodimer: Function in DNA repair and beyond. *Mutat. Res.* – Rev. *Mutat. Res.* 2015; 763:15–29.
6. Field D. Abundant microsatellite polymorphism in *Saccharomyces cerevisiae*, and the different distributions of microsatellites in eight prokaryotes and *S. cerevisiae*, result from strong mutation pressures and a variety of selective forces. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1998; 95(4):1647–1652.
7. Fitzgerald DM, Hastings PJ, Rosenberg SM. Stress-Induced Mutagenesis: Implications in Cancer and Drug Resistance. *Annu Rev Cancer Biol*. 2017;1:119-140.
8. Ju Y. et al. Decreased expression of DNA repair proteins *Ku70* and *Mre11* is associated with aging and may contribute to the cellular senescence. *Exp. Mol. Med.* 2006; 38(6):686–693.
9. Lee SE, Moore JK, Holmes A, Umez K, Kolodner RD, Haber JE. *Saccharomyces Ku70, Mre11/Rad50* and *RPA* Proteins Regulate Adaptation to G2 / M Arrest after DNA Damage. *Cell*. 1998; 94(3):399–409.
10. Lailome W., Kadsanit S., Muisook K., Yongvanit P., Namwat N., Techasen A., Puapairoj A., Khuntikeo N., Phonjit P. "Imbalanced adaptive responses associated with microsatellite instability in cholangiocarcinoma". *Oncology Letters* 2017; 13(2): 639-646.
11. Lööke M, Kristjuhan K, Kristjuhan A. Extraction of genomic DNA from yeasts for PCR-based applications. *Biotechniques*. 2011; 50(5):325–328.
12. Mario G. Mirisola, Ralf J. Braun, Dina Petranovic, Approaches to study yeast cell aging and death. *FEMS Yeast Research*, 2014; 14 (1):109–118.
13. Meyer RR, Simpson MV. DNA Biosynthesis in Mitochondria: Differential Inhibition of Mitochondrial and Nuclear DNA Polymerases by the Mutagenic Dyes Ethidium Bromide and Acriflavin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1969; 34: 238-244.
14. Natali F., & Rancati, G. The Mutator Phenotype: Adapting Microbial Evolution to Cancer Biology. *Frontiers in genetics*, 2019; 10, 713.
15. Putnam CD, Kolodner RD. Pathways and Mechanisms that Prevent Genome Instability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 2017;206(3):1187-1225.
16. Skoneczna A, Kaniak A, Skoneczny M. Genetic instability in budding and fission yeast-sources and mechanisms. *FEMS Microbiol Rev*. 2015;39(6):917-967.
17. Smith, Stephanie et al. "Dynamic regulation of single-stranded telomeres in *Saccharomyces cerevisiae*." *Genetics* vol. 178,2 (2008): 693-701.
18. Steensma HY, Holterman L, Dekker I, van Sluis CA, Wenzel TJ. Molecular cloning of the gene for the E1 alpha subunit of the pyruvate dehydrogenase complex from *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* 1990; 191(3):769–74.
19. Vaudano E, Garcia-Moruno E. Discrimination of *Saccharomyces cerevisiae* wine strains using microsatellite multiplex PCR and band pattern analysis. *Food Microbiol*. 2008; 25(1):56–64.
20. Vodenicharov MD, Laterreux N, Wellinger RJ. Telomere capping in non-dividing yeast cells requires *Yku70* and *Rap1*. *EMBO J*. 2010; 29(17):3007–3019.
21. Wallace D. A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. *Annu Rev Genet*. 2005; 39:359–407.

22. Wang H, Elledge SJ. Genetic and physical interactions between DPB11 and DDC1 in the yeast DNA damage response pathway. *Genetics*. 2002; 160(4):1295–304.

23. Zubko EI, Zubko MK. Deficiencies in mitochondrial DNA compromise the survival of yeast cells at critically high temperatures. *Microbiol. Res.* 2014; 169(2–3):185–195.

24. Zubko MK, Guillard S, Lydall D. *Exo1* and *Rad24* differentially regulate generation of ssDNA at telomeres of *Saccharomyces cerevisiae* cdc13-1 mutants. *Genetics*. 2004; 168(1):103–15.

25. Nikitina ET. *Vtorychniy rost u mikroorganizmov*. Almaty: RIO VAK RK, 2000. Russian.

26. Petrachkova TA, Pronina OV, Shepeta YB, Rushkovsky SR. Vlyanyaya mutatsyy cdc13-1 na sostoyanye kletchnoy populyatsyy drozhzhey *Saccharomyces cerevisiae*. *Dostyazhenyya y problemy*

henetyky, selektsyy y byotekhnolohyy: zbirnyk naukovykh prats. 2012; 4:386–390. Russian.

27. Pronina OV, Petrachkova TA, Shepeta YB, Rushkovsky SS. Vplyv vtraty mitokhondrial'noyi DNK na protsesy starinnya v koloniyakh drizhdzhiv *Saccharomyces cerevisiae*. *Zbirnyk naukovykh prats' "Factory eksperymental'noyi evolyutsiyi orhanizmiv"*, Kyiv, Lohos. 2011; 10: 69–73. Russian.

Надійшла до редколегії 9.09.2020
Отримано виправлений варіант 9.10.2020
Підписано до друку 9.10.2020

Received in the editorial 9.09.2020
Received a revised version on 9.10.2020
Signed in the press on 9.10.2020

Ю. Рымарь, студ.,
С. Рушковский, канд. биол. наук,
С. Демидов, д-р биол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна,
Л. Великожон, вед. инж.
Институт физиологии растений и генетики НАН Украины, Киев, Украина,
О. Пронина, вед. инж.,
Б. Моргунов, канд. биол. наук
Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины, Киев, Украина

ВТОРИЧНИЙ РОСТ В ДЫХАТЕЛЬНО-ДЕФИЦИТНЫХ ШТАММАХ ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* ПРИ ДЕЛЕЦИИ ГЕНА *YKU70*

Известно, что весомыми причинами развития злокачественных опухолей являются дестабилизация ядерного генома и нарушение функционирования митохондрий. Возникновение вторичного роста в колониях дрожжей (появление более приспособленных к неблагоприятным условиям клеточных субпопуляций в условиях гибели исходной культуры) используется как модель начальных этапов канцерогенеза. Для изучения особенностей формирования адаптивного роста был создан репарационно-дефектный и дыхательно-дефицитный штамм дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Как индуктор нестабильности ядерного генома была использована температурочувствительная мутация в гене *yku70* (при 37 °C вызывает остановку клеточного цикла вследствие сокращения длины теломерных участков хромосом). Повреждения митохондриальной ДНК *Дуку70* штамма привело к его дыхательно-дефицитному состоянию (петит мутация).

Выделенный петит мутант *Дуку70* штамма культивировали при оптимальной 28 °C и рестриктивной 37 °C температурах, состояние клеточной суспензии оценивали с помощью световой и люминесцентной микроскопии, для определения жизнеспособности клеток использовали анализ роста микроколоний. Проведено выделение клонов вторичного роста и анализ их свойств методом серийных разведений. Для оценки стабильности дрожжевого генома выделенных клонов вторичного роста был использован ПЦР-анализ микросателлитных последовательностей YOR267C, SC8132X, SCPTS7.

При культивировании петит мутанта штамма *Дуку70* при рестриктивной температуре 37 °C на 7 сутки было обнаружено образование жизнеспособных субпопуляций, которые могут преодолеть остановку клеточного цикла в G2/M фазе. Дальнейший анализ выделенных клонов вторичного роста показал, что они отличаются по выживаемости клеток при рестриктивной температуре, устойчивости к УФ излучению и способности к образованию вторичного роста на колониях. При анализе микросателлитных повторов у клонов вторичного роста не было обнаружено проявлений нестабильности исследуемых последовательностей.

Ключевые слова: *Saccharomyces cerevisiae*, вторичный рост, *YKU70*, микросателлитная нестабильность.

Yu. Rymar, Student,
S. Rushkovsky, PhD,
S. Demidov, Dr Sci.
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine,
L. Velykozhor, lead engineer
Institute of Plant Physiology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine,
O. Pronina, lead engineer,
B. Morgun, PhD
Institute of Cell Biology and Genetic Engineering, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine

ADAPTIVE REGROWTH IN RESPIRATORY DEFICIENT STRAIN OF YEAST *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* DUE TO DELETION OF *YKU70* GENE

It is known that significant causes of malignant tumors are destabilization of the nuclear genome and mitochondrial dysfunction. Adaptive regrowth in yeast colonies (the appearance of cell subpopulations more adapted to unfavorable conditions under conditions of the death of the original culture) is used as a model of the initial stages of carcinogenesis. To study the features of the formation of adaptive regrowth, a reparation-defective and respiratory-deficient yeast strain of *Saccharomyces cerevisiae* was created. The thermosensitive mutation in the *yku70* gene was used as an inducer of nuclear genome instability (at 37 °C it causes cell cycle arrest due to a reduction of the length of telomeric regions of chromosomes). Damage to the mitochondrial DNA of the *Δyku70* strain led to its respiratory deficiency (petite mutation).

The isolated petite mutant *Δyku70* strain was cultured at optimal 28 °C and restrictive 37 °C temperatures, the state of the cell suspension was evaluated by light and fluorescence microscopy, to determine the viability of cells was used the analysis of microcolonies growth. Isolation of adaptive regrowth clones and analysis of their properties by the method of serial dilutions were conducted. To assess the genome stability of selected clones of adaptive regrowth, PCR analysis of the microsatellite sequences YOR267C, SC8132X, SCPTS7 was conducted.

When culturing the petite mutant of the strain *Δyku70* at a restrictive temperature of 37 °C for 7 days, the formation of viable subpopulations was detected, which can overcome the arrest of the cell cycle in the G2 / M phase. Further analysis of the isolated clones of adaptive regrowth showed that they differ in cell survival at restrictive temperature, resistance to UV radiation and the ability to form adaptive regrowth on colonies. In the analysis of microsatellite repeats in adaptive regrowth clones, no manifestations of instability of the studied sequences were detected.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, adaptive regrowth, *YKU70*, microsatellite instability.