

УДК 640

МОДЕЛЬ ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ МУТАЦИЙ В ГЕНАХ СУКЦИНАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ ЧЕЛОВЕКА**В.С. Павлов, А.А. Ильина, Д.С. Спасская, Д.С. Карпов, А.В. Кудрявцева***Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, Россия*

Благодаря высокой консервативности митохондриальных генов дрожжи служат важным модельным организмом для изучения функций митохондрий и их роли в патогенезе заболеваний человека. Митохондриальный комплекс II (сукцинатдегидрогеназа) является одним из ключевых компонентов электрон-транспортной цепи и цикла трикарбоновых кислот. Комплекс состоит из четырех субъединиц, мутации в которых приводят к таким заболеваниям как наследственная парагангиома, детская лейкоэнцефалопатия, синдром Ли, феохромоцитома и др. Целью данной работы стала функциональная проверка варианта Y108R в дрожжевом гене *SDH4*, аналогичного замене H102R в гене *SDHD* человека. Мутация H102R была обнаружена в ходе секвенирования экзона опухоли пациента с множественными парагангиомами.

Замена *SDH4*:Y108R, аналогичная варианту *SDHD*:H102R, была определена путем выравнивания последовательностей белков Sdh4 дрожжей и SDHD человека. На основе дрожжевого вектора YCpLAC36 получены плазмиды, несущие ген *SDH4* дикого типа, а также мутантный ген *SDH4* с целевой и контрольной миссенс мутациями в позициях 108 и 120 белка, соответственно. Кроме того, в вектор YCpLAC36 клонировали ген *SDHD* человека. Дрожжевой штамм с делецией гена *SDH4* (*sdh4*-Δ) получали путем CRISPR/Cas9 опосредованного редактирования генома *S. cerevisiae* с плазмидой pCRCT, несущей iCas9 и направляющую РНК. Штамм *sdh4*-Δ трансформировали плазмидами, содержащими ген дрожжей дикого типа (pYSDH4, 2 биологических повтора), пустой вектор YCp36, человеческий ген (pHSDHD, 2 биологических повтора) и плазмидами, несущими ген *SDH4* с мутацией (pYSDH4-Y120C или pYSDH4-Y108R). Колонии растили на чашках Петри с селективными средами SM-URA и SM-URA-Glc+EtOH (вместо глюкозы в качестве источника углерода используется этанол) и SM-URA-Glc+Glycerol (вместо глюкозы в качестве источника углерода используется глицерин) в виде серии последовательных разведений в течение четырех суток.

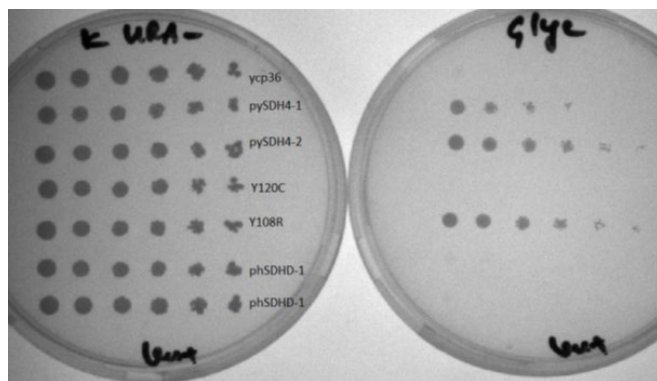


Рис. 1. Оценка скорости формирования колоний рекомбинантных штаммов дрожжей на чашках Петри с селективной питательной средой, содержащей неферментируемый источник углерода – глицерин. Источник: составлено авторами

Согласно полученным результатам плазмида pYSDH4-Y108R восстанавливает способность мутантного штамма *sdh4*-Δ расти на среде с неферментируемыми источниками углерода, в то время как плазмиды pYSDH4-Y120C и pHSDHD не способны комплементировать делецию гена *SDH4* (Рисунок 1).

Таким образом, присутствие мутации Y108R не влияет на способность дрожжей штамма *sdh4*-Δ осуществлять окислительное фосфорилирование при отсутствии ферментативного углерода.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 19-15-00419). Работа выполнена на оборудовании ЦКП “Геном” ИМБ РАН (http://www.eimb.ru/rus/ckp/ccu_genome_c.php).