

ST PETERSBURG UNIVERSITY

As manuscript

Al Shanaa Ousama

**SYNTHESIS OF RNA APTAMERS IN *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* YEAST
CELLS**

Scientific specialisation 1.5.7. Genetics

Thesis for a Candidate degree in Biological Sciences

Scientific supervisor:

Doctor of biological sciences, docent

Padkina Marina Vladimirovna

Saint-Petersburg

2023

TABLE OF CONTENTS

LIST OF ABBREVIATIONS AND SYMBOLS.....	4
INTRODUCTION.....	6
1 LITERATURE REVIEW.....	11
1.1. DNA and RNA aptamers.....	11
1.1.1 Improvements of methods for the selection and synthesis of RNA aptamers.....	13
1.1.2 Aptamers in basic and applied research.....	16
1.1.3 Functional and structural diversity of RNA as a basis for obtaining aptamers.....	17
1.1.4 Fluorogenic RNA aptamers.....	19
1.2 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> in basic and applied research.....	23
1.2.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> yeast as a model organism to study the mechanisms and regulation of the main biological processes in eukaryotes.....	25
1.2.2 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> yeast- producer of recombinant proteins and other biologically active compounds.....	26
1.2.3 Prospects of using <i>Saccharomyces cerevisiae</i> to produce RNA aptamers...	28
2 MATERIALS AND METHODS.....	31
2.1 <i>Escherichia coli</i> bacterial strains and <i>Saccharomyces cerevisiae</i> yeast strains	31
2.2 Culture media and growth conditions	31
2.3 Plasmids used in the study.....	32
2.4 Transformation of bacteria	33
2.5 Transformation of yeast.....	34
2.6 Molecular biology methods.....	34
2.6.1 Isolation of plasmid DNA.....	34
2.6.2 Isolation of yeast chromosomal DNA.....	35

2.6.3	Polymerase chain reaction.....	35
2.6.4	Restriction and ligation of DNA fragments.....	37
2.6.5	Electrophoretic separation of DNA.....	37
2.6.6	DNA sequencing.....	38
2.7	Fluorescence analysis of yeast cells.....	38
2.8	Transcriptome analysis.....	39
2.8.1	Total RNA extraction from yeast.....	39
2.8.2	cDNA library construction and sequencing.....	39
2.8.3	Analysis of differential expression of yeast genes.....	39
2.9	Statistical processing of data	40
3	RESULTS.....	41
3.1	Development of a reporter construct based on the Broccoli RNA aptamer...41	
3.1.1	Preparation of plasmid pYES2-PGAL-Br-TC	42
3.1.2	Preparation of plasmid pYES2-PSNR5-Br-TS.....	47
3.1.3	Expression of pYES2-PGAL-Br-TC and pYES2-PSNR5-Br-TS plasmids in <i>S. cerevisiae</i> yeast cells.....	49
3.2	Transcriptome analysis of RNA aptamer-producing yeast strain.....	53
3.3	The development of <i>S. cerevisiae</i> strain with <i>XRNI</i> gene deletion.....	56
3.3.1	Obtaining plasmid pPICZ-5'-3'-XRNI for inserting <i>XRNI</i> gene deletion.....	56
3.3.2	Obtaining <i>S. cerevisiae</i> yeast strain with <i>XRNI</i> gene deletion and the evaluation of viability.....	62
4	DISCUSSION.....	65
5	CONCLUSION.....	76
	REFERENCES.....	77
	SUPPLEMENTARY MATERIALS.....	102
	ACKNOWLEDGEMENT.....	111

LIST OF ABBREVIATIONS AND SYMBOLS

DTT - dithiothreitol

IPA - isopropyl alcohol

AcOH - acetic acid

APS - ammonium persulfate

PCR - polymerase chain reaction

EDTA - ethylenediaminetetraacetic acid

DFHBI-1T (5Z)-5-[(3,5-Difluoro-4-hydroxyphenyl)methylene]-3,5-dihydro-2-methyl-3-(2,2,2-trifluoroethyl)-4H-imidazol-4-one ((5Z)-5-[(3,5-difluoro-4-hydroxyphenyl)methylene]-3,5-dihydro-2-methyl-3-(2,2,2-trifluoroethyl)-4H-imidazole-4-one)

FACS - Fluorescence-activated cell sorting (fluorescence-activated cell sorting)

FDA - Food and Drug Administration (Food and Drug Administration - an agency of the US Department of Health and Human Services)

GFP - green fluorescent protein (green fluorescent protein)

His - histidine

Lac - lactose

LB - Luria-Bertani medium for the cultivation of *Escherichia coli*

Leu - leucine

MBS - MS2 phage binding site (RNA sequence with which bacteriophage MS2 interacts)

MCP - MS2 coat protein (shell protein of bacteriophage MS2)

PBS - Phosphate buffered saline

PGAL - galactose promoter

RNAi - RNA interference

SGD - *Saccharomyces* genome database

Trp - tryptophan (tryptophan)

Ura - uracil (uracil)

UTR - untranslated region (untranslated region of mRNA)

VEGF - Vascular endothelial growth factor

YPD - Yeast Extract Peptone Dextrose (yeast nutrient medium containing yeast extract, peptone, glucose)

XRN1 - 5'3' exoribonuclease 1

Zeo - zeocin antibiotic

INTRODUCTION

Relevance of the research topic

Aptamers are synthetic DNA and RNA oligonucleotides with a specific three-dimensional structure, which interact with various targets with high affinity and specificity, ranging from molecules to cells. Due to these features, aptamers are used in fundamental research, as well as for applied purposes (Shanaa O.A. *et al.*, 2021; Niederlender *et al.*, 2021; Srivastava *et al.*, 2021; Razlansari *et al.*, 2022).

RNA aptamers are of particular interest given the variety of structural motifs found in RNA molecules, facilitating the development of aptamer variants with specific conformations to interact with specific targets and ligands. Currently, the main methods for obtaining RNA aptamers are chemical or enzymatic using *in vitro* synthesis, and both are associated with high cost and low productivity. Synthesis of RNA aptamers *in vivo* is an important aspect of RNA nanotechnology. In this work, the yeast *Saccharomyces cerevisiae* was used to synthesize RNA aptamers *in vivo*. *S. cerevisiae* yeast was chosen as a producer of RNA aptamers due to the absence of RNA interference components, which prolongs the lifetime of RNA molecules *in vivo*. In addition, the use of eukaryotic microorganisms for the synthesis of RNA aptamers allows us to evaluate the behavior, properties, and stability of such aptamers in higher eukaryotes.

The extent of development of the research topic

Establishing a robust platform for the biological synthesis of RNA aptamers represents a key step toward tapping the enormous advantages of RNA in biology and biomedicine. Aptamer and RNA nanoparticle therapies are still at their early stage, but the number of FDA-approved RNA-based therapeutics is increasing, and so is the demand for such

compounds. *S. cerevisiae* yeast is a eukaryotic model organism, with 23% of its genomes containing homologous genes within the human genome (Jiang *et al.*, 2006), allowing the microbe to be used to model human diseases (Smith and Snyder, 2006). Experiments on the "humanization" of yeast enable us to obtain authentic human proteins (Kachroo *et al.*, 2022). Despite the fact that the list of possible applications of RNA aptamers is supplemented every year, there is still no information about the possible effect of RNA aptamers on the eukaryotic organism. There is also no information on the efficient synthesis of functional RNA aptamers in yeast cells.

The aim and objectives of the research

The aim of this work was to create a platform for the synthesis of RNA aptamers *in vivo* using *S. cerevisiae* yeast cells, and to study the effect of aptamers on the biology of the producer strain. To achieve this goal, the following tasks were formulated:

1. Create a system for the synthesis of the Broccoli RNA aptamer in *S. cerevisiae*.
2. Evaluate system efficiency and optimize the synthesis of RNA aptamer.
3. Synthesize self-assembling RNA aptamers in yeast cells.
4. Evaluate the effect of aptamer synthesis on the level of gene transcription in the producer strain.
5. Study the effect of the deletion of XRN1 gene encoding exoribonuclease 1 on RNA aptamer stability, and the viability of the producer strain.

The scientific novelty of the research

In this work, we demonstrated for the first time the possibility of using *S. cerevisiae* as a platform for the synthesis of RNA aptamers *in vivo*. We obtained evidence for the successful synthesis and self-assembly of the RNA aptamer in yeast cells by using a fluorescent Broccoli RNA aptamer as a reporter system. We also demonstrated the effect of the Broccoli RNA molecule on *S. cerevisiae* yeast for the first time by analyzing the transcriptome of the aptamer-producing strain.

The theoretical and practical significance of the work

The results obtained in this work allow us to draw preliminary conclusions about the properties and stability of RNA aptamers *in vivo*, the possible effect of RNA aptamers on eukaryotic cells, and will also contribute to the development of research in the field of nucleic acid nanobiotechnology. The developed approaches for obtaining expression vectors for the Broccoli RNA aptamer and yeast strains producing this aptamer can be further used to synthesize various variants of RNA aptamers that are of interest for both biology and medicine.

Author's contribution to the study

The main results of the study were obtained by the author personally. The analysis of differential gene expression was carried out by the author together with a researcher at the Laboratory of Biochemical Genetics of the Department of Genetics and Biotechnology of St. Petersburg State University Rumyantsev Andrey Mikhailovich on the basis of the resource center "Development of Molecular and Cellular Technologies" of St. Petersburg State University. The bioinformatics analysis of the obtained results was carried out by the author together with A. M. Rumyantsev and the graduate student of the Faculty of Biology Sidorin Anton Vitalievich.

The fluorescence analysis of the Broccoli-DFHBI-1 RNA aptamer in yeast cells was carried out by A. M. Rumyantsev at the Resource Center of St. Petersburg State University "Observatory of Ecological Safety".

Methods of research

A wide range of modern methods of genetics, molecular biology, and microbiology were used to obtain the results of this study. Polymerase chain reaction, nucleic acid preparation, molecular cloning, bacterial and yeast transformation, fluorimetry. Transcriptomic analysis was carried out using new generation sequencing methods.

The main points made for the defense

1. The fundamental possibility of synthesizing a functional Broccoli RNA aptamer in *S. cerevisiae* yeast cells has been demonstrated.
2. The synthesis of the fluorescent Broccoli RNA aptamer leads to a change in the expression level of a number of *S. cerevisiae* yeast genes without affecting the viability of the producer strain.

The degree of validity and approbation of the results

The main results of the study were presented and discussed at three international conferences and published in four articles in peer-reviewed scientific journals:

1. Muzaev D.M., Rumyantsev A.M., **Al Shanaa O.R.**, Sambuk E.V. Selective system based on fragments of the M1 virus for the yeast *Saccharomyces cerevisiae* transformation // *Ecological genetics*. 2020. - Vol. 18, no. 2. P. 251-263
2. **Shanaa O.A.**, Rumyantsev A., Sambuk E., Padkina M. In Vivo Production of RNA Aptamers and Nanoparticles: Problems and Prospects // *Molecules*. 2021. Vol. 26, no. 5. P. 1422 (1-19)
3. Rumyantsev A., Sidorin A., Volkov A., **Al Shanaa O.**, Sambuk E., Padkina M. Transcriptome Analysis Unveils the Effects of Proline on Gene Expression in the Yeast *Komagataella phaffii* // *Microorganisms*. 2022. Vol. 10, no. P. 67 (1-16)
4. **Шанаа У.А.**, Румянцев А.М., Самбук Е.В., Падкина М.В. Синтез флуоресцентного РНК-аптамера Брокколи в клетках дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*// *Экологическая генетика*. 2022. Том 20 (4), стр. 339-348 (**Al Shanaa O.**, Rumyantsev A.M., Sambuk E.V., Padkina M.V. The synthesis of Broccoli RNA fluorescent aptamer in *Saccharomyces cerevisiae* yeast cells // *Ecological genetics*. 2022. Vol. 20, no 4. P. 339–348)

Financial support for work. The main part of the work was carried out within the framework of the Russian Foundation for Basic Research grant for postgraduate students No. 20–34–90139\20 “Development of approaches to the use of yeast as an object for the synthesis and study of the properties of RNA nanoparticles.”

The scope and structure of the work. The thesis consists of an introduction, a literature review, a materials and methods, results, a discussion, conclusions, a list of references containing 247 titles, and supplementary materials. The work is presented on 111 pages, contains 21 figures and 3 tables. Supplementary section includes 1 table,

1 LITERATURE REVIEW

1.1 DNA and RNA aptamer

The term "aptamer" is a hybrid word of Greek and Latin origin ('aptus' meaning suitable in Latin, and 'meros' meaning thing or part in Greek), literally meaning "fitting parts". Aptamers are artificial oligonucleotides capable of binding to target chemicals ranging from ions to specific cell surface proteins.

In 1990, two independent molecular biology teams from the US reported the very first steps of the study and development of aptamers. The first group from the University of Colorado in Boulder first described the main method for obtaining aptamers, abbreviated as SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment) (Tuerk, Gold, 1990). This method is based on the creation of a large number of random oligonucleotides subjected to several rounds of enrichment, including binding to a specific target, removal of unbound nucleotides, and modifications. This ensures that only oligonucleotides with the highest affinity for the target chemical are selected for further cloning and analysis.

A second group of researchers from the Department of Molecular Biology at the Massachusetts Hospital in Boston coined the term "aptamer" after using the SELEX method to select oligonucleotides that interact with a range of organic dye precursors. They found that only one in 10^{10} RNA aptamers was able to bind to a particular organic molecule (Ellington, Szostak, 1990).

At the time of writing the thesis, there are about 775 variants of aptamers with their targets in the Aptagen database of aptamers (<https://www.aptagen.com/apta-index/>), of which 448 are DNA aptamers and 177 are RNA aptamers, the rest are peptide, chimeric aptamers. It should be taken into account that the protein data bank (<https://www.rcsb.org/>)

contains 259 records of RNA aptamers, 119 records of DNA aptamers with available X-ray, NMR or electron microscopy images.

Aptamers are single-stranded oligonucleotides of RNA or DNA with a characteristic spatial structure, able to recognize and bind to various targets with high specificity (Figure 1).

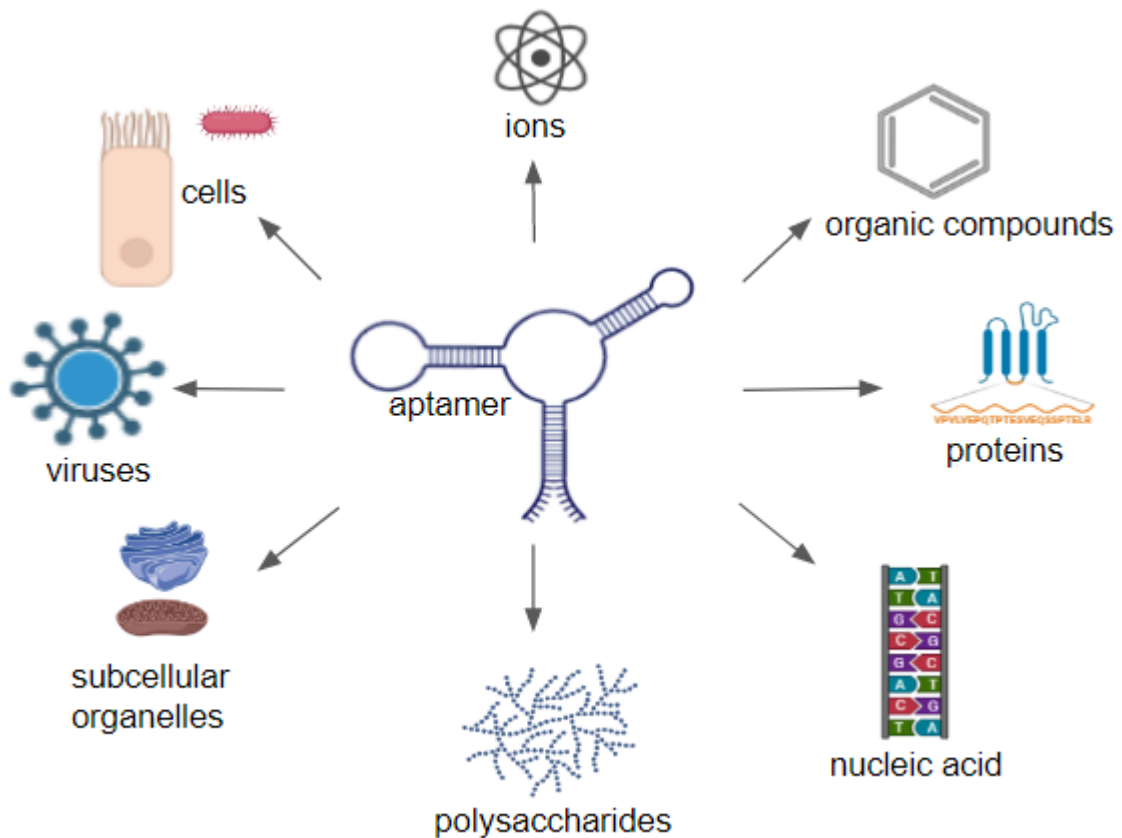


Figure 1. Possible targets for aptamers

Aptamers can bind to target chemicals, including ions (Qu *et al.*, 2016), organic compounds (Ruscito, DeRosa, 2016; Miyagawa *et al.*, 2020), proteins (Wang *et al.*, 2020), nucleic acids (Park *et al.*, 2016; Xie *et al.*, 2020), polysaccharides (Low *et al.*, 2009), subcellular organelles (Xie *et al.*, 2020), viruses, prokaryotic and eukaryotic cells (Rahimizadeh *et al.*, 2017; Kolm *et al.*, 2020).

1.1.1 Improvement of methods for the selection and synthesis of RNA aptamers

The classic version of SELEX uses a library of random sequences of single-stranded DNA or RNA, in which unique oligonucleotide sequences are flanked by the same 3' and 5' sequences. In repeated cycles that include 3 steps: a) binding of an oligonucleotides library to a specific target, b) removal of unbound oligonucleotides, c) amplification of bound oligonucleotides by PCR using common 3' and 5' sequences. The library is enriched with oligonucleotides that have an affinity for the target molecule. After the enrichment of the library is completed, the nucleotide sequences of the selected oligonucleotides are determined and synthesized in amounts necessary to perform functional tests (Tuerk, Gold, 1990). SELEX is considered the primary method for generating aptamers, but this method has been greatly improved since it was first introduced in the early 1990s to reduce selection time and increase the likelihood of aptamer-target interaction (Aquino-Jarquín, Toscano-Garibay, 2011; Zhuo *et al.*, 2017; Buglak *et al.*, 2020; Lee *et al.*, 2023). In recent years, many modifications of the SELEX technology have appeared that use advances in sequencing, chromatography, electrophoresis, cloning, and bioinformatics. This significantly increased the efficiency of the technology and accelerated the process of obtaining the required aptamers. The developed methods for automatic selection of aptamers allow the simultaneous acquisition of aptamers against a large number of different targets (Eulberg *et al.*, 2005). Table 1 summarizes some of the key modifications and improvements to the SELEX method for designing RNA aptamers.

Table 1. Modifications of the SELEX method for the production of RNA aptamers.

Method	Advantage	Application
Negative SELEX (Ellington, Szostak, 1992)	Reduced non-specific interactions with stationary targets	Biosensors for organic dyes

Counter SELEX (Jenison <i>et al.</i> , 1994)	Development of aptamers with co-affinity for similar targets	Bronchodilator theophylline biosensor
Mixed SELEX (Smith <i>et al.</i> , 1995)	Enrichment of the combinatorial pool for obtaining drugs	Neutrophil elastase inhibitor (valP)
Photo-SELEX (Jensen <i>et al.</i> , 1995)	Ensuring covalent cross-linking through the use of photosensitive nucleotides	Covalent attachment of human immunodeficiency virus type 1 Rev protein
<i>In vivo</i> SELEX (Coulter <i>et al.</i> , 1997)	Selection of aptamers targeting organic and biomolecules in living organisms	Discovering of splicing enhancer sites
Chimeric SELEX (Burke, Willis, 1998)	Fusion of two aptamers to facilitate assembly of bifunctional molecules and reactions of two neighboring molecules	Improving the understanding of RNA functions, and the RNA World Hypothesis
Cellular SELEX (Homann, Göringer, 1999)	Recognition of whole living cells with multiple targets	RNA ligands of living African trypanosomes
Indirect SELEX (Kawakami <i>et al.</i> , 2000)	Modulation of aptamer function <i>in vivo</i> via induction	Aptamers for binding to target proteins after induction with divalent ions such as Zn ²⁺
Toggle SELEX (Bianchini <i>et al.</i> , 2001; White <i>et al.</i> , 2001)	Obtaining aptamers capable of binding to Intact and denatured proteins, as well as aptamers with cross-reactivity between species	Development of diagnostic kits and preclinical studies of drug candidates
SELEX with capillary electrophoresis (Mendonsa, Bowser, 2004)	Reducing the selection time and the number of rounds after the formation, dissociation and separation of the aptamer-target complex	Aptamers with high specificity for human IgE compared to human IgG or mouse IgE
FluMag SELEX (Stoltenburg <i>et al.</i> , 2005)	Preparation of fluorescent aptamers and the use of magnetic beads for target immobilization facilitates the	Streptavidin-specific aptamers used to bind magnetic beads to

	separation of bound and unbound aptamers	biotinylated molecules
Atomic Force Microscopy SELEX (Peng <i>et al.</i> , 2007)	Identification of aptamer-target complexes using fluorescent signals in one selection cycle from a limited set of random oligonucleotides	The thrombin aptamer was successfully detected, visualized, isolated and then characterized by PCR amplification and sequencing.
Microfluidics SELEX (Huang <i>et al.</i> , 2010)	Using microcapillaries and liquid chips to test the effect of various reagents on aptamer activity	Aptamers against C-reactive protein
Aptamer secondary structure predictions <i>in silico</i> (Zuker, 2003; Xu <i>et al.</i> , 2014)	Using the Vfold2d and RNAfold servers with free energy analysis and aptamer sequence configuration	Design of the theophylline aptamer (Chushak, Stone, 2009)
Aptamer tertiary structure predictions <i>in silico</i>	Using the Vfold3D and 3dRNA servers to predict the aptamer tertiary structure based on the features of secondary structures (Wang <i>et al.</i> , 2019)	Aptamers against <i>Streptococcus agalactiae</i> surface receptor protein (PDB identifier: 2XTL)
Structure prediction of the guanine quadruplex (G4) <i>in silico</i>	Using machine learning technology to predict Hoogsten hydrogen bonds formed between nucleic acid and target proteins, for example, using pqsfinder (Hon <i>et al.</i> , 2017; Puig Lombardi, Londoño-Vallejo, 2019)	G4 aptamers with high resistance to serum nucleases are used as antitumor and anticoagulant drugs (Roxo <i>et al.</i> , 2019)
Molecular docking <i>in silico</i>	Used after the structure prediction steps to predict the best aptamer and target binding site and select the lowest binding energy e.g. DOCK and rDock (Escamilla-Gutierrez <i>et al.</i> , 2021).	The cytochrome p450 aptamer was designed using DOCK (Shcherbinin <i>et al.</i> , 2015)
Simulation of	Used to assess the stability of the	Study of flavin RNA

molecular dynamics <i>in silico</i>	aptamer-target complex and calculate the binding energy between atoms participating in the complex as AMBER and GROMACS (Buglak <i>et al.</i> , 2020)	aptamer (Ruan <i>et al.</i> , 2017)
Virtual Screening	AI and machine learning tools used to analyze large amounts of aptamer-target interaction data can save time and labor when generating new aptamers (Zhuo <i>et al.</i> , 2020; Iwano <i>et al.</i> , 2022; Kallert <i>et al.</i> , 2022).	RNA aptamers against the protease of the SARS-CoV-2 virus protease (Morena <i>et al.</i> , 2021)

1.1.2 Aptamers in basic and applied research

Aptamers with a reporter group are used to identify and localize various molecules in the cell and evaluate their participation in certain biological processes (Dougherty *et al.*, 2015; Goldsworthy *et al.*, 2018).

Aptamers can be used to identify specific protein sequences responsible for interactions with nucleic acids and isolate such proteins (Cox *et al.*, 2002; Lönne *et al.*, 2015; Qiao *et al.*, 2015; Moccia *et al.*, 2019). Aptamers can regulate transcription by acting as competitive inhibitors of transcription factors (Wurster *et al.*, 2009).

Aptamers capable of recognizing pathogenic microorganisms can be used as sensors for their detection (Nagarkatti *et al.*, 2012; Paniel, Noguier, 2019).

A DNA aptamer that binds and inhibits thrombin can be used to create an anticoagulant drug (Zavyalova *et al.*, 2017). In 2004, the first FDA-approved RNA aptamer drug for the treatment of neovascular age-related macular degeneration, called Pegaptanib or Macugen, was introduced. Aptamer has an anti-angiogenetic effect, inhibiting the formation of excess blood vessels by binding to vascular endothelial growth factor. A number of RNA-based therapeutic, diagnostic, prophylactic, and sensory agents are being

investigated in relation to advances in manufacturing, modification, and delivery (Su, Hammond, 2020; Kowalzik *et al.*, 2021; Zhang, Zhang, 2022).

Aptamers with a reporter group can be used to diagnose diseases, localize tumors, and target proteins associated with various pathologies (Zhou *et al.*, 2014; Dougherty *et al.*, 2015; Hassanzadeh *et al.*, 2018). Traditionally, antibodies have been used for this purpose. Due to the three-dimensional structure and specificity of binding to certain targets, aptamers can be considered as promising substitutes for antibodies. Aptamers, often referred to as "chemical antibodies", do not have the disadvantages of classical antibodies (Chen, Yang, 2015).

The most well-known method for obtaining antibodies is based on the immunization of animals with the analyte. Not all compounds are immunogenic, and obtaining suitable antibodies requires the use of expensive and laborious methods (Hoogenboom, 2005; Rajesh *et al.*, 2013). There is no such problem for aptamers; specific aptamers can be obtained for different classes of analyzed substances from ions and small molecules (Baker *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2018) to macromolecules and microorganisms (Zou *et al.*, 2019; Tyagi *et al.*, 2020). At the same time, aptamers are much more stable than antibodies, and even after denaturation they are able to restore their original three-dimensional structure (Thiviyanathan, Gorenstein, 2012).

1.1.3 Functional and structural diversity of RNA as a basis for obtaining aptamers

RNA molecules have always attracted great attention from researchers due to the variety of their functions, the list of which is constantly expanding (Breaker, Joyce, 2014). In addition to messenger RNA (mRNA), which ensures the transfer of genetic information encoded in the genome to the translation apparatus, there are a large number of non-coding RNAs involved in the implementation and regulation of various cellular processes. This includes transcription, maturation of various types of RNA, and translation. Highly

structured transfer RNA (tRNA) and ribosomal RNA (rRNA) are involved in translation, tRNA serves as an adapter molecule (Hoagland, 1996), rRNA is the structural and catalytic basis of ribosomes (Nissen *et al.*, 2020).

Natural and synthetic ribozymes have enzymatic activity (Pace *et al.*, 1987; Zaug, Cech, 1987; Bartel, Szostak, 1993; Felletti, Hartig, 2017; Nissen *et al.*, 2020). Bacterial small RNAs (Grigorov *et al.*, 2017); miRNA (miRNA) (Pasquinelli, 2012); and small interfering RNA (siRNA) (Cejka *et al.*, 2006) are involved in the regulation of gene expression and translation. Small nuclear RNAs (snRNAs) are involved in the splicing of eukaryotic messenger RNAs (Stanek *et al.*, 2008). Small nucleolar RNAs provide chemical modifications (methylation and pseudouridylation) and maturation of eukaryotic rRNA (Jady, 2001). RNA aptamers selectively bind to various targets, affecting their functioning (Jady, 2001; Bouchard *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2018). Aptazymes combine the ability to bind a specific ligand with enzymatic activity (Felletti, Hartig, 2017). Riboswitches, RNA molecules, change their conformation and regulate gene expression in response to certain stimuli (McCown *et al.*, 2017).

The functional diversity of RNA allows us to elaborate on the huge potential of these molecules for the development of new drugs. Firstly, we should discuss aptamers, miRNAs, and small interfering RNAs. microRNAs and small interfering RNAs capable of regulating and suppressing protein synthesis can be used in the treatment of malignant tumors (Filleur *et al.*, 2003; Rupaimoole, Slack, 2017). The combination of miRNAs and siRNAs with aptamers can deliver the target molecule to a specific target (Zhou, Rossi, 2017; Dinis Ano Bom *et al.*, 2019).

A common problem with the practical use of RNA is the short half-life due to cleavage by blood serum by nucleases. The lifetime of an oligonucleotide in the blood does not exceed several tens of minutes, which is clearly not enough for RNA molecules to perform the required functions and limits their use for medical purposes. To prevent RNA hydrolysis by nucleases, various variants of chemical modification of nucleotides are developed to improve pharmacokinetic and pharmacodynamic properties, or to encapsulate RNA in

nanoparticles (Whitehead *et al.*, 2009; Gavrilov, Saltzman, 2012; Dinis Ano Bom *et al.*, 2019; Rajeev *et al.*, 2021).

The spatial structure of the aptamer and the functions it performs are interrelated. Structural motifs found in RNA molecules, such as: Y-like structural elements (3TWJ – three way junction) (Shu *et al.*, 2011), four-strand structures (4WJ – of four-way junction), similar to Holliday structures (Laing, Schlick, 2009), pseudoknots (Grabow *et al.*, 2011), etc., are used to develop RNA variants of a given conformation, which is necessary for interaction with specific targets and ligands.

During the synthesis of aptamers in living cells, the creation and maintenance of their necessary structure is often ensured by their incorporation into highly structured RNA scaffolds. One of the well-known scaffolds is tRNA, in particular human lysine tRNA (Ponchon *et al.*, 2013). The inclusion of aptamers in the anticodon stem of tRNA promotes their correct folding and the heterologous synthesis of aptamers in bacterial cells produces enough aptamers for biochemical experiments and crystallization (Ponchon *et al.*, 2013). It is also possible to use other scaffolds, for example, the 3WJ motif of the bacteriophage phi29 packaging RNA (Guo *et al.*, 2018). Also, *Vibrio proteolyticus* (V5) 5S rRNA was used as a scaffold for aptamers, in which the aptamer replaced the helix III-loop C fragment. Using V5, a functional aptamer interacting with the vascular endothelial growth factor, VEGF, was developed (Zhang *et al.*, 2009).

1.1.4 Fluorogenic RNA aptamers

The diversity of RNA functions in the cell stimulated the development of methods for detecting and studying the dynamics of RNA *in vivo* (Armitage, 2011).

One of the most popular RNA labeling methods for many years has been the MS2-MCP method, which is based on the high-affinity binding of bacteriophage coat protein MS2 (MCP) to a unique RNA hairpin sequence, the MS2-binding site (MBS). Cloning of the MBS sequence in the selected RNA and simultaneous synthesis of MCP fused with the GFP (green

fluorescent protein) fluorescent protein makes it possible to determine the localization of a particular RNA molecule in the cell (Tyagi, 2009; Hocine *et al.*, 2013).

However, background fluorescence from unbound MCP-GFP greatly affects the signal-to-noise ratio. In addition, bacteriophage MS2 envelope proteins associated with the MBS site in the 3'UTR of yeast mRNA were found to block the activity of Xrnp1 exonuclease and 5'-3'-degradation of the mRNA. This results in the accumulation of 3' mRNA fragments that still bind to MCP-GFP, making it difficult to localize full-length mRNA *in vivo* (Garcia, Parker, 2015).

An alternative way to visualize RNA is to use fluorogenic RNA aptamers (Dolgosheina, Unrau, 2016; Bouhedda *et al.*, 2017). Since RNA does not have its own fluorescence, it is necessary to have an exogenous chromophore whose fluorescence is induced upon interaction with the RNA aptamer. Fluorogenic RNA aptamers are a powerful tool for studying RNA, similar to GFP for studying proteins. Embedding a fluorogenic RNA aptamer into a target RNA molecule makes allows the visualization of RNA in the cell (Truong, Ferré-D'Amaré, 2019).

The best known fluorogenic RNA aptamers are the Mango and Spinach aptamers (Shanaa O.A. *et al.*, 2021). The combination of the SELEX technology and the FACS have enabled the development of a new version of the Spinach aptamer. This 112 nt aptamer, named Broccoli, activates the fluorescence of the DFHBI or DFHBI-1T dye, is more stable, folds faster, and does not require an *in vitro* tRNA scaffold (Figure 2).

The excitation and emission wavelengths of this aptamer are 472 nm and 507 nm, respectively (Filonov *et al.*, 2014; Weber, 2014). The Broccoli aptamer has a higher affinity for fluorophores, and Broccoli-DFHBI-1T produces a brighter signal than Spinach-DFHBI (Song *et al.*, 2013). Broccoli retains most of the G-quadruplex-forming nucleotides that form the DFHBI-binding pocket in Spinach2 and likely has a similar structure for interaction with DFHBI-1T (Filonov *et al.*, 2014; Weber, 2014). The secondary structure of Broccoli, containing a hairpin-stem-loop, creates aptamer dimers by replacing the terminal loop with

a second aptamer molecule, which leads to an increase in fluorescence by 70% (Filonov et al., 2014).

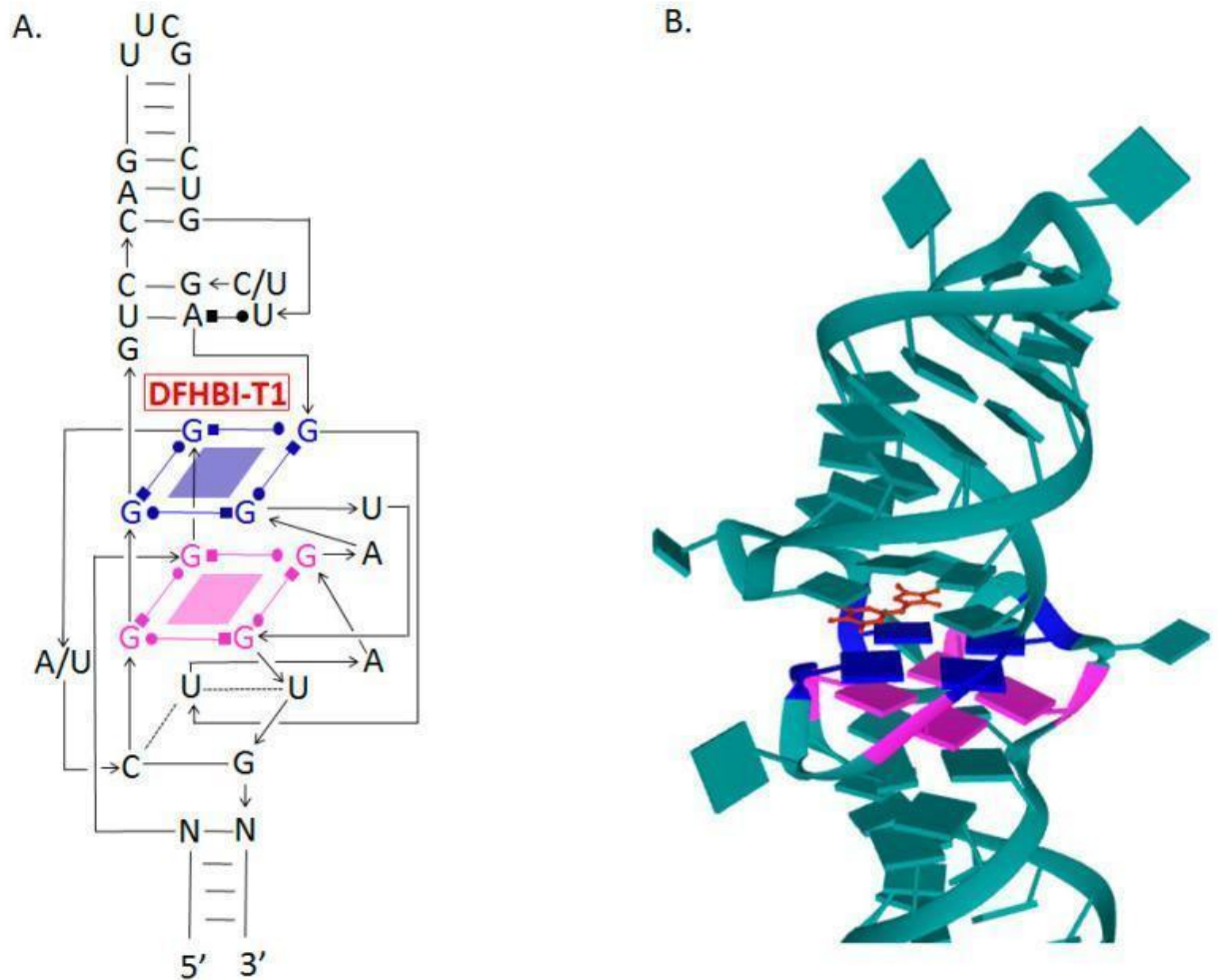


Figure 2. Secondary and tertiary structures of Broccoli and Spinach RNA aptamers. (A) Secondary structure of both aptamers showing two G-quadruplex regions serving as the binding site for the DFHBI-T1 fluorophore (Ouellet, 2016, with modifications). (B) Tertiary structure of the fluorophore binding site in the Spinach RNA aptamer (PDB ID: 6B14) (Koirala *et al.*, 2018, with modifications).

An additional advantage of Broccoli, like Spinach, is the ability to visualize them *in vitro*, fluorescence can be observed in microcentrifuge tubes (Paige *et al.*, 2011) or using polyacrylamide gel electrophoresis stained with DFHBI (Filonov *et al.*, 2015).

Spinach and Broccoli aptamers fused to a tRNA backbone have been successfully expressed in bacterial and mammalian cells. The ability of the Broccoli aptamer to fold *in vitro* without the aid of a tRNA scaffold was also confirmed *in vivo*. The aptamer RNA was fused to the 3' end of the 5S rRNA and the resulting plasmids were transfected into HEK293T cells. Using flow cytometry, 5S RNA-Broccoli was detected in the cells, and the brightness of the cells was higher compared to cells containing the 5S RNA-tRNA aptamer. This confirms the idea that the tRNA backbone is often cleaved by cellular nucleases and thus has a negative effect on the expression of RNA aptamers.

The expression of Broccoli-DFHBI-1T and Spinach-DFHBI aptamers as a part of 16S ribosomal RNA allows the visualization of ribosomes and provide a unique opportunity to study translation in prokaryotes (Okuda *et al.*, 2017).

Broccoli-DFHBI-1T and Spinach-DFHBI were inserted into the 5'-hairpin of one of the yeast H/CA small nucleolar RNAs (snoR30), which is involved in rRNA maturation. Plasmids containing these constructs under the control of the GAL promoter were transformed into yeast. The growth of the transformants did not differ from the growth of the original strains; aptamers did not disrupt the localization and function of snoR30 and provided fluorescence in the nucleoli (Zinskie *et al.*, 2018).

The Spinach2-tRNA and Broccoli-F30 aptamers were used to study the regulation of RNA synthesis of the SINV virus, which can cause seasonal outbreaks of rash and arthritis in humans and encephalomyelitis in experimentally infected mice. For this, aptamers were inserted into the 3'UTR of viral RNA. The resulting recombinant viruses replicated well in nerve cells and fibroblast cell culture. Fluorescence level correlated with Broccoli-F30 copy number (Nilaratanakul *et al.*, 2020).

Based on the Broccoli aptamer, a fluorometric RNA substrate was developed, the fluorescence of which was proportional to the activity of RNA-modifying enzymes. For this,

an aptamer variant with modified nucleotides such as N6-methyladenosine (m6A) was synthesized. Such an aptamer is not able to function normally; the work of special demethylases is required to restore its function. This approach facilitates research of not only for RNA-modifying enzymes, but also their inhibitors and factors affecting RNA methylation levels in living cells (Svensen, Jaffrey, 2016). Despite the improvement of methods for selecting the desired aptamers, the problem of obtaining the required quantities of aptamers for widespread use remains. As already mentioned, RNA aptamers are currently produced either by chemical synthesis or by *in vitro* transcription using a DNA template. Both methods are expensive and time consuming. The solution to the problem may be the heterologous synthesis of aptamers. The most suitable producer organism is the yeast *S. cerevisiae*.

1.2 *Saccharomyces cerevisiae* yeast in basic and applied research

S. cerevisiae yeast is a eukaryotic unicellular non-motile microbial organism belonging to the phylum *Ascomycetes*. It was first recognized as a fungal organism in 1838 after being isolated from the beer fermentation process, hence the name "beer sugar fungus" (Pontes *et al.*, 2020). Subsequently, this organism was isolated from different habitats, indicating different metabolic tolerance. The microorganism has been isolated from plants, fruits, insects, soil, salt water, skin, and the gastrointestinal tract of warm-blooded organisms (Goddard and Greig, 2015). Some opportunistic strains have also been found to cause infections in immunocompromised people (Pérez-Torrado, Querol, 2015; Fadhel *et al.*, 2019). Generally, non-pathogenic laboratory strains of *S. cerevisiae* are safe and only require biosafety level 1.

The first detailed description of the mechanism of regulation of gene expression was made on the example of the lactose operon of bacteria *Escherichia coli*. This discovery - important for understanding the central dogma of molecular biology - was soon confirmed by the example of other living objects. The study of the mechanisms of regulation of the

GAL genes and the action of transcription factors (in particular Gal4) demonstrated the presence of regulated gene expression in eukaryotic organisms. (Hahn, Young, 2011).

Similar to the *Lac* operon in *E. coli*, *S. cerevisiae* yeast has *GAL* genes. This feature allows yeast to use galactose as a non-fermentable carbon source in the absence of glucose. The Gal4 protein is a transcription factor that interacts with a specific sequence in the promoters of the *GAL* genes in the presence of galactose in the nutrient medium. This ensures the regulation of the expression of a number of structural and regulatory genes that provide intracellular transport and metabolism of galactose (Lohr *et al.*, 1995; Traven *et al.*, 2006). To date, researchers are actively using the promoter regions of the *GAL* genes to ensure the expression of genes of interest, regulated in response to the addition of galactose to the culture medium.

The developed mechanisms of homologous recombination is another natural property of yeast, which is successfully used in genetic research and biotechnology. This biological process exists in yeast to repair double-stranded DNA damage caused by ionizing radiation or oxidative stress. Homologous recombination occurs during meiosis, which contributes to genetic variation. In yeast, it also underlies the mechanism of mating type switching (Eckert-Boulet *et al.*, 2011; Jagadeesan *et al.*, 2022). Various methods and approaches used to introduce mutations or deletions into the yeast genome, as well as to integrate expression cassettes, are based on the passage of recombination between genomic DNA and genetic constructs delivered into the cell.

Overall, *S. cerevisiae* yeast has proven to be extremely useful in understanding key biological processes, which have won top scientific awards and paved the way for new avenues of research. In addition, yeast is actively used in practical areas of biology - industrial biotechnology and pharmaceuticals.

1.2.1 *Saccharomyces cerevisiae* yeast as a model organism to studying the mechanisms and regulation of basic biological processes in eukaryotes

The yeast genome shows a high degree of similarity compared to the human genome - 47% of the major yeast genes have human orthologues. At the same time, working with yeast helps circumvent various ethical or experimental restrictions that arise when working with higher eukaryotes. This allowed the successful use of *S. cerevisiae* as a model organism for studying a wide range of biological processes. (Karathia *et al.*, 2011; Nielsen, 2019).

Over the past 20 years, five Nobel Prizes have been awarded to researchers working on yeast in areas such as the study of autophagy processes, the actions of key cell cycle regulators, transcription, protection of chromosomes by telomeres and telomerase, and intracellular transport. Based on yeast, the mechanisms of development of various human diseases, such as oncological and neurodegenerative diseases, hereditary and metabolic disorders, and others, have been studied (Bolotin-Fukuhara *et al.*, 2010). This is another demonstration of the importance of yeast as a model object used in biology, genetics, and medicine.

The ability to conduct genetic analysis in yeast is facilitated by the fact that the genome of this organism was sequenced in 1996, the first of the eukaryotic genomes. The *S. cerevisiae* sequencing project took place in 19 countries, 94 laboratories. The *S. cerevisiae* genome has been found to contain about 12 million base pairs, on 16 chromosomes containing about 6,000 genes (Goffeau *et al.*, 1996). In addition to genome information, many databases are available for *S. cerevisiae* containing information on gene expression and regulatory networks, protein interaction networks, gene interaction networks, transcriptome, proteome, metabolome, and others (Botstein, Fink, 2011).

Early research into yeast genetics focused on the study of metabolic processes and their genetic control. This led not only to understanding the pathways for the synthesis of various amino acids, nitrogenous bases, and other compounds in yeast cells, but also allowed the implementation of the genes of a number of enzymes as convenient selective markers.

Indeed, markers of auxotrophy have proven to be a useful tool for genetic analysis. The most common auxotrophic marker genes include *URA3*, *HIS3*, *LEU2*, and *TRP1*, which encode the enzymes required for the synthesis of uracil, L-histidine, L-leucine, and L-tryptophan, respectively (Pronk, 2002; Barnett, 2007).

Another special tool of yeast genetics was based on the fact that each of the four ascospores produced by meiosis during the division of a diploid yeast cell can be separated from the others and grown into a colony. This method is called tetrad analysis (Winge, Laustsen, 1937), and it facilitates the determination of the presence of selective marker linkage and builds genetic maps. The use of genetic analysis in the yeast *S. cerevisiae* is also aided by the fact that most laboratory yeast strains are heterothallic due to the presence of endonuclease HO mutation. This allows researchers to conserve and maintain stable haploid strains.

The possibilities of using yeast as a model object have expanded significantly with the advent of the genomic era. To date, databases containing information on the role of genes, their interactions, expression levels under various conditions, and the functions of encoded proteins are available for *S. cerevisiae*. An example is the Saccharomyces Genome Database (SGD) (<https://www.yeastgenome.org>), which is one of the most famous databases for collecting all kinds of information about cellular processes in yeast, provided by scientists around the world.

1.2.2 *Saccharomyces cerevisiae* yeast - producer of recombinant proteins and other biologically active compounds

The range of applications of biopharmaceuticals is constantly expanding. Natural sources of the compounds used are often limited, and novel approaches are required to enable their large scale production to meet clinical needs.

The development of genetic engineering tools and sequencing of the genomes of living organisms allowed producer organisms to synthesize recombinant proteins and other

components of pharmaceutical preparations. One of the first examples is insulin, synthesized using *E. coli* bacteria. It was approved by the FDA and released to the market in 1982. After insulin, the growth hormone (GH) was commercially synthesized in *E. coli* bacteria in 1985 (Wang *et al.*, 2017). Currently, in addition to gonadotropic hormones, which are produced only in mammalian cells due to their specific glycosylation (Orvieto, Seifer, 2016), most other commercially available hormones are synthesized by recombinant *S. cerevisiae* (insulin, glucagon, GH) or *E. coli* (insulin, GH, glucagon, calcitonin, teriparatide) (Walsh, 2018). Over the past decades, the ever-expanding biopharmaceutical industry has seen a flourishing production of vaccines, therapeutic monoclonal antibodies, recombinant enzymes, and cytokines.

A significant number of recombinant proteins are synthesized in mammalian cells (mainly in Chinese hamster ovary cells, CHO), making their production a laborious and expensive process (Walsh, 2010). On the other hand, the use of bacteria as a producer organism is generally simpler and cheaper, but faces a number of limitations, such as the lack of necessary post-translational modifications, misfolding, potential immunogenicity, and poor stability of synthesized recombinant proteins. Yeast represents the "golden mean" between the two approaches. They combine both the advantages of unicellular producer microorganisms and the advantages of eukaryotic expression systems. In particular, yeast, like bacteria, is easily genetically manipulated and cost-effective. However, yeast, unlike *E. coli*, has an active post-translational modification mechanism and does not contain endotoxins (Demain, Vaishnav, 2009; Martínez *et al.*, 2012). One of the disadvantages of yeast strains producing target proteins is the presence of antibiotic resistance genes in the expression plasmids, which can lead to the emergence of antibiotic-resistant natural microorganisms (Zemlyanko *et al.*, 2018). A promising direction is the use of yeast killer toxin (mycotoxin) as a selective marker (Muzaev *et al.*, 2020).

Protein glycosylation in yeast differs from N- and O-glycosylation of human proteins. However, there are approaches to ensure the synthesis in yeast of proteins with glycosylation similar to the modification of mammalian proteins. For example, a corresponding

GlycoSwitch system has been developed in *Pichia pastoris* yeast. Yeasts have efficient folding and secretion systems for synthesized proteins (Martínez *et al.*, 2012; Laukens *et al.*, 2015; Huang *et al.*, 2018). As a result, today *S. cerevisiae* and other yeast species (in particular, *P. pastoris*, *Yarrowia lipolytica*, *Hansenula polymorpha*) are actively used for the synthesis of a wide variety of recombinant proteins.

Simultaneously with the successful use of yeast for protein synthesis, their use for the production of non-protein preparations is being developed. This is facilitated by the availability of detailed knowledge of metabolic processes obtained by studying *S. cerevisiae* as a model object. In particular, *S. cerevisiae* is used for industrial production of progesterone (Duport *et al.*, 1998), hydrocortisone (Szczebara *et al.*, 2003), and artemisic acid (a precursor of the antimalarial artemisinin) (Paddon *et al.*, 2013).

On another note, there are modern studies aimed at using *S. cerevisiae* yeast for the production and delivery of small RNA molecules.

1.2.3 Prospects of using *Saccharomyces cerevisiae* to produce RNA aptamers

Among putative eukaryotic organisms selected to produce aptamers and nanoparticles, *S. cerevisiae* yeast is of the greatest interest. This is due not only to the combination of ease of cultivation with the possibility of complex genetic manipulations, but also to the conservatism of many key processes in yeast and mammalian cells. One of the interesting features of *S. cerevisiae* is the absence of native RNA interference system, which has been lost during the course of evolution. Accordingly, stable endogenous RNA structures are maintained in the cell, supported by the example of double-stranded RNA viruses of the genus Totivirus (L-A viruses) and single-stranded RNA viruses of the genus Narnavirus of the family Narnaviridae (Wickner *et al.*, 2013). *S. cerevisiae* yeast is also considered as a promising system for the synthesis and delivery of small interfering RNAs (Duman-Scheel, 2019). A significant advantage of using eukaryotic organisms for the production of aptamers

and RNA nanoparticles compared to bacteria is also the absence of endotoxins in eukaryotes, which simplifies the purification of the compounds of interest and their preparation for use in medicine (Terpe, 2006).

For the synthesis of RNA aptamers or RNA nanoparticles, *S. cerevisiae* yeast strains with the structural gene of phage T7 RNA polymerase integrated into the genome can be used (Dower, Rosbash, 2002; Hobl *et al.*, 2013; Duman-Scheel, 2019). Transformation of such strains with plasmids containing the required nucleotide sequence under the control of the T7 promoter will provide the synthesis of the RNA of interest.

In addition to the above-mentioned important aspects of the present work, the experiments involving the yeast *S. cerevisiae* and the RNA aptamer provide a good educational platform for teaching students about various aspects of modern molecular genetics and biotechnology. The safety aspects of *S. cerevisiae* aid the teaching process of synthetic biology, cell biology, and omics technologies (Macreadie, Dhakal, 2022). Broccoli RNA aptamer is a model not only for mastering laboratory methods focused on nucleic acid research, but also for studying RNA nanotechnology and nanostructures (Sajja *et al.*, 2018).

Delivery systems of RNA therapeutics based on yeasts can be in demand for vaccines and gene therapy in the future (Ivanova, 2021). *S. cerevisiae* yeast was used to deliver shRNA and suppress the expression of the interleukin-1 β gene due to RNA interference directed at the mRNA encoding this protein (Zhang *et al.*, 2021). Recombinant yeast strains capable of producing the desired shRNA (short hairpin) transcripts were enclosed in microcapsules that were engulfed by macrophages. The use of yeast as a gene therapy delivery system may provide immunomodulatory therapy for joint degeneration. A recombinant *S. cerevisiae* strain synthesizing the cytomegalovirus phosphoprotein pp65 has been used to deliver mRNA to dendritic cells; this can be considered as a new type of live vaccine (Walch *et al.*, 2011). Yeast cell uptake by leukocytes did not interfere with the growth or function of antigen presenting cells (Breinig *et al.*, 2003).

Numerous publications devoted to the use of aptamers and RNA nanoparticles with the corresponding ligands demonstrate the positive experience of their application both in

biology and medicine. Therefore, the development and improvement of methods for obtaining aptamers is an urgent task. Achievements of modern biotechnology accelerate the development of producer organisms of biologically active compounds and various macromolecules. Synthesis of RNA aptamers *in vivo* is an important element of RNA nanotechnology. Work on obtaining producer organisms of aptamers and RNA nanoparticles continues, but they are still limited to the use of *E. coli* bacteria (Li *et al.*, 2018). Obtaining functional RNA aptamers in eukaryotic cells seems to be especially important because it includes the following: produce aptamers, study their properties and stability inside cells, and evaluate the potential aptamer action on the state of the eukaryotic cell itself.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 *Escherichia coli* bacterial strains and *Saccharomyces cerevisiae* yeast strains

In this work, we used the bacterial strain *E. coli* DH5 alpha (F⁻ ϕ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169 recA1 endA1 hsdR17(rK⁻, mK⁺) phoA supE44 λ ⁻ thi-1 gyrA96 relA1) (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) for plasmid amplification.

To synthesize the Broccoli RNA aptamer, we used the yeast strain *S. cerevisiae* D623 (ura3 lys2 leu2 trp1), obtained in the spore progeny of a diploid by crossing 1-GRF18 (his3 leu2 pho3) from the collection of strains of the laboratory of biochemical genetics and YM954 (ura3 his3 ade2 lys2 leu2 trp1 gal4 gal80) (Clonotech, USA)

2.2 Culture media and growth conditions

E. coli bacteria were cultivated using liquid and solid LB (1% tryptone, 0.5% yeast extract, 171 mM NaCl) and TYM (0.8% tryptone, 0.5% yeast extract, 85 mM NaCl) media. Solid media were obtained by adding 2.4% agar. To select the transformants, Zeocin antibiotic (Invitrogen, United States) - 20–1000 μ g/mL, ampicillin - 500 μ g/mL was added to the solid media.

For yeast cultivation, complete YEPD media (yeast extract 1%, peptone 2%, D-glucose 2%), YEPDS (YEPD supplemented with 1 M sorbitol), and minimal Md medium [1% glucose; 0.9 mM CaCl₂, 37.85 mM (NH₄)₂SO₄, 7.34 mM KH₂PO₄, 0.95 mM K₂HPO₄·2H₂O, 4 mM MgSO₄·7H₂O, 1.7 mM NaCl; vitamins, trace elements - 400 μ l/ml 2500x solution] were used. When necessary, amino acids were added to the Md medium: histidine, 5 mg/L, leucine, 5 mg/L, tryptophan, 5 mg/L, and the nitrogenous base uracil, 5

mg/L. Solid media contained 2.4% agar. Yeast transformants were cultivated on minimal Md medium supplemented with essential amino acids and various carbon sources, 2% glucose or 2% galactose.

Bacteria were cultivated at 37°C, yeast at 30°C in a thermostatically controlled shaker at 180 rpm.

2.3 Plasmids used in the study

The study used a range of plasmids to generate genetic constructs in bacteria and to express genes in yeast. We used commercial plasmids and plasmids obtained during the work (table 2)

Table 2. Plasmids used in the study

Plasmid name	Main features of the plasmids		Source
	Promoter, terminator and cloned sequence	Selective marker	
pUC57x2Broccoli	x2Broccoli	<i>Amp^R</i>	Lumiprobe, Russia
pYES2	Promoter GAL, MCS, terminatorCYC1	<i>URA3</i> , <i>Amp^R</i>	Thermo Fisher Scientific Inc., USA
pYES2-PGAL-Br-TC	Promoter GAL-x2Broccoli-terminator CYC1	<i>URA3</i> , <i>Amp^R</i>	Obtained in this work
pYES2-PSNR-Br-TS	Promoter SNR52-x2Broccoli-	<i>URA3</i> , <i>Amp^R</i>	Obtained in this work

	terminator SUP4		
pPICZ α B	Promoter AOX1, alpha- factor, MCS, Myc epitope, 6His, terminatorAOX1	<i>Zeo^R</i>	Thermo Fisher Scientific Inc., USA
pPICZ-5'-3'-XRN1	Promoter AOX1, alpha- factor, MCS, Myc epitope, 6His, 3'HA_5'HA XRN1, terminatorAOX1	<i>Zeo^R</i>	Obtained in this work

*MCS (multiple cloning site), p - plasmid, P - promoter, 6His - nucleotide sequence encoding 6 histidine residues, c-myc epitope - nucleotide sequence encoding amino acids recognized by monoclonal antibodies, HA (homologous arms) - nucleotide sequences flanking the *XRN1* gene.

2.4 Transformation of bacteria

Competent cells for transformation were prepared according to the proposed method (Passarinha, 2021).

The transformation of bacteria by the heat shock method was carried out according to the method (Hanahan, 1983). To select transformants, bacterial cells were grown on LB medium with an antibiotic (ampicillin/zeocin).

2.5 Transformation of yeast

For the transformation of yeast by electroporation we used previously described methods with modifications (Muzaev *et al.*, 2020). A fresh overnight culture in YEPD was centrifuged in a 1.5 ml tube for 2 minutes at 7000 rpm. Next, the supernatant was removed and the cells were incubated at room temperature for 30 minutes in 500 µl of electroporation buffer (100 mM LiAc, 10 mM DTT, 0.6 M sorbitol, 10 mM Tris-HCl pH 7.5). The cells were then centrifuged for 3 minutes in a cooled rotor at 7000 rpm, and the supernatant was removed. The cells were later resuspended in 500 µl of 1 M chilled sorbitol, centrifuged, and this step was repeated 3 times. The resulting supernatant was decanted and a DNA solution in 80 µl of 1 M sorbitol was added and the cells were resuspended. Next, the sample was transferred into sterilized and cooled cuvettes and electroporated (with a potential difference of 1600 V for 5 ms). After electroporation, 500 µl of cold 1 M sorbitol was immediately added to the cuvette, and the cells were incubated for 1 hour at 30°C. The last step included centrifugation for 2 minutes at 7000 rpm, removal of the supernatant, resuspension of cells in sorbitol residues, and cultivation of cells on plates with selective medium.

2.6 Molecular biology methods

2.6.1 Isolation of plasmid DNA

Isolation of plasmid DNA from bacterial cells using the Plasmid Miniprep kit (Evrogen, Russia) was performed according to the manufacturer's protocol.

DNA isolation from reaction mixtures and agarose gels was performed using the Cleanup Standard kit (Evrogen, Russia).

2.6.2 Isolation of yeast chromosomal DNA

To isolate chromosomal DNA from yeast cells (Guthrie, Fink, 1991), the yeast was grown in YEPD medium up to $OD_{600} = 0.5$. Then, 1 ml of the inoculum was centrifuged for 2 min. (7000 rpm). After removing the supernatant, the cells were washed with sterilized deionized water. Cells were suspended in 500 μ l of buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 20 mM EDTA, 1% SDS). 0.6 g of Ballotini glass beads was added to the mixture, and it was vortexed for 15 min. at 0°C to disrupt cells. The mixture was incubated for 10 min. at 70°C and 20 μ l of 5 M CH_3COOK and 150 μ l of 5 M NaCl were added. Then, the cells were incubated for 20 min. at 0°C and centrifuged for 20 minutes (13400 rpm). The supernatant was collected into a new tube and treated twice with chloroform. To do this, an equal volume of chloroform was added to the supernatant, the mixture was stirred and centrifuged for 10 min. (13400 rpm), after which, the aqueous layer on top was transferred into a new tube. Next, 3 M CH_3COONa (pH = 5.2) was added to the mixture containing DNA in a volume equal to 1/10 V of the DNA solution and 2 total volumes of 96% ethanol. The mixture was stirred and incubated for 20 min. at -70°C , then centrifuged for 15 min. (13400 rpm). The supernatant was removed and the pellet was washed twice with 70% ethanol. Next, the DNA was dried in a vacuum concentrator, after which the DNA was dissolved in deionized H_2O or in 1 M sorbitol.

2.6.3 Polymerase chain reaction

For the amplification of the DNA sequences, the PCR method was used using a set of reagents, Encyclo polymerase (Evrogen, Russia), and primers (table 3). PCR was performed in a thermal cycler (T100 Biorad, USA) using the following program:

94 $^{\circ}\text{C}$ - 3 minutes (1 cycle)

94 $^{\circ}\text{C}$ - 30 seconds; 52 $^{\circ}\text{C}$ - 30 seconds; 70 $^{\circ}\text{C}$ - 85 seconds (30 cycles)

72 $^{\circ}\text{C}$ - 5 minutes (1 cycle)

The gradient PCR used a range of different primer annealing temperatures (between 40 and 60°C).

Table 3. Primers used in the work

Primer	Sequence (5'→3')
PGAL-F-BamHI	<u>GGATCC</u> ACTAGTACGGATTAGAAG
PGAL R	TCGTCCTCACGGACTCATCAGGTTGCCCTTAATATTCCCTA TAGTGAGTCG
Broccoli2 F	GATGAGTCCGTGAGGACGAAACGAGTAAGCTCGTCGTTGC CATGTGTATGTGG
Broccoli2 R	TGCCGGCCGTTGCCATGAATGATCCC
CYC1-R-PstI	<u>CTGCAGTACGGT</u> TCCCGAAGTATG
PSNR2xBroc- AgeI-F	ATTACAACCGGTCACACAGGAAACAGCTATGAC
PSNR2xBroc- BsrGI-R	ATTACATGTACAAGACATAAAAAACAAAAAATGAAGCT TGCCATGAATGA
PSNR2xBr-R	AGTGGATCATTATCTTTCACTGC
PSNR2xBr-F	AGATAAATGATCCACTGGTTCCAATTGTATTGC
5'HA F	CAAACATTGTGCCCACTAC
5'HA R	CTCCTTATAGTACACGAATCGTC
3'HA F	ATTAATGGTAAACAGCACAGC

3'HA R	GGTGTCCACAGATCAAATG
3'XRN-HA-F	ATACAGGATCCATTAATGGTAAACAGCACAGC
5'XRN-HA-R	ATACAGGATCCCTCCTTATAGTACACGAATCGTC
5'XRN-HA-F	GTGGACACCGAATTCCAAACATTGTGCCCACTAC
3'XRN-HA-R	CACAATGTTTGGAAATTCGGTGTCCACAGATCAAATG
5'HA-ZeoR-F	AGGATACTGTCTTCTTCCGTACTTATAATCGGGTTCACACA CCATAGCTTCAAATG
3'HA-ZeoR-R	TGTTTACCATTAATGAATTTTTTCAAATCTTGGCTTTTGCTC ACATGTTGGTCT

2.6.4 Restriction and ligation of DNA fragments

DNA hydrolysis and vector dephosphorylation were performed in buffers and under the conditions proposed by the enzyme manufacturer (Thermo Fisher Scientific Inc., USA).

Ligation of DNA fragments was performed using T4 DNA ligase (Evrogen, Russia) according to the manufacturer's protocol.

2.6.5 Electrophoretic separation of DNA

Electrophoresis was performed in a horizontal Sub-Cell GT Cell (Bio-Rad, USA). TAE buffer (40 mM Tris-HCl pH 7.0; 20 mM acetic acid; 1 mM EDTA) was used for electrophoresis and agarose gel preparation. DNA fragments were separated at an electric field strength of 5 V/cm. To visualize DNA, ethidium bromide was added to agarose gel to a final concentration of 0.5 µg/ml (Helikon, Russia) and recorded using a UV

transilluminator at a wavelength of 365 nm. The DNA length marker 1 kb DNA Ladder and the DNA length marker 100+ bp DNA Ladder (Evrogen, Russia) were used as markers.

2.6.6 DNA sequencing

To confirm the structure of the obtained plasmids, Sanger sequencing was performed at the Resource Center of St. Petersburg State University "Development of Molecular and Cellular Technologies" on an ABI Prism 3500 xl automatic capillary sequencer (Applied Biosystems, USA). For sequencing, primers specific to the analyzed sequences were used (Table 3).

2.7 Fluorescence analysis of yeast cells

To analyze the fluorescence of the RNA aptamer, 1 ml of yeast suspension after growing in a certain medium was collected by centrifugation at 6000 rpm for 2 minutes, washed with 0.5 ml of PBS buffer (200 mg/l, KCl, 200 mg/l KH_2PO_4 , 8 g/l NaCl, pH 7.4), centrifuged under the same conditions. 100 μl of PBS buffer with DFHBI-1T dye at a concentration of 500 μM was added to the pellet and incubated for 1 hour. Then the cells were collected by centrifugation, washed 2 times with PBS buffer to remove residual dye, and resuspended in 1 ml of PBS buffer. In complex with the Broccoli aptamer, the DFHBI-1T dye has absorption and emission maxima at 482 nm and 505 nm, respectively. Thus, to measure its fluorescence, the equipment and filters used when working with green fluorescent protein (GFP) were used. The fluorescence intensity was measured on a spectrofluorometer at the Resource Center of St. Petersburg State University "Observatory of Ecological Safety".

2.8 Transcriptome analysis

2.8.1 Total RNA extraction from yeast

The total yeast RNA was isolated using the YeaStar RNA Kit (Zymo Research, USA). The quality of the obtained RNA was evaluated using agarose gel electrophoresis. After isolation, the RNA was treated with DNase 1 according to the recommendations of the manufacturer (Thermo Fisher Scientific Inc., USA). After processing, the RNA was purified again using the CleanRNA Standard kit (Eurogen, Russia). The RNA concentration was determined using a Nanodrop spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific Inc., USA).

2.8.2 cDNA library construction and sequencing

300 ng of total RNA of each sample was used to prepare libraries using the QuantSeq 3' mRNA-Seq Library Prep Kit FWD for Illumina (cat #015.96, Lexogen, Austria). Qualitative and quantitative analysis of samples was performed using a Qubit fluorimeter and capillary electrophoresis in the Agilent 2200 TapeStation System. Sequencing was performed using the MiSeq Reagent Kit v2, (1x300, cat. #MS-102-2002, Illumina, USA) on the MiSeq sequencer (Rumyantsev *et al.*, 2022).

2.8.3 Analysis of differential expression of yeast genes

With the help of the program Trimomatic, adapters and indexes were removed and readings were filtered out. The quality of the readings was checked using the FastQC program. The genome of *S. cerevisiae* yeast strain S288C (GCA_000146045.2 R64) and an annotation from the NCBI database (National Center for Biotechnology Information) were used for alignment. Readings were aligned using hisat-2 with standard parameters. After alignment, the readings were sorted and indexed using samtools. The featurepoints program was used to calculate the number of aligned readings. Differential gene expression was

analyzed using the R programming language (version 3.6.3) and the DESeq2 library (version 1.24.0). For further analysis, genes were used whose adjusted p-value was less than 0.05 and the value of the logarithm of expression change ($\log_2\text{FoldChange}$) was greater than 0.5 modulo (Rumyantsev *et al.*, 2022).

2.9 Statistical processing of data

Statistical processing of the obtained data was carried out using the R-Studio software package (version R 3.5.1). The analysis of samples was carried out using the Mann - Whitney U—test.

3 RESULTS

3.1 Development of a reporter construct based on the Broccoli RNA aptamer

To develop an efficient system for the synthesis of short RNA molecules in yeast cells, it is necessary to determine and analyze the amount and stability of the synthesized molecules and optimize the conditions for cultivating the producer strains. For this purpose, a convenient reporter system based on the Broccoli RNA aptamer was developed and obtained.

The Broccoli aptamer is a 112 nucleotide RNA transcript consisting of two partially complementary sequences. The synthesized aptamer begins to fluoresce only after the formation of the correct secondary structure and interaction with the DFHBI-1T dye (empirical formula $C_{13}H_9F_5N_2O_2$). The fluorophore molecule is non-toxic and can easily pass through the cell membrane. Thus, by analyzing cell fluorescence, one can evaluate the level of reporter aptamer synthesis and the efficiency of the expression vectors used (Filonov *et al.*, 2016).

The structure of the Broccoli aptamer and its relatively small size allows obtaining aptamer dimers. This leads to an increase in fluorescence by about 70% (Ouellet, 2016).

To clone the Broccoli aptamer, we used two variants of expression cassettes: in the first case, the duplicated aptamer sequence was under the control of the *GAL1* inducible and regulated promoter recognized by RNA polymerase II; in the second case, under the control of the *SNR52* promoter recognized by RNA polymerase III.

3.1.1 Preparation of plasmid pYES2-PGAL-Br-TC

The use of the pYES2 plasmid with the *GAL1* gene promoter for the expression of the aptamer required the inclusion of hepatitis delta virus (HDV) and Hammerhead type (HH) ribozyme sequences into the expression cassette (Figure 3). This was necessary to remove the 5' (cap) and 3' (polyA) sequences characteristic of RNA polymerase II products (Al Shanaa *et al.*, 2022).

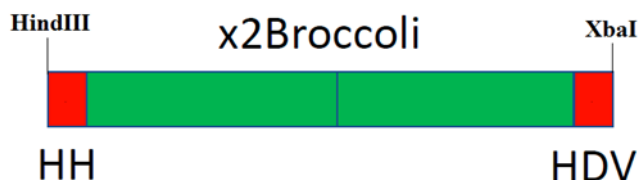


Figure 3. Relative arrangement of elements of the reporter design. The Hammerhead (HH) and hepatitis delta virus (HDV) ribozymes, the Broccoli aptamer tandem repeat, and the HindIII and XbaI restriction sites are indicated.

To express the Broccoli RNA aptamer in yeast cells, we used the pYES2 vector (5.9 kb) (Thermo Fisher Scientific Inc., USA). The plasmid is a shuttle vector with a number of useful properties that facilitate transformation, cloning, and regulation of gene expression in both bacteria and yeast. The plasmid includes the *GAL1* yeast promoter for a high level of inducible galactose expression, the *CYCI* terminator, a multiple cloning site between the promoter and the terminator, as well as selective markers for the selection of *E. coli* transformants (ampicillin resistance gene) and the selection of yeast transformants (*URA3* gene). The vector also contains two origins for maintaining and replicating a large number of copies: pUC for bacteria and 2 μ DNA for yeast.

The structure of the reporter construct was chosen in such a way as to ensure the correct folding and functioning of Broccoli ribozymes and aptamers (Figure 4) (Al Shanaa *et al.*, 2022).

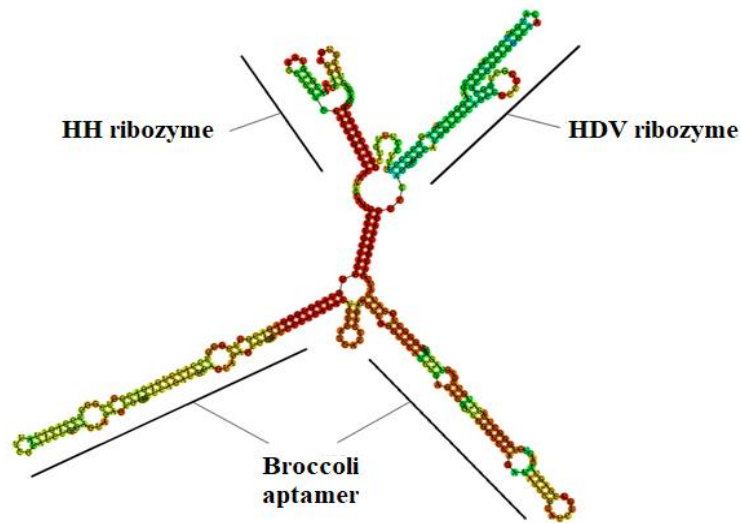


Figure 4. The result of the prediction of the secondary structure of the HH and HDV ribozymes, as well as the tandem repeat of the Broccoli aptamer as part of the developed reporter construct. The analysis was carried out using the RNAfold service (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>).

The sequence encoding the tandem repeat of the Broccoli aptamer, together with the Hammerhead (HH) and hepatitis D virus (HDV) ribozymes flanking the aptamer, was obtained by chemical synthesis and cloned into the pUC57 intermediate vector (Lumiprobe, Russia). The resulting plasmid pUC57-Br was treated with the two restriction enzymes HindIII and XbaI. The fragments were separated by electrophoresis. The insert encoding the reporter structure was isolated from agarose gel. Similarly, pYES2 plasmid was digested with the same restriction enzymes and treated with phosphatase. The resulting plasmid fragment was also purified from agarose gel. Then, a fragment of the pYES2 plasmid was ligated with the Broccoli aptamer sequence flanked by Hammerhead (HH) and hepatitis D virus (HDV) ribozymes to create an aptamer expression cassette under the control of *GAL1* promoter and *CYC1* terminator. *E. coli* bacteria were transformed with a ligase mixture.

Plasmid DNA was isolated from the obtained transformants. The general scheme for constructing the pYES2-PGAL-Br-TC plasmid is shown in Figure 5.

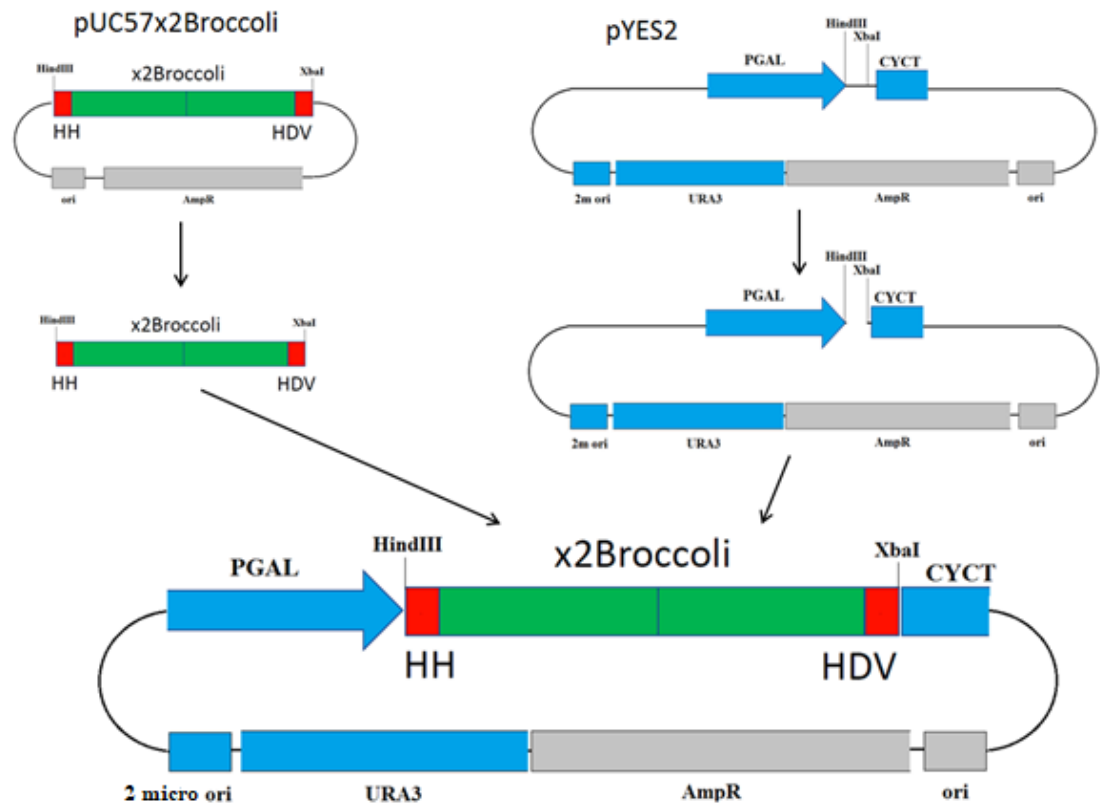


Figure 5. Scheme for constructing plasmid pYES2-PGAL-Br-TC. The Hammerhead (HH) and HDV ribozymes are shown in red, the tandem repeat of the Broccoli aptamer is in green, the origin of replication ori and the ampicillin resistance gene AmpR are in gray, the *PGAL* promoter, the *CYC* terminator, the selectable marker is the URA3 gene, and the origin of replication is 2 micro ori.

The resulting pYES2-PGAL-Br-TC plasmid was analyzed by PCR using primers for the *GAL1* promoter (PGAL-F and PGAL-R), aptamer sequence (Broccoli 2F and Broccoli 2R), *CYC1* transcription terminator (CYC1-R), shown in Table 3. The results PCR and restriction analysis are shown in the Figure 6. a, b, c, d).

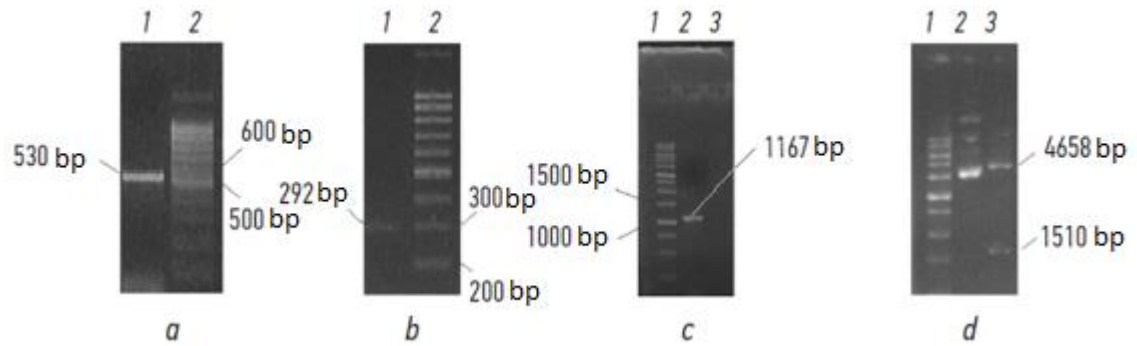


Figure 6. Electropherograms of the results of PCR amplification of fragments of the expression cassette in the plasmid pYES2-PGAL-Br-TC (a–c) and restriction analysis (d):

a, 1 — *GAL1* gene promoter amplified using primers PGAL-F and PGAL-R (530 bp); 2 – DNA Ladder 100+ bp marker (Evrogen, Russia);

b, 1 — x2Broccoli tandem repeat (292 bp) amplified using Broccoli 2F and Broccoli 2R primers; 2 - DNA Ladder 100+ bp marker (Evrogen, Russia);

c, 1 - DNA Ladder 100+ bp marker (Evrogen, Russia); 2 — full-length expression cassette (1167 bp), including the *GAL1* gene promoter, Broccoli aptamers, HH and HDV ribozymes, and the *CYC1* terminator, amplified using primers PGAL-F and CYC1-R;

d, 1 - DNA Ladder 1000 bp marker (Evrogen, Russia); 3 — results of restriction analysis of the pYES2PGALx2BroccoliCYC1 plasmid, which has two *Bgl*I restriction sites (one in the expression cassette and the other outside it).

The sizes of the resulting fragments corresponded to theoretically expected ones (Al Shanaa et al., 2022).

Additionally, the resulting plasmid was sequenced using primers specific to the sequence of the *PGAL* promoter and the *CYC1* terminator (PGAL-F and CYC1-R). The results of sequencing are shown in Figure 7.

```

result      AAGCTTGGAAACCAGTGCTGATG
ordered    AAGCTTGGAAACCAGTGCTGATG
          *****

result      AGTCCGTGAGGACGAAACGAGTAAGCTCGTCCACTGGTTCCAATTGTATTGCTTGCCATG
ordered    AGTCCGTGAGGACGAAACGAGTAAGCTCGTCCACTGGTTCCAATTGTATTGCTTGCCATG
          *****

result      TGTATGTGGGAGACGGTCGGGTCCATCTGAGACGGTCGGGTCCAGATATTTCGTATCTGTC
ordered    TGTATGTGGGAGACGGTCGGGTCCATCTGAGACGGTCGGGTCCAGATATTTCGTATCTGTC
          *****

result      GAGTAGAGTGTGGGCTCAGATGTCGAGTAGAGTGTGGGCTCCCACATACTCTGATGATCC
ordered    GAGTAGAGTGTGGGCTCAGATGTCGAGTAGAGTGTGGGCTCCCACATACTCTGATGATCC
          *****

result      AGACGGTCGGGTCCATCTGAGACGGTCGGGTCCAGATATTTCGTATCTGTCGAGTAGAGTG
ordered    AGACGGTCGGGTCCATCTGAGACGGTCGGGTCCAGATATTTCGTATCTGTCGAGTAGAGTG
          *****

result      TGGGCTCAGATGTCGAGTAGAGTGTGGGCTGGATCATTATGGCAAGCTTCAGGCCGGCA
ordered    TGGGCTCAGATGTCGAGTAGAGTGTGGGCTGGATCATTATGGCAAGCTTCAGGCCGGCA
          *****

result      TGGTCCCAGCCTCCTCGCTGGCGCCGGCTGGGCAACATGCTTCGGCATGGCGAATGGGAC
ordered    TGGTCCCAGCCTCCTCGCTGGCGCCGGCTGGGCAACATGCTTCGGCATGGCGAATGGGAC
          *****

result      ACAGGCCCTTTTCCTTTGTGGAATTCTAGA
ordered    ACAGGCCCTTTTCCTTTGTGGAATTCTAGA
          *****

```

Figure 7. Alignment results of the developed reporter sequence (ordered) and the sequence obtained by sequencing the pYES2-PGAL-Br-TC plasmid (result). The sequences are exactly the same. Insertion occurred exactly at the HindIII and XbaI restriction sites used, highlighted by boxes.

Thus, plasmid pYES2-PGAL-Br-TC was obtained. Its detailed scheme is shown in Figure 8.

forward primer to the *SNR52* promoter sequence (PSNR2xBr-AgeI-F) and a reverse primer to the *SUP4* terminator sequence (PSNR2xBr-BsrGI-R) containing restriction sites for AgeI and BsrGI were used (table 3). The presence of overlapping sequences ensured that the fragments were joined into a single SNR52-x2Broccoli-SUP4 fragment. This resulting fragment was cloned into the pYES2 vector using AgeI and BsrGI restriction sites instead of the *GALI* promoter and *CYC1* terminator. The resulting plasmid pYES2-PSNR-Br-TS was analyzed by PCR (Figure 9).

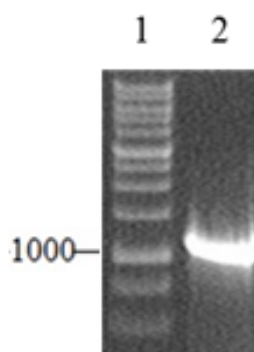


Figure 9. Electropherogram of the results of PCR amplification of the expression cassette in the plasmid pYES2-PSNR-Br-TS. 1 - DNA Ladder 1000 bp (Evrogen, Russia), 2- the result of PCR using primers specific for the *SNR52* promoter sequence (PSNR2xBr-AgeI-F) and *SUP4* transcription terminator (PSNR2xBr-BsrGI-R) (table 3). Размеры полученного фрагмента соответствовал теоретически ожидаемому (934 п.н.).

The sizes of the obtained fragments corresponded to theoretically expected ones.

The pYES2-PSNR-Br-TS plasmid scheme is shown in Figure 10.

The obtained transformants were analyzed for the expression of the reporter construct. For this, transformants with the PGALx2BroccoliCYC1 expression cassette were grown in liquid Md medium with glucose for 24 hours. After increasing the cell density, the cells were centrifuged and transferred to Md medium containing galactose as a carbon source. Control variants were transferred to Md medium with glucose as a carbon source. Cells were incubated for 24 hours. Next, cells from 1 ml of culture were collected by centrifugation, washed with 0.5 ml of PBS buffer, centrifuged again, and the supernatant was removed. 100 μ l of PBS buffer with DFHBI-1T dye at a concentration of 500 μ M was added to the pellet and incubated for 1 hour. After incubation, cells were collected by centrifugation, washed twice to remove dye residues with PBS buffer, and resuspended in 1 ml of PBS buffer.

The incubation of the cells of the obtained transformants in medium with galactose resulted in the activation of the *GALI* promoter. As a result, the reporter construct was expressed, and the Broccoli aptamer was synthesized. It interacted with the DFHBI-1T dye that penetrated the cells, which led to their fluorescence.

When cells were incubated in media with glucose, the *GALI* promoter was repressed, the reporter construct was not expressed, the Broccoli aptamer was not synthesized, and fluorescence was not observed (Al Shanaa *et al.*, 2022). Fluorescence was analyzed using a spectrofluorometer. The results are presented in Figure 11A, B.

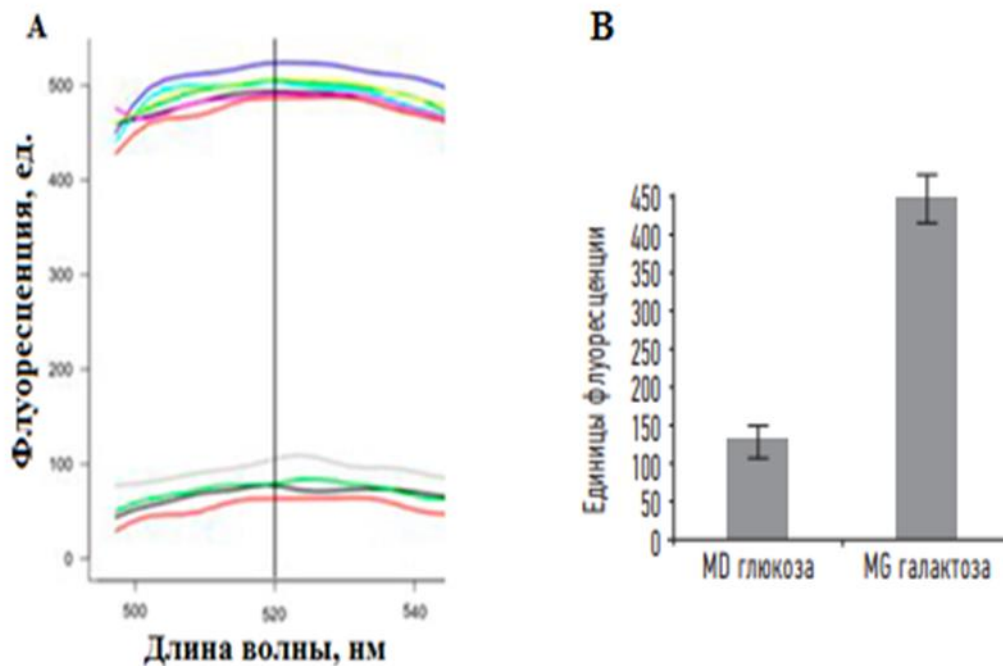


Figure 11. A) Fluorescence curves of cell suspensions of the yeast *S. cerevisiae* in the range from 500 to 540 nm, obtained by irradiating the cell suspension with light at a wavelength of 450 nm. The upper curves correspond to cells with pYES2-PGAL-Br-TC plasmid, incubated in medium with galactose, in which the reporter construct was expressed, and the Broccoli aptamer was synthesized. The lower curves correspond to cells with pYES2-PGAL-Br-TC plasmid, incubated in media with glucose, in which aptamer synthesis is inhibited. B) Average fluorescence values (at a wavelength of 520 nm) of a suspension of *S. cerevisiae* yeast cells incubated in media with glucose or galactose. The measurements were carried out in at least 4 repetitions. The significance of the obtained differences is confirmed by the Mann-Whitney test ($p < 0.02$).

Thus, it was demonstrated that the obtained plasmid pYES2-PGAL-Br-TC ensures the synthesis and functioning of the Broccoli RNA aptamer in *S. cerevisiae* yeast cells.

In transformants containing the pYES2-PSNR-Br-TS plasmid with PSNR52-x2Broccoli-SUP4 expression cassette, the synthesis of the aptamer was also evaluated by the

level of fluorescence using the DFHBI-1T fluorophore. In this case, the yeast was also grown in a liquid Md medium with glucose for 24 hours, but they were not further transferred to the medium with galactose. The control variant was represented by yeast cells transformed with the plasmid pYES2 without the aptamer sequence and grown under the same conditions.

The fluorescence level when using this expression cassette practically did not differ from the control. This indicates that pYES2-PSNR-Br-TS plasmid did not provide synthesis of the required amount of the Broccoli functional aptamer. Therefore, the plasmid pYES2-PGAL-BrTC and the corresponding *S. cerevisiae* transformants were used in further work.

3.2 Transcriptome analysis of RNA aptamer-producing yeast strain

Transcriptome analysis methods were used to assess how gene expression in *S. cerevisiae* is affected by the synthesis of large amounts of RNA transcripts containing a reporter construct with the fluorescent Broccoli aptamer and the HH and HDV ribozymes flanking the aptamer sequence. In two stages, yeast cultures of the transformant with the plasmid pYES2-PGAL-Br-TC synthesizing the reporter construct were grown, as well as cultures of the control strain containing the original pYES2 plasmid without the expression cassette.

First, yeast cell density was increased in the selective Md medium with glucose for 24 hours. Under these conditions, the activity of the *GAL1* promoter, which controls the reporter construct, was suppressed. Next, the cells were transferred to media with galactose to induce RNA synthesis (Rumyantsev *et al.*, 2022). After cultivation, RNA was isolated from the cells, and then used to prepare libraries for the next generation sequencing. For each of the strains, the experiment was carried out in triplicate (Rumyantsev *et al.*, 2022).

Bioinformatic analysis was performed based on the sequencing results. Lists of genes were obtained that reliably demonstrated a decrease or increase in the level of mRNA in response to the synthesis of the Broccoli RNA aptamer in the cell (table S1, Supplementary materials). A total of 115 such genes were identified, and this approximately comprises 1.8% of the total number of genes in *S. cerevisiae*.

In the aptamer-producing strain, we found 67 genes with elevated levels of certain RNAs during the synthesis of the Broccoli reporter construct. On the contrary, we found 48 genes with a reduced level of expression of certain RNAs. Moreover, the discovered genes encode not only proteins, but also various types of RNAs synthesized by RNA polymerase II, in particular, small nuclear RNAs (snRNAs) and small nucleolar RNAs (snoRNAs).

The synthesis of the reporter construct with the Broccoli RNA aptamer leads to a decrease in the mRNA level of a number of genes encoding proteins of the large subunit of the ribosome: *RPL3*, *RPL4A*, *RPL5*, *RPL10*, *RPL11A*, *RPL14A*, *RPL18A*. The expression of

a number of genes encoding small subunit proteins is also suppressed: *RPS11A*, *RPS23B*, *RPS27B*.

Generally, in *S. cerevisiae* yeast, the large ribosomal subunit contains 46 proteins, 42 of which are main and two additional proteins repeated twice each. The small subunit contains 32 proteins (Verschoor et al., 1998). That is, the synthesis of the reporter construct affects the mRNA level of a small part of the ribosomal proteins. These proteins perform different functions and are located in different parts of the ribosome (Figure 12).

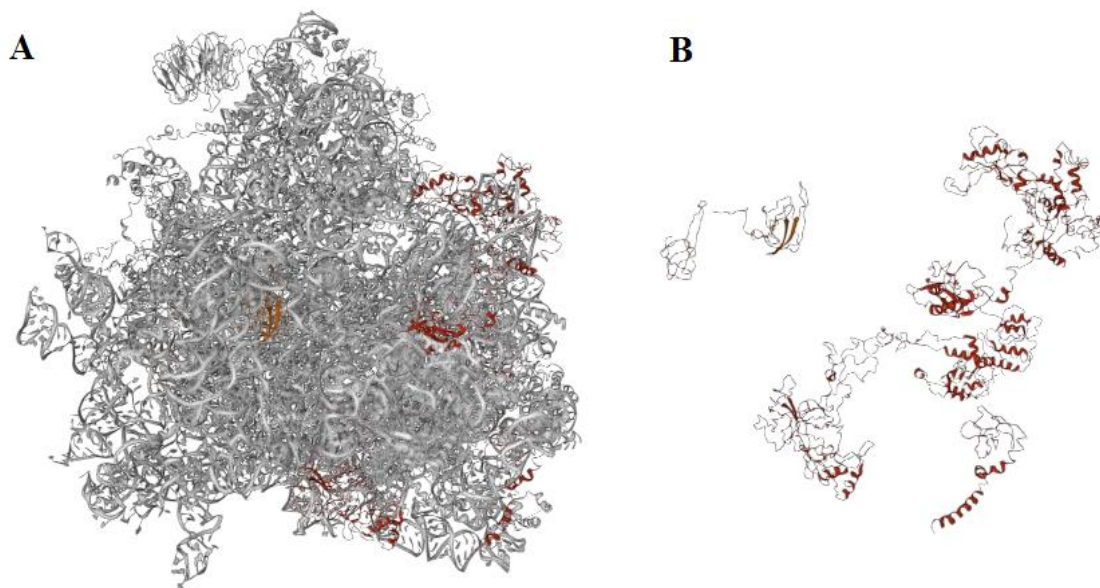


Figure 12. Structure of the yeast *S. cerevisiae* ribosome (modified based on (Dinman 2009) and the corresponding 4V7R structure in the PDB ([wwPDB consortium, 2019])). A) The structure of the ribosome is shown, and the spatial arrangement of ribosomal proteins encoded by genes suppressed during the synthesis of the reporter construct with the Broccoli aptamer is indicated. Yellow marks such proteins as part of the small subunit (encoded by the *RPS11A* and *RPS23B* genes). Red - proteins in the large subunit of the ribosome (encoded by the genes *RPL3*, *RPL4A*, *RPL5*, *RPL10*, *RPL11A*, *RPL14A*, *RPL18A*). B) Only designated proteins are shown with their spatial arrangement preserved.

One of the groups of genes in which the RNA level changed during the synthesis of the reporter construct with the Broccoli aptamer was the genes associated with mRNA splicing. In particular, the RNA level of the *SNR19* and *LSR1* genes encoding key snRNAs - U1, which recognizes the 5' splicing boundary, and U2, which binds to a branch point within the intron, increased (Kretzner et al., 1987; Riedel et al., 1986).

In response to the synthesis of the reporter construct, the number of mRNAs of the genes encoding small nucleolar RNAs (snoRNAs) involved in the maturation of ribosomal RNAs also increased (Smarsky, Fournier, 1999). This concerns the snoRNA genes containing the H/ACA sequence (H/ACA-box) - SNR46 and SNR49. These snoRNAs ensure the formation of pseudouridines at specific positions in maturing ribosomal RNAs (Figure 13B) (Ni et al., 1997).

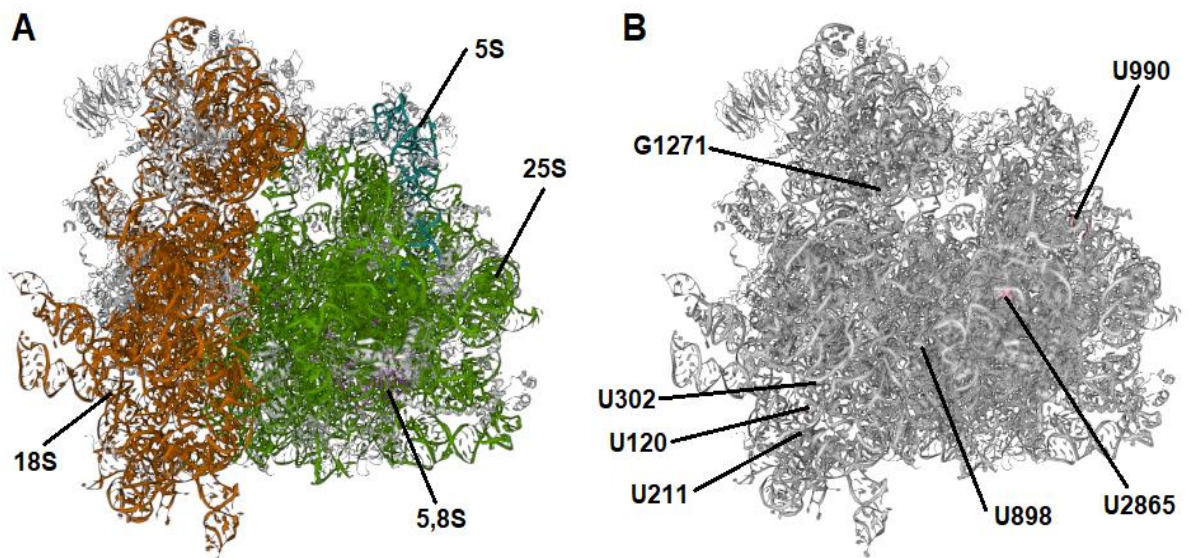


Figure 13. Spatial arrangement of ribosomal RNAs in the small subunit (18S) and large subunit (5S, 5.8S and 25S) of the yeast *S. cerevisiae* ribosome (modified based on (Dinman 2009) and the corresponding 4V7R structure in the PDB ([wwPDB consortium, 2019])). A) The structure and spatial arrangement of ribosomal RNAs in the small subunit (18S) and large subunit (5S, 5.8S and 25S) are indicated. B) Nucleotides modified with the participation of snRNAs encoded by the *SNR40*, *SNR46* and *SNR49* genes are indicated. *SNR40* snRNA directs 2'O-methylation at position U898 in 25S rRNA and at position G1271

in 18S rRNA. snRNA SNR46 directs the formation of pseudouridines at position U2865 in the 25S rRNA. SNR49 snRNA directs the formation of pseudouridines at position U990 in 25S rRNA and at positions U120, U211, and U302 in 18S rRNA.

The activity of the SNR40 gene, which encodes a snoRNA with a C/D sequence that is involved in 2'O-methylation of certain rRNA nucleotides, also increases (Figure 13B) (Smarsky and Fournier, 1999; Lowe and Eddy, 1999). This occurs against the background of a decrease in the activity of the NOP56 gene, which encodes one of the most important components of the complex of the protein and the corresponding snoRNAs, which carries out 2'O-methylation (Gautier et al., 1997).

The studied snoRNAs are characterized by a different arrangement of targets in RNA with the implementation of various modifications.

3.3 The development of *S. cerevisiae* strain with *XRN1* gene deletion

The reporter system we have obtained allows us to study the synthesis of small RNA molecules, and their stability in yeast cells by measuring the fluorescence of the Broccoli aptamer. The effect of synthesis of short RNA aptamer molecules on gene activity, RNA processing and nuclease activity in *S. cerevisiae* yeast cells was studied using transcriptomic analysis methods. At the next stage of the study, a technique for modifying *S. cerevisiae* yeast strains was proposed and worked out to increase the stability of synthesized RNA molecules and RNA aptamers.

3.3.1 Obtaining the pPICZ-5'-3'-XRN1 plasmid to introduce the *XRN1* gene deletion

The lifetime of certain RNA molecules in living cells may vary depending on their type and function. The regulation of RNA molecule degradation is one of the important levels of regulation of gene expression. RNA hydrolysis in cells can be carried out by various

exonucleases and endonucleases, of which the increased activity can reduce the stability and lifetime of short RNAs in cells.

In this regard, we studied the effect of nucleases on the synthesis and activity of sRNAs in yeast cells. We examined the published literature and database *S. cerevisiae* yeast nucleases. As a result, a list of known nucleases was compiled, among which the exonuclease encoded by *XRN1* gene was chosen as an object for further work.

The evolutionarily conserved 5'-3'-exonuclease Xrn1 plays a key role in mRNA degradation. In addition, it can penetrate the nucleus and positively regulate transcription initiation. It is also involved in microtubule-mediated processes, ribosomal RNA maturation, and telomere maintenance (Jones *et al.*, 2012; Nagarajan *et al.*, 2013). To elucidate the possible effect of this exonuclease on the synthesis of short RNAs in yeast cells, we obtained *S. cerevisiae* yeast strain with *XRN1* gene deletion. The scheme of the experiment on obtaining a yeast strain with a deletion of the *XRN1* gene is shown in Figure 14.

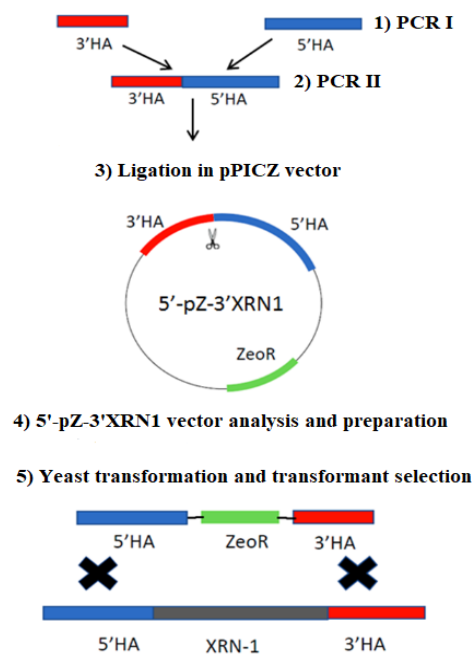


Figure 14. Schematic illustration of the experiments done to introduce *XRN1* gene deletion in *S. cerevisiae* yeast. The DNA fragments correspond to the 5'HA (blue) and 3'HA (red) homology arms, the ZeoR antibiotic resistance gene sequence ZeoR (green), and the coding sequence of the *XRN1* gene (gray) in the genome are marked.

First, both the upstream and downstream regions of the *XRN1* gene were determined in the *S. cerevisiae* genome (Figure 15.). The gene size is 4587 bp. We chose two intergenic regions upstream and downstream of the *XRN1* locus sequence. The sizes of these two homology arms were 540 bp for 5' and 451 bp for 3', respectively. The corresponding primers were selected for their sequences (Table 3).

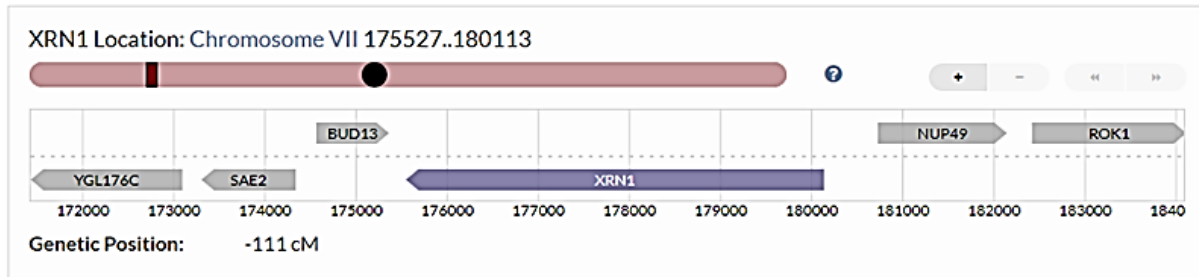


Figure 15. Scheme of the *XRN1* gene locus and neighboring regions from the SGD database (<https://www.yeastgenome.org/locus/SGD:S000003141>).

The chromosomal DNA of the yeast *S. cerevisiae* (strain D623) was used as a template for the PCR amplification of both 5' and 3' homology arms. Optimal conditions for amplification were selected using gradient PCR, in which we used a range of different primer annealing temperatures (between 40°C and 60°C). The results of first round of PCR are shown in Figure 16. The amplified fragments contained an overlapping region with an *EcoRI* restriction site.

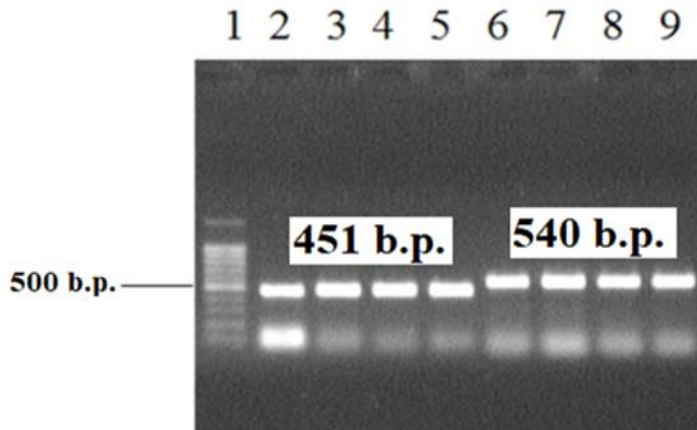


Figure 16. Electrophoregram of PCR results with *S. cerevisiae* genomic DNA and primers to the 3'-homologous arm (lanes 2-5, expected size 451 bp) and 5'-homologous arm (lanes 6-9, expected size 540 bp). 1 - DNA length marker 100bp (Evrogen).

The resulting fragments were purified from agarose gel, and another round of PCR was carried out, in which a mixture of the obtained fragments was used as the template. Primers 3'XRN1-HA-F and 5'XRN1-HA-R containing BamHI sites were used (Table 3). During the second round of PCR, the fragments were combined into a single 3'-5'XRN1 fragment (Figure 17).

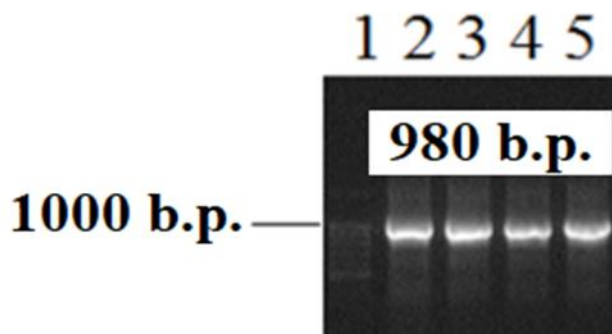


Figure 17. Electrophoregram of PCR results with a mixture of fragments corresponding to the 3' homologous arm and 5' homologous arm as a template and 3'XRN1-HA-F and 5'XRN1-HA-R primers (lanes 2-5, expected fragment 980 bp); lane 1 - DNA length marker 100bp (Evrogen).

At the ends of the resulting fragment are the BamHI sites introduced as part of the primers. The resulting fragment was digested with BamHI and purified from agarose gel. Simultaneously, restriction of the plasmid pPICZaB was carried out using restriction enzymes BamHI and BglII, which form the same "sticky ends" at the cutting site. The desired fragment of the plasmid containing the zeocin resistance gene was separated by electrophoresis and purified from agarose gel. The 3'-5'XRN1 fragment and the pPICZaB plasmid fragment were ligated.

E. coli bacteria were transformed with a ligase mixture, transformants were selected on a medium with the antibiotic zeocin. The pPICZ-5'-XRN-3' plasmid was isolated from the obtained transformants and analyzed using PCR (Figure 18).

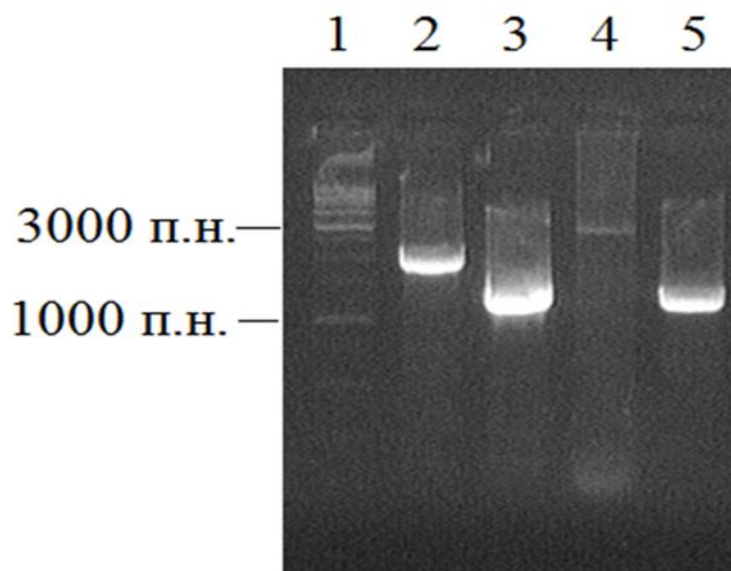


Figure 18. Electrophoregram of PCR results with plasmid pPICZ-5'-3'-XRN1. and with genomic DNA of transformant 1-D623/5'-pZ-3'XRN1. 1 - DNA length marker 1kb (Evrogen); 2 - PCR product obtained using primers for the 3' homology arm (3'XRN1-HA-R) and the zeocin resistance gene (ZeoDown); 3, - PCR product obtained using primers to the 5' homology arm (5'XRN1-HA-F) and the zeocin resistance gene (ZeoUp); 4 - the result of PCR with primers 5'HA-ZeoR-F and 3'HA-ZeoR-R, during which the entire sequence of the plasmid is amplified; 5 - PCR product obtained on the transformant 1-D623 (see figure 20) genomic DNA template.

arms. The yeast strain *S. cerevisiae* D623 (*ura3 lys2 leu2 trp1*) was transformed with this fragment. The selection of transformants was carried out on a complete medium with the antibiotic Zeocin.

Genomic DNA was isolated from clones resistant to the antibiotic Zeocin. Using the PCR method, the presence of a deletion in the *XRN1* gene in the genome of the selected transformants was confirmed (Figure 20).

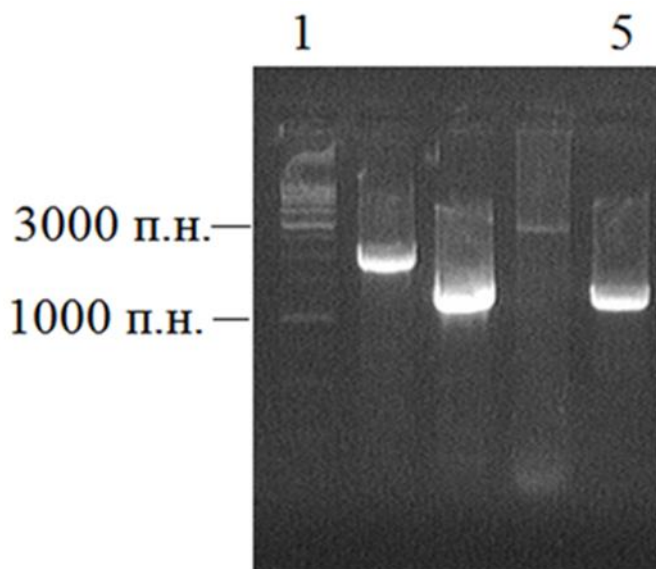


Figure 20. Electrophoregram of the results of PCR analysis of strain 1-D623 (*ura3 lys2 leu2 trp1 Δxrn1 ZeoR*). 1 - DNA length marker 1kb (Evrogen); 5 - PCR product obtained using primers to the 5' arm of homology (5'*XRN1*-HA-F) and the zeocin resistance gene (*ZeoUp*). The sizes of all the fragments obtained corresponded to the theoretically expected ones.

Thus, strain 1-D623 (*ura3 lys 2 leu2 trp1 Δxrn1 ZeoR*) containing a deletion in the *XRN1* gene was obtained. Further, the effect of this deletion on the viability of strain 1-D623 was analyzed. For this purpose, the cells of strain 1-D623 and the control strain (D623) were grown in a liquid medium of YEPD for 4 hours, then they were sown on solid media in the form of a series of dilutions. Comparison of the *Δxrn1* strain and the original strain showed

that the deletion of the *XRNI* gene did not affect the viability of the mutant but was accompanied by a slight decrease in its growth rate (Figures 21a, b).

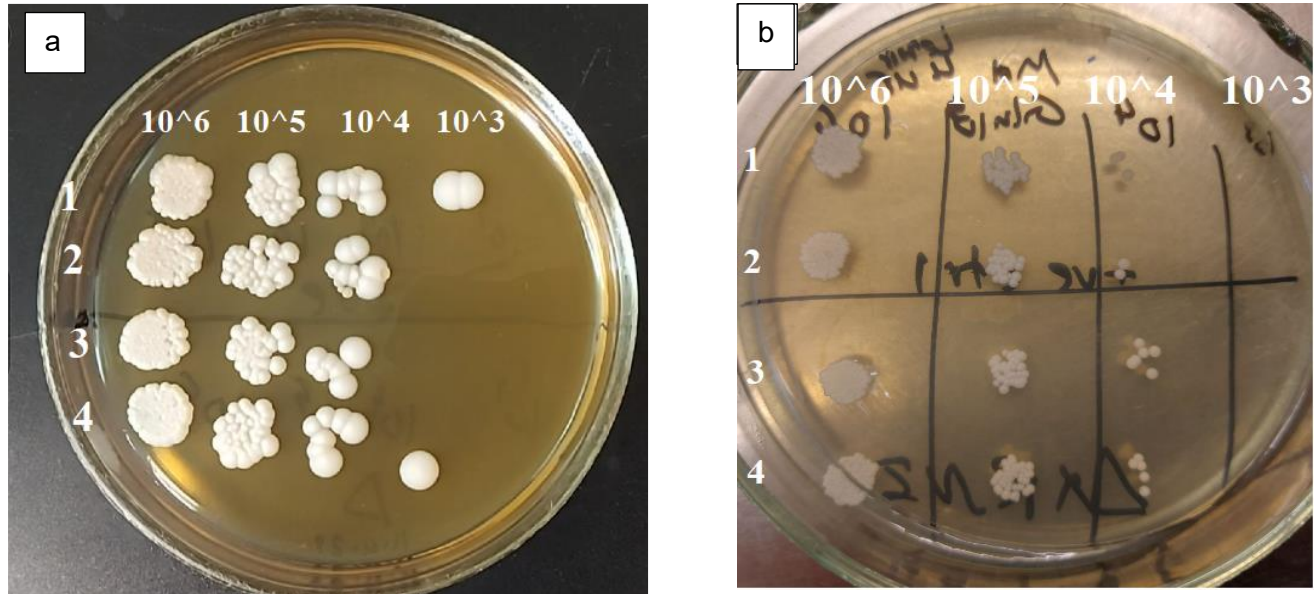


Figure 21. Growth of *S. cerevisiae* yeast on YEPD (a) and Md (b) media.

1, 2 - strain D623 (*ura3 lys2 leu2 trp1*); 3, 4 - mutant D623 (*ura3 lys2 leu2 trp1 Δxrn*). 10 μ l of cell suspension in serial dilution in the range from 10^6 to 10^3 cfu/ml was applied to the plate (from left to right for each strain).

It should be noted that the deletion of the *XRNI* gene did not affect the stability of the Broccoli RNA aptamer, apparently, the aptamer is not a substrate of the Xrn1 exonuclease.

Thus, in our work we assessed the possibility of expression of the Broccoli RNA aptamer sequence and its synthesis in *S. cerevisiae* yeast cells. We have shown that the use of an expression cassette with a regulated *GALI* promoter happens to be the best option. At the same time, the RNA aptamer synthesized in yeast cells assumed a native spatial structure, as evidenced by the ability to bind the fluorescent dye DFHBI-1T. Deletion of the *XRNI* exonuclease structural gene slightly reduced the growth rate of the mutant strain, but did not affect the stability of the aptamer. The synthesis of the RNA aptamer did not lead to a

decrease in the viability of yeast-producing cells, but was accompanied by a change in the transcription level of 115 genes. An increase in the level of transcription was observed in 67 genes, and the level of transcription of 48 genes decreased. Among the genes with an altered expression level, genes encoding proteins and some types of RNA synthesized by RNA polymerase II were found. The absence of a significant effect of RNA aptamer synthesis on the vital activity of the producing strain suggests the prospects of using yeast to produce RNA aptamers.

4 DISCUSSION

Aptamers are nucleic acid sequences that can be easily programmed and synthesized to bind to virtually any type of target chemical, referred to as a "ligand". The resulting nucleic acid aptamers can form various three-dimensional conformations due to electrostatic attraction and repulsion forces that vary depending on the sequence itself. Due to the seven torsion degrees of freedom of nucleotides, the overall sequence has a certain flexibility, which allows various three-dimensional conformational changes to occur (Adachi *et al.*, 2019).

Different aptamer conformations have different affinities for certain ligands. Aptamers typically bind to their target ligands by non-covalent bonds such as hydrogen bonds, π - π stacking, London dispersion forces, ion-ion interactions, and dipole-dipole interactions.

In recent years, RNA aptamers have attracted increasing interest from researchers, this is due to the fact that RNA molecules are able to form more diverse spatial structures than DNA (Guo, 2010; Shanaa O.A. *et al.*, 2021).

Aptamer research has accelerated significantly due to the use of new technologies in the field of artificial intelligence and machine learning in the development of an oligonucleotide sequence for a target ligand (Xiao *et al.*, 2021; Song *et al.*, 2020).

RNA aptamers are used in fundamental research to study the dynamics of nucleic acids in the cell, the regulation of gene expression and metabolism (Dolgoshina, Unrau, 2016; Trachman *et al.*, 2017).

Aptamers can also be in demand for solving the problems of applied biological and environmental research, in addition to industrial uses. Given the wide range of aptamer targets from single ions to whole cells, fluorescent aptamers can be used as a sensitive

element for detecting pathogenic microorganisms and measuring the amount of certain molecules (Zou *et al.*, 2019).

Aptamers can be used to diagnose diseases and identify proteins associated with certain diseases. Due to the high binding specificity of aptamers to target proteins, they can be considered as analogs of antibodies (Adachi, Nakamura, 2019). Compared to antibodies that consist of 20 amino acids, aptamers can have a lower degree of variability. Aptamers also have numerous advantages over antibodies, including development time, smaller size, minimum target size, stability, and refolding ability (Li *et al.*, 2021; Chen *et al.*, 2023). As a result, aptamers are less immunogenic and have a better ability to penetrate target tissues (Zhu *et al.*, 2016).

A number of aptamers have already been developed that can be used as potential therapeutic agents for malignant neoplasms, blood diseases and infectious diseases (Afrasiabi *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2021; Aljohani *et al.*, 2022). Currently, more than 18 oligonucleotide-based therapeutic agents, aptamers, have been approved by the FDA for various diseases (Gragoudas *et al.*, 2004; Thakur *et al.*; 2022; Egli *et al.*, 2023). RNA-based therapeutics for common and rare diseases are becoming increasingly popular due to various modes of action such as CRISPR-Cas-based antisense genome editing, RNA interference-mediated regulation of gene expression, mRNA vaccines, and RNA aptamers (Zhu *et al.*, 2022).

For a wide application of RNA aptamers, it is necessary to develop facile and economical methods for their production.

Modern methods for obtaining RNA oligonucleotides are mainly based on chemical synthesis or use the *in vitro* transcription (IVT) system (Josephson *et al.*, 1984). In IVT, the DNA sequence encoding the RNA product is cloned under the control of a promoter recognized by a phage DNA-dependent RNA polymerase, usually T7, T3, or SP6 (Beckert, Masquida, 2011). The problem of IVT and chemical synthesis is the low yield, high cost, the presence of short abortive transcripts, and the need for purification to protect RNA

transcripts from degradation (Kao *et al.*, 1999; Pregeljc *et al.*, 2023). One possible way to improve the quality and quantity of RNA aptamers is to use producer organisms.

In 2007, strains of *E. coli* bacteria synthesizing recombinant RNA transcripts were obtained. The authors masked the recombinant RNA sequence with a tRNA backbone to avoid its degradation by the endogenous *E. coli* RNase (Ponchon, Dardel, 2007). Another approach to stabilize the recombinant RNA structures produced *in vivo* by *E. coli* was to circularize the RNA transcript to increase resistance to nucleases (Umekage, Kikuchi, 2009; Ortolá, Daròs, 2022). However, neither of the two options is suitable for large-scale production of RNA nanostructures, since methods for protecting recombinant RNA from degradation interfere with obtaining the desired conformation, and the resulting transcript will also need to be treated with RNase H to remove flanking tRNA fragments (Ponchon, Dardel, 2007).

In 2017, attempts were reported on large-scale production of nucleic acid nanostructures *in vivo* in bacterial cells, but additional procedures were required for the extraction of recombinant RNA from *E. coli* bacterial cells and further thermal and chemical treatment to obtain the desired conformation (Praetorius *et al.*, 2017). In 2018, information appeared on the synthesis of complex three-dimensional RNA nanostructures in *E. coli*, which had thermodynamic stability and suitable kinetic properties. The authors of the publication developed an RNA sequence that first ensured the formation of a secondary structure - hairpins and their topological stability, and then unpaired nucleotides ensured the formation of a tertiary structure (Li *et al.*, 2018). Work on the creation of organisms producing aptamers and RNA nanoparticles is still limited to the use of *E. coli* bacteria (Li *et al.*, 2018).

The use of eukaryotic organisms as producer organisms is of particular interest, since it allows not only to improve the technology for obtaining RNA aptamers *in vivo*, but also to elucidate their functioning in eukaryotic cells.

The yeast *Saccharomyces cerevisiae* was chosen as a producer of RNA aptamers for several reasons. Yeasts are eukaryotic microorganisms, easy to culture, safe for laboratory

work, and do not require expensive culture media, with multiple genetic and biochemical methods developed to study this organism. An even more important characteristic of the yeast *S. cerevisiae* is that it shares many key processes with mammals. Therefore, many researchers proposed testing the ability of *S. cerevisiae* to produce RNA nanostructures on a large scale (Drinnenberg *et al.*, 2009; Sasano *et al.*, 2017; Duman-Scheel, 2019; Chen *et al.*, 2022).

One of the interesting features of the yeast *S. cerevisiae* is the absence of an RNA interference system, which can contribute to the accumulation of recombinant dsRNA transcripts *in vivo* (Duman-Scheel, 2019). In cells with an RNA interference mechanism, dsRNAs are recognized and converted into smaller siRNA transcripts, which can further participate in the suppression of certain gene transcription and mRNA translation. This function is key to the production of recombinant RNA products, including aptamers, mRNA vaccines, and even complex RNA structures.

In parallel with developing approaches for the synthesis of RNA aptamers in yeast cells, the Broccoli RNA aptamer was used as a reporter molecule. This aptamer is a short RNA molecule that, due to its secondary structure, the RNA transcript interacts with the DFHBI-1T fluorescent dye and activates the fluorescent signal (Quellet, 2016; Figure 2). The appearance of fluorescence is proof of the synthesis of a functional aptamer with a native secondary structure.

The Broccoli aptamer, in combination with the DFHBI-1T fluorescent dye, is widely used to visualize RNA molecules in living cells. An interesting feature of this aptamer is the possibility of its separation into two parts, which separately do not bind to the DFHBI-1T dye, but can be assembled into a functional aptamer upon interaction with each other (Schneider *et al.*, 2004). The tandem repeat of the Broccoli RNA aptamer was used to enhance the intensity of the fluorescence signal (Zinskie *et al.*, 2018).

Based on the sequence encoding the Broccoli aptamer, we obtained plasmids containing various variants of expression cassettes that ensure the synthesis of a full-length aptamer in yeast cells:

The first design of the expression cassette was based on the use of the *SNR52* gene promoter recognized by RNA polymerase III and the *SUP4* gene terminator. To obtain the expression cassette PSNR52-x2Broccoli-SUP4, several sequential PCRs were used with primers containing overlapping sequences. The resulting expression cassette PSNR52-xBroccoli-SUP4T was cloned into the yeast plasmid pYES2, and the resulting plasmid pYES2-PSNR-Br-TS was transformed by yeast (Figures 9, 10).

The second design of the expression cassette was based on the use of the *GAL1* gene promoter recognized by RNA polymerase II and the *CYC1* gene terminator. The promoter of the *GAL1* gene allowed us to verify the synthesis of the aptamer, which is strictly regulated depending on the carbon source in the growth medium. In the presence of glucose in the medium, this promoter is repressed, and its induction is observed in the medium with galactose. A characteristic feature of RNA molecules transcribed by RNA polymerase II is the presence of extended 5' and 3' untranslated regions and modification of the ends (capping and polyadenylation). To ensure the synthesis of RNA molecules with specified 5' and 3' ends, ribozyme sequences flanking the Broccoli aptamer sequence were introduced into the expression cassette (Figure 3). The Hammerhead ribozyme located at the 5' end of Broccoli and the HDV (hepatitis delta virus) ribozyme at the 3' end ensured the correct cleavage of the aptamer sequence from the primary RNA molecule, as evidenced by the appearance of fluorescence upon interaction of the synthesized aptamer with the dye (Figures 11A, B).

To obtain the expression cassette PGAL1-HH-x2Broccoli-HDV-CYC1T, several sequential PCRs were used with primers containing overlapping sequences (Figure 5). Then the resulting expression cassette was cloned into the yeast pYES2 plasmid. The resulting plasmid pYES2-PGAL-Br-TC was used to transform yeast (Figures 6, 7, 8).

Previously, a variant of RNA aptamer synthesis in yeast cells using T4 phage RNA polymerase was proposed (Dower, Rosbash, 2002). We did not use this option due to the fact that in this case, it was first necessary to obtain yeast cells synthesizing heterologous T4 phage RNA polymerase. Thus, the yeast transformants obtained in the future will have to

synthesize not only RNA aptamers, but also a heterologous protein. This can be a serious metabolic burden and adversely affect the viability of producer cells.

The transformation of yeast by the expression plasmids pYES2-PSNR-Br-TS and pYES2-PGAL-Br-TC obtained by us led to the formation of two yeast strains, namely *S. cerevisiae* D623 (pYES2-PSNR-Br-TS) and *S. cerevisiae* D623 (pYES2-PGAL-Br-TC) synthesizing RNA aptamer Broccoli, as evidenced by the appearance of fluorescence after the addition of the DFHBI-1T dye to transformant cells (Figures 11A, B).

The level of fluorescence observed in the *S. cerevisiae* D623 transformant (pYES2-PGAL-Br-TC) was significantly higher than in the *S. cerevisiae* D623 transformant (pYES2-PSNR-Br-TS). One possible explanation may be that the expression of the aptamer in strain D623 (pYES2-PGAL-Br-TC) is controlled by a strong regulated promoter *GALI*. We carried out a two-stage cultivation of this strain, first, on a medium with glucose as a carbon source, only biomass increased, the promoter was repressed under these conditions, and aptamer transcription did not occur. Only when the grown yeast was transferred to a new medium with galactose as a carbon source, the promoter was activated and aptamer transcription began. Such a scheme for cultivating producer strains allows us to reduce the metabolic load on the yeast cell. In the case of transformant *S. cerevisiae* D623 (pYES2-PSNR-Br-TS), the expression of the aptamer begins immediately, possibly with a negative effect on the growth and the metabolic processes of yeast. In addition, in this expression cassette, the transcription of the aptamer sequence is controlled by the promoter of the *SNR52* gene, and not by the strong promoter of the *GALI* gene.

Thus, it was demonstrated that yeast is capable of synthesizing functional RNA aptamers, and the regulated expression of the aptamer sequence provides a higher level of Broccoli aptamer synthesis in *S. cerevisiae* yeast cells.

Using the Broccoli RNA aptamer producer as a yeast strain with a deletion of the *XRN1* exonuclease structural gene, which, in particular, plays a key role in mRNA degradation, we hoped to increase the yield of the aptamer by increasing its stability. The deletion of this gene did not affect the viability of the 1-D623 strain, but did not lead to the

desired result, i.e., an increase in the stability of the aptamer. Possibly, Xrn1 exonuclease is not involved in the degradation of short RNAs with a clearly defined secondary structure.

As was shown in the analysis of the transcriptome of yeast synthesizing the RNA aptamer, the level of RNA of 115 genes changes (Table S1). In 67 genes, an increase in the level of RNA was observed, in 48 genes, a decrease in the amount of RNA. At the same time, the studied genes encoded not only proteins, but also different types of RNA. Among the genes with a reduced level of mRNA were the structural genes of some ribosomal proteins that are involved in rRNA processing and maturation of ribosomes.

It can be assumed that the synthesis of the reporter construct containing a large number of secondary structures somehow affects the processing of rRNA molecules, leading to a change in the expression level of the genes involved in this processing event at different stages.

However, the hypothesis that the synthesis of the reporter construct disrupts the maturation processes and stability of the studied mRNAs of ribosomal proteins, other mRNAs, as well as snRNAs and snoRNAs, seems more likely. The identified set of various genes, for which the amount of corresponding RNAs changes, is connected by common stages and components of RNA processing. Thus, it was found that a number of the studied genes of ribosomal proteins contain an intron, for example, *RPS11A*, *RPS23B*, *RPS27B*, *RPL14A* and *RPL18A* genes. For the pre-mRNA of *RPL18A* gene, it was previously shown that its intron forms secondary structures in the form of hairpins. These secondary structures are the target of RNase III encoded by the *RNT1* gene (Danin-Kreiselman *et al.*, 2003).

RNase III is also involved in the processing of 3'end of the precursors of a number of snRNAs. In this work, one of the groups of genes, in which the RNA level changed during the synthesis of the reporter construct with the Broccoli aptamer consisted of genes associated with mRNA splicing. In particular, here we report an increase in the level of RNA of genes encoding key snRNAs: *SNR19* and *LSR1*. The *SNR19* gene encodes U1 snRNA that provides recognition of the boundary between the intron and the 5' exon (Kretzner *et al.*, 1987). The *LSR1* gene encodes U2 snRNA, which binds to a branch point within the spliced

intron (Riedel *et al.*, 1986). The mRNA level of *PRP46* gene, which encodes one of the components of the NTC (NineTeen associated Complex) protein complex, also increased (Albers *et al.*, 2003). This complex begins to work as part of the spliceosome during and after the release of U4 snRNA. It stabilizes U5 and U6 snRNAs during the subsequent catalytic steps of the spliceosome, during which the excision of the intron occurs during two successive transesterification reactions (Chan *et al.*, 2003; Chan, Cheng 2005).

It should be noted that the U1 and U2 snRNA precursors are products of RNA polymerase II, so they undergo corresponding modifications at the 5' and 3' ends. Sample preparation for the transcriptome analysis was performed using a kit that provides cDNA synthesis based on the oligo-dT primer, which is attached to the poly-A sequence at the 3' end. Thus, the obtained data on an increase in the mRNA level of the *SNR19* and *LSR1* genes may indicate not only an increase in their expression, but also a possible disruption in the processing of their 3' ends, leading to the accumulation of polyadenylated immature RNAs.

Indeed, it has been previously demonstrated that disruption of the *RNT1* gene results in the accumulation of incompletely processed but functional U2 snRNAs, retaining the 3' end with the poly-A sequence (Abou Elela, Ares, 1998). This agrees very well with the findings of this work, which demonstrated an increase in the levels of polyadenylated U1 and U2 immature snRNAs encoded by the *SNR19* and *LSR1* genes. It can be assumed that the synthesis of a reporter construct containing a large number of secondary structures affects the activity of RNase III, for example, by diverting a part of the enzyme to itself. This, in turn, leads to impaired processing and stability of a number of RNA molecules, in the maturation of which this RNase is involved. And as a result, effects appear similar to those observed when *RNT1* gene is disrupted, In particular, the accumulation of polyadenylated snRNA precursors (Abou Elela, Ares, 1998).

In response to the synthesis of the reporter construct, the amount of RNA of genes encoding small nucleolar RNAs (snoRNAs) involved in the maturation of ribosomal RNAs increased (Smarsky, Fournier, 1999). This concerns the snoRNA genes containing the H/ACA sequence (H/ACA-box) - *SNR46* and *SNR49*. These snoRNAs ensure the formation

of pseudouridines at specific positions in maturing ribosomal RNAs (Figure 13B) (Ni *et al.*, 1997). The activity of *SNR40* gene, which encodes a snoRNA with a C/D sequence that is involved in 2'O-methylation of certain rRNA nucleotides, also increases (Figure 13 B) (Smarsky, Fournier, 1999; Lowe, Eddy, 1999). This occurs against the background of a decrease in the activity of *NOP56* gene, which encodes one of the most important components of the protein complex and the corresponding snoRNAs, and the protein carries out 2'O-methylation (Gautier *et al.*, 1997).

The studied snoRNAs are characterized by a different arrangement of targets in RNA with the implementation of various modifications. This suggests that the observed increase in the level of polyadenylated precursors of these snoRNAs is associated with different changes in the expression of the corresponding genes in response to the synthesis of the reporter construct in cells. A more probable hypothesis is that the synthesis of large amounts of the construct with the aptamer disrupts the maturation processes and stability of the snoRNAs under study.

Indeed, RNase III targets are also precursors of various snoRNAs (Chanfreau *et al.*, 1998), including snR40 and snR46. Disruption of their processing due to diversion of RNase III activity during the synthesis of large amounts of RNA molecules with a reporter construct may explain the observed accumulation of their polyadenylated precursors. This is similar to how it occurs for the U2 snRNA considered above in case of disruption of RNase III (Abou Elela, Ares, 1998).

RNase III is involved in the processing and degradation of a wide variety of RNA molecules (Gagnon *et al.*, 2015). RNase III participation in the regulation of telomerase subunit synthesis has been shown. Disruption of *RNT1* gene in the yeast *S. cerevisiae* leads to an increase in the expression of telomerase genes, in particular, *TLC1* gene encoding its RNA subunit (Larose *et al.*, 2007). This agrees very well with the results of this work, which demonstrate that the synthesis of the reporter construct with the Broccoli aptamer in yeast cells leads to an increase in the amount of telomerase RNA encoded by *TLC1* gene.

RNase III is involved in the protection of cells from excessive concentrations of iron ions. With an excess of iron, it recognizes and cuts hairpins in the mRNA of the genes involved in its transport into the cell - *FIT1-3*, *ARN1-4*, *FRE1-2* (Martínez-Pastor *et al.*, 2013). As a result, the corresponding transcripts are rapidly degraded. In this work, no significant changes in mRNA levels of these genes were observed. However, an increase in *FRA1* gene expression was observed in response to the synthesis of large amounts of the reporter aptamer RNAs. The protein encoded by this gene is a part of a complex that suppresses the transcription of genes that ensure the transport and metabolism of iron (Kumánovics *et al.*, 2008). During the experiment, *S. cerevisiae* cells were cultured in a medium with a sufficient amount of iron. It can be assumed that under these conditions, the disruption of the regulatory mechanism involving RNase III, which suppresses the expression of genes that ensure the transport of iron into the cell, is compensated by the activation of another mechanism involving the FraI protein.

RNase III plays an important role in the regulation of the synthesis of cell wall proteins (CWPs), in the cell response to various stressors associated with CWPs, and in the control of processes occurring with CWPs during cell division (Catala *et al.*, 2012). In our work, we observed changes in the mRNA levels of a number of genes involved in the biogenesis and functioning of the CWPs in *S. cerevisiae*. During the synthesis of the reporter construct with the Broccoli aptamer in yeast cells, the amount of mRNA of the *CCW12*, *MUM3*, and *CWP2* genes decreased. The *CCW12* gene encodes a mannoprotein involved in the formation of newly synthesized yeast CWPs regions (Ragni *et al.*, 2011). The *CWP2* gene product is one of the main mannoproteins in the composition of CWPs (van der Vaart *et al.*, 1995). The *MUM3* gene product works in the formation of the outer coat during sporulation (Engebrecht *et al.*, 1998).

Thus, it can be assumed that the synthesis of the RNA aptamer in yeast cells not only changes the level of RNA of certain genes, but also affects the efficiency of RNase III. Given the diversity of functions and substrates of this enzyme, it can be concluded that RNase III can play a key role in the yeast cell response to the synthesis of the RNA aptamer.

Even though the synthesis of the RNA aptamer led to a change in the level of RNA of 115 genes, this did not affect the viability of the producer strains. Therefore, the approaches developed in this work to obtain a functional RNA aptamer Broccoli can be further used in RNA nanobiotechnology for the synthesis in yeast of aptamers with a given structure that can interact with certain ligands.

5. CONCLUSION

Based on the results of the work, the following conclusions were formulated:

1. The fundamental possibility of regulated synthesis of the RNA aptamer Broccoli in *Saccharomyces cerevisiae* yeast cells has been demonstrated.
2. The synthesized RNA aptamer Broccoli adopts a native secondary structure, as evidenced by binding to the DFHBI-1T fluorophore.
3. The synthesis of the RNA aptamer Broccoli does not lead to a decrease in the viability of yeast producing cells but is accompanied by a change in the level of transcription of a number of genes that control proteins of ribosome subunits, as well as the processes of maturation and stability of various RNAs.
4. Changes in the transcriptome during the synthesis of the RNA aptamer Broccoli are similar to the changes that occur when the structural gene of RNase III is disrupted and may be due to changes in the spectrum of substrates and the efficiency of this enzyme.

REFERENCES

1. Abou Elela, S., & Ares, M., Jr (1998). Depletion of yeast RNase III blocks correct U2 3' end formation and results in polyadenylated but functional U2 snRNA. *The EMBO journal*, 17(13), 3738–3746.
2. Adachi, T., & Nakamura, Y. (2019). Aptamers: A Review of Their Chemical Properties and Modifications for Therapeutic Application. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 24(23), 4229.
3. Afrasiabi, S., Pourhajibagher, M., Raofian, R., Tabar zad, M., & Bahador, A. (2020). Therapeutic applications of nucleic acid aptamers in microbial infections. *J. Biomedical Sci*, 27(1), 6.
4. Al Shanaa, O., Romyantsev, A.M., Sambuk, E.V., Padkina, M.V. (2022). The synthesis of Broccoli RNA fluorescent aptamer in *Saccharomyces cerevisiae* yeast cells. *Ecological genetics*, 20(4), 339–348 (in Russian).
5. Albers, M., Diment, A., Muraru, M., Russell, C. S., & Beggs, J. D. (2003). Identification and characterization of Prp45p and Prp46p, essential pre-mRNA splicing factors. *RNA (New York, N.Y.)*, 9(1), 138–150.
6. Aljohani, M. M., Cialla-May, D., Popp, J., Chinnappan, R., Al-Kattan, K., & Zourob, M. (2022). Aptamers: Potential Diagnostic and Therapeutic Agents for Blood Diseases. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 27(2), 383.
7. Anju, V.T., Siddhardha, B., Dyavaiah, M. (2020). *Saccharomyces cerevisiae*: Model Organism to Evaluate Nanoparticle Toxicity. In: Siddhardha, B., Dyavaiah, M., Kasinathan, K. (eds) *Model Organisms to Study Biological Activities and Toxicity of Nanoparticles*. Springer, Singapore.
8. Aquino-Jarquín, G., & Toscano-Garibay, J. D. (2011). RNA aptamer evolution: two decades of SELEction. *Intern. J. Mol. Sci*, 12(12), 9155–9171.

9. Armitage B. A. (2011). Imaging of RNA in live cells. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 15(6), 806–812.
10. Baker, B. R., Lai, R. Y., Wood, M. S., Doctor, E. H., Heeger, A. J., & Plaxco, K. W. (2006). An electronic, aptamer-based small-molecule sensor for the rapid, label-free detection of cocaine in adulterated samples and biological fluids. *J. Amer. Chem. Soc.*, 128(10), 3138–3139.
11. Barnett J. A. (2007). A history of research on yeasts 10: foundations of yeast genetics. *Yeast (Chichester, England)*, 24(10), 799–845.
12. Bartel, D. P., & Szostak, J. W. (1993). Isolation of new ribozymes from a large pool of random sequences [see comment]. *Science (New York, N.Y.)*, 261(5127), 1411–1418.
13. Bashir, A., Yang, Q., Wang, J., Hoyer, S., Chou, W., McLean, C., Davis, G., Gong, Q., Armstrong, Z., Jang, J., Kang, H., Pawlosky, A., Scott, A., Dahl, G. E., Berndl, M., Dimon, M., & Ferguson, B. S. (2021). Machine learning guided aptamer refinement and discovery. *Nat. Commun.*, 12(1), 2366.
14. Beckert, B., & Masquida, B. (2011). Synthesis of RNA by in vitro transcription. *Meth. Mol. Biol. (Clifton, N.J.)*, 703, 29–41.
15. Besada-Lombana, P. B., McTaggart, T. L., & Da Silva, N. A. (2018). Molecular tools for pathway engineering in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 53, 39–49.
16. Bianchini, M., Radrizzani, M., Brocardo, M. G., Reyes, G. B., Gonzalez Solveyra, C., & Santa-Coloma, T. A. (2001). Specific oligobodies against ERK-2 that recognize both the native and the denatured state of the protein. *J. Immunol. Methods*, 252(1-2), 191–197.
17. Bolotin-Fukuhara, M., Dumas, B., & Gaillardin, C. (2010). Yeasts as a model for human diseases. *FEMS yeast research*, 10(8), 959–960.
18. Botstein, D., & Fink, G. R. (2011). Yeast: an experimental organism for 21st Century biology. *Genetics*, 189(3), 695–704.
19. Bouchard, P. R., Hutabarat, R. M., & Thompson, K. M. (2010). Discovery and development of therapeutic aptamers. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 50, 237–257.

20. Bouhedda, F., Autour, A., & Ryckelynck, M. (2017). Light-Up RNA Aptamers and Their Cognate Fluorogens: From Their Development to Their Applications. *Int. J. Mol. Sci.*, *19*(1), 44.
21. Breaker, R. R., & Joyce, G. F. (2014). The expanding view of RNA and DNA function. *Chem. & Biol.*, *21*(9), 1059–1065.
22. Breinig, F., Heintel, T., Schumacher, A., Meyerhans, A., & Schmitt, M. J. (2003). Specific activation of CMV-primed human T lymphocytes by cytomegalovirus pp65 expressed in fission yeast. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, *38*(3), 231–239.
23. Buglak, A.A., Samokhvalov, A.V., Zherdev, A.V. and Dzantiev, B.B., 2020. Methods and applications of in silico aptamer design and modeling. *Int. J. Mol. Sci.*, *21*(22), p.8420.
24. Burgess, S. M., Powers, T., & Mell, J. C. (2017). Budding Yeast *Saccharomyces Cerevisiae* as a Model Genetic Organism. In: eLS. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester.
25. Burke, D. H., & Willis, J. H. (1998). Recombination, RNA evolution, and bifunctional RNA molecules isolated through chimeric SELEX. *RNA (New York, N.Y.)*, *4*(9), 1165–1175.
26. Cai, R., Chen, X., Zhang, Y., Wang, X. and Zhou, N., 2023. Systematic bio-fabrication of aptamers and their applications in engineering biology. *Systems Microbiol. Biomanufact.*, *3*(2), pp.223-245.
27. Carlson B. (2007). Aptamers: the new frontier in drug development?. *Biotechnol. Healthcare*, *4*(2), 31–36.
28. Catala, M., Aksouh, L., & Abou Elela, S. (2012). RNA-dependent regulation of the cell wall stress response. *Nucl. Acids Res.*, *40*(15), 7507–7517.
29. Cejka, D., Losert, D., & Wacheck, V. (2006). Short interfering RNA (siRNA): tool or therapeutic? *Clinical science (London, England): 1979*, *110*(1), 47–58.
30. Chan, S. P., & Cheng, S. C. (2005). The Prp19-associated complex is required for specifying interactions of U5 and U6 with pre-mRNA during spliceosome activation. *J. Biol. Chem.*, *280*(35), 31190–31199.

- 31.Chan, S. P., Kao, D. I., Tsai, W. Y., & Cheng, S. C. (2003). The Prp19p-associated complex in spliceosome activation. *Science (New York, N.Y.)*, *302*(5643), 279–282.
- 32.Chanfreau, G., Legrain, P., & Jacquier, A. (1998). Yeast RNase III as a key processing enzyme in small nucleolar RNAs metabolism. *J. Mol. Biol.*, *284*(4), 975–988.
- 33.Chen, A., & Yang, S. (2015). Replacing antibodies with aptamers in lateral flow immunoassay. *Biosensors & bioelectronics*, *71*, 230–242.
- 34.Chen, H., Wang, J., Li, Q., Xu, X., Niu, C., Zheng, F., & Liu, C. (2022). Fed-Batch Fermentation of *Saccharomyces pastorianus* with High Ribonucleic Acid Yield. *Foods (Basel, Switzerland)*, *11*(18), 2742.
- 35.Chen, Z., Hu, L., Zhang, B. T., Lu, A., Wang, Y., Yu, Y., & Zhang, G. (2021). Artificial Intelligence in Aptamer-Target Binding Prediction. *Int. J. Mol. Sci.*, *22*(7), 3605.
- 36.Chen, Z., Luo, H., Gubu, A., Yu, S., Zhang, H., Dai, H., Zhang, Y., Zhang, B., Ma, Y., Lu, A., & Zhang, G. (2023). Chemically modified aptamers for improving binding affinity to the target proteins *via* enhanced non-covalent bonding. *Front. Cell Development. Biol.*, *11*, 1091809.
- 37.Chen, Z., Yoo, S. H., & Takahashi, J. S. (2018). Development and Therapeutic Potential of Small-Molecule Modulators of Circadian Systems. *Annu. Rev. Pharmacol.Toxicol.*, *58*, 231–252.
- 38.Chushak, Y., & Stone, M. O. (2009). In silico selection of RNA aptamers. *Nucl. Acids Res.*, *37*(12), e87.
- 39.Climent-Catala, A., Ouldrige, T. E., Stan, G. B. V., & Bae, W. (2022). Building an RNA-based toggle switch using inhibitory RNA aptamers. *ACS Synth. Biol.*, *11*(2), 562–569.
- 40.Coulter, L. R., Landree, M. A., & Cooper, T. A. (1997). Identification of a new class of exonic splicing enhancers by in vivo selection. *Mol. Cell. Biol.*, *17*(4), 2143–2150.
- 41.Cox, J. C., Hayhurst, A., Hesselberth, J., Bayer, T. S., Georgiou, G., & Ellington, A. D. (2002). Automated selection of aptamers against protein targets translated in vitro: from gene to aptamer. *Nucl. Acids Res.*, *30*(20), e108-e108.

42. Danin-Kreiselman, M., Lee, C. Y., & Chanfreau, G. (2003). RNase III-mediated degradation of unspliced pre-mRNAs and lariat introns. *Mol. Cell*, *11*(5), 1279–1289.
43. Demain, A. L., & Vaishnav, P. (2009). Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnol. Adv.*, *27*(3), 297–306.
44. Dinis Ano Bom, A. P., da Costa Neves, P. C., Bonacossa de Almeida, C. E., Silva, D., & Missailidis, S. (2019). Aptamers as Delivery Agents of siRNA and Chimeric Formulations for the Treatment of Cancer. *Pharmaceutics*, *11*(12), 684.
45. Dinman J. D. (2009). The eukaryotic ribosome: current status and challenges. *J. Biol. Chem.*, *284*(18), 11761–11765.
46. Dolgosheina, E. V., & Unrau, P. J. (2016). Fluorophore-binding RNA aptamers and their applications. *Wiley interdiscip. Rev.. RNA*, *7*(6), 843–851.
47. Dougherty, C. A., Cai, W., & Hong, H. (2015). Applications of aptamers in targeted imaging: state of the art. *Curr. Topics Med. Chem.*, *15*(12), 1138–1152.
48. Dower, K., & Rosbash, M. (2002). T7 RNA polymerase-directed transcripts are processed in yeast and link 3' end formation to mRNA nuclear export. *RNA (New York, N.Y.)*, *8*(5), 686–697.
49. Drinnenberg, I. A., Weinberg, D. E., Xie, K. T., Mower, J. P., Wolfe, K. H., Fink, G. R., & Bartel, D. P. (2009). RNAi in budding yeast. *Science (New York, N.Y.)*, *326*(5952), 544–550.
50. Duman-Scheel M. (2019). *Saccharomyces cerevisiae* (Baker's Yeast) as an Interfering RNA Expression and Delivery System. *Curr. drug targets*, *20*(9), 942–952.
51. Dunn, M. R., Jimenez, R. M., & Chaput, J. C. (2017). Analysis of aptamer discovery and technology. *Nat. Rev. Chem.*, *1*(10), 0076.
52. Duport, C., Spagnoli, R., Degryse, E., & Pompon, D. (1998). Self-sufficient biosynthesis of pregnenolone and progesterone in engineered yeast. *Nature biotechno.*, *16*(2), 186–189.
53. Eckert-Boulet, N., Rothstein, R., & Lisby, M. (2011). Cell biology of homologous recombination in yeast. *Meth. Mol. Biol. (Clifton, N.J.)*, *745*, 523–536.

54. Egli, M., & Manoharan, M. (2023). Chemistry, structure and function of approved oligonucleotide therapeutics. *Nucl. Acids Res.*, *51*(6), 2529–2573.
55. Einav, T., & Bloom, J. D. (2020). When two are better than one: Modeling the mechanisms of antibody mixtures. *PLoS Comput. Biol.*, *16*(5), e1007830.
56. Ellington, A. D., & Szostak, J. W. (1990). In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature*, *346*(6287), 818–822.
57. Ellington, A. D., & Szostak, J. W. (1992). Selection in vitro of single-stranded DNA molecules that fold into specific ligand-binding structures. *Nature*, *355*(6363), 850–852.
58. Engebrecht, J., Masse, S., Davis, L., Rose, K., & Kessel, T. (1998). Yeast meiotic mutants proficient for the induction of ectopic recombination. *Genetics*, *148*(2), 581–598.
59. Engel, S. R., Dietrich, F. S., Fisk, D. G., Binkley, G., Balakrishnan, R., Costanzo, M. C., Dwight, S. S., Hitz, B. C., Karra, K., Nash, R. S., Weng, S., Wong, E. D., Lloyd, P., Skrzypek, M. S., Miyasato, S. R., Simison, M., & Cherry, J. M. (2014). The reference genome sequence of *Saccharomyces cerevisiae*: then and now. *G3 (Bethesda, Md.)*, *4*(3), 389–398.
60. Escamilla-Gutiérrez, A., Ribas-Aparicio, R. M., Córdova-Espinoza, M. G., & Castelán-Vega, J. A. (2021). *In silico* strategies for modeling RNA aptamers and predicting binding sites of their molecular targets. *Nucleosides, nucleotides & nucleic acids*, *40*(8), 798–807.
61. Espah Borujeni, A., Mishler, D. M., Wang, J., Huso, W., & Salis, H. M. (2016). Automated physics-based design of synthetic riboswitches from diverse RNA aptamers. *Nucl. Acids Res.*, *44*(1), 1-13.
62. Eulberg, D., Buchner, K., Maasch, C., & Klussmann, S. (2005). Development of an automated in vitro selection protocol to obtain RNA-based aptamers: identification of a biostable substance P antagonist. *Nucl. Acids Res.*, *33*(4), e45.

63. Fadhel, M., Patel, S., Liu, E., Levitt, M., & Asif, A. (2018). *Saccharomyces cerevisiae* fungemia in a critically ill patient with acute cholangitis and long term probiotic use. *Med. Mycol. case rep.*, *23*, 23–25.
64. Felletti, M., & Hartig, J. S. (2017). Ligand-dependent ribozymes. *Wiley interdisciplinary reviews. RNA*, *8*(2), 10.1002/wrna.1395.
65. Filleur, S., Courtin, A., Ait-Si-Ali, S., Guglielmi, J., Merle, C., Harel-Bellan, A., Clézardin, P., & Cabon, F. (2003). SiRNA-mediated inhibition of vascular endothelial growth factor severely limits tumor resistance to antiangiogenic thrombospondin-1 and slows tumor vascularization and growth. *Cancer res.*, *63*(14), 3919–3922.
66. Filonov, G. S., Kam, C. W., Song, W., & Jaffrey, S. R. (2015). In-gel imaging of RNA processing using broccoli reveals optimal aptamer expression strategies. *Chem. & Biol.*, *22*(5), 649–660.
67. Filonov, G. S., Moon, J. D., Svensen, N., & Jaffrey, S. R. (2014). Broccoli: rapid selection of an RNA mimic of green fluorescent protein by fluorescence-based selection and directed evolution. *J. Amer. Chem. Soc.*, *136*(46), 16299–16308.
68. Gagnon, J., Lavoie, M., Catala, M., Malenfant, F., & Elela, S. A. (2015). Transcriptome wide annotation of eukaryotic RNase III reactivity and degradation signals. *PLoS genetics*, *11*(2), e1005000.
69. Gamalinda, M., & Woolford, J. L., Jr (2014). Deletion of L4 domains reveals insights into the importance of ribosomal protein extensions in eukaryotic ribosome assembly. *RNA (New York, N.Y.)*, *20*(11), 1725–1731.
70. Garcia, J. F., & Parker, R. (2015). MS2 coat proteins bound to yeast mRNAs block 5' to 3' degradation and trap mRNA decay products: implications for the localization of mRNAs by MS2-MCP system. *RNA (New York, N.Y.)*, *21*(8), 1393–1395.
71. García-Gómez, J. J., Fernández-Pevida, A., Lebaron, S., Rosado, I. V., Tollervey, D., Kressler, D., & de la Cruz, J. (2014). Final pre-40S maturation depends on the functional integrity of the 60S subunit ribosomal protein L3. *PLoS genetics*, *10*(3), e1004205.

72. Gautier, T., Bergès, T., Tollervey, D., & Hurt, E. (1997). Nucleolar KKE/D repeat proteins Nop56p and Nop58p interact with Nop1p and are required for ribosome biogenesis. *Mol. Cell. Biol.*, *17*(12), 7088–7098.
73. Gavrillov, K., & Saltzman, W. M. (2012). Therapeutic siRNA: principles, challenges, and strategies. *The Yale J. Biol. Med.*, *85*(2), 187–200.
74. Gazda, H. T., Sheen, M. R., Vlachos, A., Choismel, V., O'Donohue, M. F., Schneider, H., Darras, N., Hasman, C., Sieff, C. A., Newburger, P. E., Ball, S. E., Niewiadomska, E., Matysiak, M., Zaucha, J. M., Glader, B., Niemeyer, C., Meerpohl, J. J., Atsidaftos, E., Lipton, J. M., Gleizes, P. E., ... Beggs, A. H. (2008). Ribosomal protein L5 and L11 mutations are associated with cleft palate and abnormal thumbs in Diamond-Blackfan anemia patients. *Amer. J. Hum. Gen.*, *83*(6), 769–780.
75. Giangrande, P. H., de Franciscis, V., & Rossi, J. J. (Eds.). (2022). *RNA Therapeutics: The Evolving Landscape of RNA Therapeutics*. Academic Press.
76. Goddard, M. R., & Greig, D. (2015). *Saccharomyces cerevisiae*: a nomadic yeast with no niche?. *FEMS Yeast Res.*, *15*(3), fov009.
77. Goffeau, A., Barrell, B. G., Bussey, H., Davis, R. W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J. D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E. J., Mewes, H. W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H., & Oliver, S. G. (1996). Life with 6000 genes. *Science (New York, N.Y.)*, *274*(5287), 546–567.
78. Goldsworthy, V., LaForce, G., Abels, S., & Khisamutdinov, E. F. (2018). Fluorogenic RNA Aptamers: A Nano-platform for Fabrication of Simple and Combinatorial Logic Gates. *Nanomaterials (Basel, Switzerland)*, *8*(12), 984.
79. Grabow, W. W., Zakrevsky, P., Afonin, K. A., Chworos, A., Shapiro, B. A., & Jaeger, L. (2011). Self-assembling RNA nanorings based on RNAI/II inverse kissing complexes. *Nano letters*, *11*(2), 878–887.
80. Gragoudas, E. S., Adamis, A. P., Cunningham, E. T., Jr, Feinsod, M., Guyer, D. R., & VEGF Inhibition Study in Ocular Neovascularization Clinical Trial Group (2004).

- Pegaptanib for neovascular age-related macular degeneration. *The New England J. Med.*, 351(27), 2805–2816.
81. Grigorov, A.S., Mazurova, A.S., Salina, E.G., Maiorov, K.B. et al. (2017). The role of small non-coding RNA ncrv11733 in the adaptation of mycobacteria to stress. *Bull. Central Res. Instit. Tuberculosis*, (1), 50-53.
82. Guan, B., & Zhang, X. (2020). Aptamers as Versatile Ligands for Biomedical and Pharmaceutical Applications. *Intern. J. Nanomed.*, 15, 1059–1071.
83. Guo, S., Piao, X., Li, H., & Guo, P. (2018). Methods for construction and characterization of simple or special multifunctional RNA nanoparticles based on the 3WJ of phi29 DNA packaging motor. *Methods (San Diego, Calif.)*, 143, 121–133.
84. Guo, X., Zhao, B., Zhou, X., Ni, X., Lu, D., Chen, T., Chen, Y., & Xiao, D. (2020). Increased RNA production in *Saccharomyces cerevisiae* by simultaneously overexpressing FHL1, IFH1, and SSF2 and deleting HRP1. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 104(18), 7901–7913.
85. Guthrie C., Fink G. (1991) Guide to yeast genetics and molecular biology. Volume 194, pp. 3-933. Academic Press; 1st edition ISBN-10:0123106702
86. Hahn, S., & Young, E. T. (2011). Transcriptional regulation in *Saccharomyces cerevisiae*: transcription factor regulation and function, mechanisms of initiation, and roles of activators and coactivators. *Genetics*, 189(3), 705–736.
87. Hanahan D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.*, 166(4), 557–580.
88. Hassanzadeh, L., Chen, S., & Veedu, R. N. (2018). Radiolabeling of Nucleic Acid Aptamers for Highly Sensitive Disease-Specific Molecular Imaging. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, 11(4), 106.
89. Hoagland M. (1996). Biochemistry or molecular biology? the discovery of 'soluble RNA'. *Trends in Biochem. Sci.*, 21(2), 77–80.
90. Hobl, B., Hock, B., Schneck, S., Fischer, R., Mack, M. (2013). Bacteriophage T7 RNA polymerase-based expression in *Pichia pastoris*. *Protein Expr. Purif.* 92(1), 100–104.

91. Hocine, S., Raymond, P., Zenklusen, D., Chao, J. A., & Singer, R. H. (2013). Single-molecule analysis of gene expression using two-color RNA labeling in live yeast. *Nature methods*, *10*(2), 119–121.
92. Homann, M., & Göringer, H. U. (1999). Combinatorial selection of high affinity RNA ligands to live African trypanosomes. *Nucl. Acids Res.*, *27*(9), 2006–2014.
93. Hon, J., Martínek, T., Zendulka, J., & Lexa, M. (2017). pqsfinder: an exhaustive and imperfection-tolerant search tool for potential quadruplex-forming sequences in R. *Bioinformatics (Oxford, England)*, *33*(21), 3373–3379.
94. Hoogenboom H. R. (2005). Selecting and screening recombinant antibody libraries. *Nat. Biotech.*, *23*(9), 1105–1116.
95. Huang, C. J., Lin, H. I., Shiesh, S. C., & Lee, G. B. (2010). Integrated microfluidic system for rapid screening of CRP aptamers utilizing systematic evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX). *Biosensors & bioelectronics*, *25*(7), 1761–1766.
96. Huang, H., Suslov, N. B., Li, N. S., Shelke, S. A., Evans, M. E., Koldobskaya, Y., ... & Piccirilli, J. A. (2014). A G-quadruplex-containing RNA activates fluorescence in a GFP-like fluorophore. *Nat. Chem. Biol.*, *10*(8), 686–691.
97. Huang, M., Wang, G., Qin, J., Petranovic, D., & Nielsen, J. (2018). Engineering the protein secretory pathway of *Saccharomyces cerevisiae* enables improved protein production. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *115*(47), E11025–E11032.
98. Ivanova E. (2021). Yeasts in nanotechnology-enabled oral vaccine and gene delivery. *Bioengineered*, *12*(1), 8325–8335.
99. Iwano, N., Adachi, T., Aoki, K., Nakamura, Y., & Hamada, M. (2022). Generative aptamer discovery using RaptGen. *Nat. Comput. Sci.*, *2*(6), 378–386.
100. Jády, B. E., & Kiss, T. (2001). A small nucleolar guide RNA functions both in 2'-O-ribose methylation and pseudouridylation of the U5 spliceosomal RNA. *The EMBO J.*, *20*(3), 541–551.
101. Jaffrey S. R. (2018). RNA-Based Fluorescent Biosensors for Detecting Metabolites in vitro and in Living Cells. *Adv. Pharmacol.*, (San Diego, Calif.), *82*, 187–203.

102. Jagadeesan, S. K., Potter, T., Al-Gafari, M., Hooshyar, M., Hewapathirana, C. M., Takallou, S., Hajikarimlou, M., Burnside, D., Samanfar, B., Moteshareie, H., Smith, M., & Golshani, A. (2022). Discovery and identification of genes involved in DNA damage repair in yeast. *Gene*, *831*, 146549.
103. Jenison, R. D., Gill, S. C., Pardi, A., & Polisky, B. (1994). High-resolution molecular discrimination by RNA. *Science (New York, N.Y.)*, *263*(5152), 1425–1429.
104. Jensen, K. B., Atkinson, B. L., Willis, M. C., Koch, T. H., & Gold, L. (1995). Using in vitro selection to direct the covalent attachment of human immunodeficiency virus type 1 Rev protein to high-affinity RNA ligands. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *92*(26), 12220–12224.
105. Jiang, Q., Lin, L., & Wang, T. (2008). A new model for apoptosis research: Yeast. *Progr. Biochem. Biophys.*, *35*(4), 361-367.
106. Jones, C. I., Zabolotskaya, M. V., & Newbury, S. F. (2012). The 5' → 3' exoribonuclease XRN1/Pacman and its functions in cellular processes and development. *Wiley interdiscipl. Rev. RNA*, *3*(4), 455–468.
107. Josephson, S., Lagerholm, E., & Palm, G. (1984). Automatic synthesis of oligodeoxynucleotides and mixed oligodeoxynucleotides using the phosphoramidite method. *Acta Chem. Scand. Series B: Org. Chem. Biochem.*, *38*(7), 539–545.
108. Kachroo, A. H., Vandeloo, M., Greco, B. M., & Abdullah, M. (2022). Humanized yeast to model human biology, disease and evolution. *Disease models & mechanisms*, *15*(6), dmm049309.
109. Kallert, E., Fischer, T. R., Schneider, S., Grimm, M., Helm, M., & Kersten, C. (2022). Protein-Based Virtual Screening Tools Applied for RNA–Ligand Docking Identify New Binders of the preQ1-Riboswitch. *J. Chem. Inform. Modeling*, *62*(17), 4134-4148.
110. Kang, K. N., & Lee, Y. S. (2013). RNA aptamers: a review of recent trends and applications. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, *131*, 153-169.

111. Kao, C., Zheng, M., & Rüdissler, S. (1999). A simple and efficient method to reduce nontemplated nucleotide addition at the 3 terminus of RNAs transcribed by T7 RNA polymerase. *RNA (New York, N.Y.)*, 5(9), 1268–1272.
112. Karathia, H., Vilaprinyo, E., Sorribas, A., & Alves, R. (2011). *Saccharomyces cerevisiae* as a model organism: a comparative study. *PloS one*, 6(2), e16015.
113. Kawakami, J., Imanaka, H., Yokota, Y., & Sugimoto, N. (2000). In vitro selection of aptamers that act with Zn²⁺. *Journal of inorganic biochemistry*, 82(1-4), 197–206.
114. Klussmann, S. (Ed.). (2006). *The aptamer handbook: functional oligonucleotides and their applications*. John Wiley & Sons.
115. Koirala, D., Shelke, S. A., Dupont, M., Ruiz, S., DasGupta, S., Bailey, L. J., Benner, S. A., & Piccirilli, J. A. (2018). Affinity maturation of a portable Fab-RNA module for chaperone-assisted RNA crystallography. *Nucl. Acids Res.*, 46(5), 2624–2635.
116. Kolm, C., Cervenka, I., Aschl, U. J., Baumann, N., Jakwerth, S., Krska, R., Mach, R. L., Sommer, R., DeRosa, M. C., Kirschner, A. K. T., Farnleitner, A. H., & Reischer, G. H. (2020). DNA aptamers against bacterial cells can be efficiently selected by a SELEX process using state-of-the art qPCR and ultra-deep sequencing. *Scientific reports*, 10(1), 20917.
117. Kowalzik, F., Schreiner, D., Jensen, C., Teschner, D., Gehring, S., & Zepp, F. (2021). mRNA-based vaccines. *Vaccines*, 9(4), 390.
118. Kretzner, L., Rymond, B. C., & Rosbash, M. (1987). *S. cerevisiae* U1 RNA is large and has limited primary sequence homology to metazoan U1 snRNA. *Cell*, 50(4), 593–602.
119. Kumánovics, A., Chen, O. S., Li, L., Bagley, D., Adkins, E. M., Lin, H., Dingra, N. N., Outten, C. E., Keller, G., Winge, D., Ward, D. M., & Kaplan, J. (2008). Identification of FRA1 and FRA2 as genes involved in regulating the yeast iron regulon in response to decreased mitochondrial iron-sulfur cluster synthesis. *J. Biol. Chem.*, 283(16), 10276–10286.

120. Laing, C., & Schlick, T. (2009). Analysis of four-way junctions in RNA structures. *J. Mol. Biol.*, 390(3), 547–559.
121. Larose, S., Laterreur, N., Ghazal, G., Gagnon, J., Wellinger, R. J., & Elela, S. A. (2007). RNase III-dependent regulation of yeast telomerase. *J. Biol. Chem.*, 282(7), 4373–4381.
122. Laukens, B., De Visscher, C., & Callewaert, N. (2015). Engineering yeast for producing human glycoproteins: where are we now? *Future microbiol.*, 10(1), 21–34.
123. Lee, J. F., Hesselberth, J. R., Meyers, L. A., & Ellington, A. D. (2004). Aptamer database. *Nucl. Acids Res.*, 32(Database issue), D95–D100.
124. Lee, S.J., Cho, J., Lee, B.H., Hwang, D., Park, J.W. (2023) Design and Prediction of Aptamers Assisted by In Silico Methods. *Biomedicines*, 11(2), 356.
125. Li, M., Zheng, M., Wu, S., Tian, C., Liu, D., Weizmann, Y., Jiang, W., Wang, G., & Mao, C. (2018). In vivo production of RNA nanostructures via programmed folding of single-stranded RNAs. *Nat. Commun.*, 9(1), 2196.
126. Li, Z., Fu, X., Huang, J., Zeng, P., Huang, Y., Chen, X., & Liang, C. (2021). Advances in Screening and Development of Therapeutic Aptamers Against Cancer Cells. *Front. Cell Development. Biol.*, 9, 662791.
127. Liti G. (2015). The fascinating and secret wild life of the budding yeast *S. cerevisiae*. *eLife*, 4, e05835.
128. Liu, C. W., Tsai, T. C., Osawa, M., Chang, H. C., & Yang, R. J. (2018). Aptamer-based sensor for quantitative detection of mercury (II) ions by attenuated total reflection surface enhanced infrared absorption spectroscopy. *Anal. Chim. Acta*, 1033, 137–147.
129. Lohr, D., Venkov, P., & Zlatanova, J. (1995). Transcriptional regulation in the yeast GAL gene family: a complex genetic network. *FASEB J.: official publication of the Fed. of Amer. Soc. r Exper. Biol.*, 9(9), 777–787.
130. Lönne, M., Bolten, S., Lavrentieva, A., Stahl, F., Scheper, T., & Walter, J. G. (2015). Development of an aptamer-based affinity purification method for vascular endothelial growth factor. *Biotechnol. reports (Amsterdam, Netherlands)*, 8, 16–23.

131. Low, S. Y., Hill, J. E., & Peccia, J. (2009). DNA aptamers bind specifically and selectively to (1 \rightarrow 3)-beta-D-glucans. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 378(4), 701–705.
132. Lowe, T. M., & Eddy, S. R. (1999). A computational screen for methylation guide snoRNAs in yeast. *Science (New York, N.Y.)*, 283(5405), 1168–1171.
133. Macreadie, I., & Dhakal, S. (2022). The awesome power of yeast. *Microbiology Australia*, 43(1), 19-21.
134. Martell, R. E., Nevins, J. R., & Sullenger, B. A. (2002). Optimizing aptamer activity for gene therapy applications using expression cassette SELEX. *Molecular therapy: J. Amer. Soc. Gene Therapy*, 6(1), 30–34.
135. Martínez, J. L., Liu, L., Petranovic, D., & Nielsen, J. (2012). Pharmaceutical protein production by yeast: towards production of human blood proteins by microbial fermentation. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 23(6), 965–971.
136. Martínez-Pastor, M. T., de Llanos, R., Romero, A. M., & Puig, S. (2013). Post-transcriptional regulation of iron homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Int. J. Mol. Sci*, 14(8), 15785–15809.
137. McCown, P. J., Corbino, K. A., Stav, S., Sherlock, M. E., & Breaker, R. R. (2017). Riboswitch diversity and distribution. *RNA*, 23(7), 995-1011.
138. Mendonsa, S. D., & Bowser, M. T. (2004). In vitro selection of high-affinity DNA ligands for human IgE using capillary electrophoresis. *Anal. Chem.*, 76(18), 5387–5392.
139. Meyen, F. J. F. (1836). Jahresbericht über die Resultate der Arbeiten im Felde der physiologischen Botanik von dem Jahre 1835. *Archiv für Naturgeschichte*, 2(2), 15-130.
140. Miyagawa, A., Okada, Y., & Okada, T. (2020). Aptamer-Based Sensing of Small Organic Molecules by Measuring Levitation Coordinate of Single Microsphere in Combined Acoustic-Gravitational Field. *ACS omega*, 5(7), 3542–3549.
141. Moccia, F., Riccardi, C., Musumeci, D., Leone, S., Oliva, R., Petraccone, L., & Montesarchio, D. (2019). Insights into the G-rich VEGF-binding aptamer V7t1: when two G-quadruplexes are better than one! *Nucl. Acids Res.*, 47(15), 8318–8331.

142. Morena, F., Argentati, C., Tortorella, I., Emiliani, C., & Martino, S. (2021). *De novo* ssRNA Aptamers against the SARS-CoV-2 Main Protease: In Silico Design and Molecular Dynamics Simulation. *Int. J. Mol. Sci.*, 22(13), 6874.
143. Muzaev, D. M., Romyantsev, A. M., Al Shanaa, O. R., & Sambuk, E. V. (2020). Selective system based on fragments of the M1 virus for the yeast *Saccharomyces cerevisiae* transformation. *Ecological genetics*, 18(2), 251-263.
144. Nagarajan, V. K., Jones, C. I., Newbury, S. F., & Green, P. J. (2013). XRN 5'→3' exoribonucleases: structure, mechanisms and functions. *Biochim. Biophys. Acta*, 1829(6-7), 590–603.
145. Nagarkatti, R., Bist, V., Sun, S., Fortes de Araujo, F., Nakhasi, H. L., & Debrabant, A. (2012). Development of an aptamer-based concentration method for the detection of *Trypanosoma cruzi* in blood. *PloS one*, 7(8), p. e43533.
146. Ni, J., Tien, A. L., & Fournier, M. J. (1997). Small nucleolar RNAs direct site-specific synthesis of pseudouridine in ribosomal RNA. *Cell*, 89(4), 565–573.
147. Niederlender, S., Fontaine, J. J., & Karadjian, G. (2021). Potential applications of aptamers in veterinary science. *Veter. Res.*, 52(1), 79.
148. Nielsen J. (2013). Production of biopharmaceutical proteins by yeast: advances through metabolic engineering. *Bioengineered*, 4(4), 207–211.
149. Nielsen J. (2019). Yeast Systems Biology: Model Organism and Cell Factory. *Biotechnol. J.*, 14(9), e1800421.
150. Nilaratanakul, V., Hauer, D. A., & Griffin, D. E. (2020). Development of encoded Broccoli RNA aptamers for live cell imaging of alphavirus genomic and subgenomic RNAs. *Sci. Rep.*, 10(1), 5233.
151. Nissen, P., Hansen, J., Ban, N., Moore, P. B., & Steitz, T. A. (2000). The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis. *Science*, 289(5481), 920-930.
152. Okuda, M., Fourmy, D., & Yoshizawa, S. (2017). Use of Baby Spinach and Broccoli for imaging of structured cellular RNAs. *Nucl. Acids Res.*, 45(3), 1404–1415.

153. Ortolá, B., & Daròs, J. A. (2022). Production of Recombinant RNA in *Escherichia coli* Using Eggplant Latent Viroid as a Scaffold. *Meth. Mol. Biol.*, (Clifton, N.J.), 2316, 315–327.
154. Orvieto, R., & Seifer, D. B. (2016). Biosimilar FSH preparations- are they identical twins or just siblings?. *Reprod. Biol. Endocrinol.: RB&E*, 14(1), 32.
155. Ouellet J. (2016). RNA Fluorescence with Light-Up Aptamers. *Front. Chem.*, 4, 29.
156. Pace, N. R., Reich, C., James, B. D., Olsen, G. J., Pace, B., & Waugh, D. S. (1987). Structure and catalytic function in ribonuclease P. *Cold Spring Harbor symp. on quantitative biol.*, 52, 239–248.
157. Paddon, C. J., Westfall, P. J., Pitera, D. J., Benjamin, K., Fisher, K., McPhee, D., Leavell, M. D., Tai, A., Main, A., Eng, D., Polichuk, D. R., Teoh, K. H., Reed, D. W., Treynor, T., Lenihan, J., Fleck, M., Bajad, S., Dang, G., Dengrove, D., Diola, D., ... Newman, J. D. (2013). High-level semi-synthetic production of the potent antimalarial artemisinin. *Nature*, 496(7446), 528–532.
158. Paige, J. S., Wu, K. Y., & Jaffrey, S. R. (2011). RNA mimics of green fluorescent protein. *Science (New York, N.Y.)*, 333(6042), 642–646.
159. Paniel, N., & Noguèr, T. (2019). Detection of *Salmonella* in Food Matrices, from Conventional Methods to Recent Aptamer-Sensing Technologies. *Foods (Basel, Switzerland)*, 8(9), 371.
160. Park, J. Y., Lee, T. S., Song, I. H., Cho, Y. L., Chae, J. R., Yun, M., Kang, H., Lee, J. H., Lim, J. H., Cho, W. G., & Kang, W. J. (2016). Hybridization-based aptamer labeling using complementary oligonucleotide platform for PET and optical imaging. *Biomaterials*, 100, 143–151.
161. Pasquinelli A. E. (2012). MicroRNAs and their targets: recognition, regulation and an emerging reciprocal relationship. *Nature reviews. Genetics*, 13(4), 271–282.
162. Passarinha L. A. (2021). Enhanced Biosynthesis of Plasmid DNA from *Escherichia coli* Applying Experimental Design. *Meth. Mol. Biol.* (Clifton, N.J.), 2197, 135–150.

163. Peng, L., Stephens, B. J., Bonin, K., Cubicciotti, R., & Guthold, M. (2007). A combined atomic force/fluorescence microscopy technique to select aptamers in a single cycle from a small pool of random oligonucleotides. *Microscopy Res. Technique*, *70*(4), 372–381.
164. Pérez-Torrado, R., & Querol, A. (2016). Opportunistic Strains of *Saccharomyces cerevisiae*: A Potential Risk Sold in Food Products. *Front. Microbiol.*, *6*, 1522.
165. Ponchon, L., & Dardel, F. (2007). Recombinant RNA technology: the tRNA scaffold. *Nature methods*, *4*(7), 571–576.
166. Ponchon, L., Catala, M., Seijo, B., El Khouri, M., Dardel, F., Nonin-Lecomte, S., & Tisné, C. (2013). Co-expression of RNA-protein complexes in *Escherichia coli* and applications to RNA biology. *Nucl. Acids Res.*, *41*(15), e150.
167. Pontes, A., Hutzler, M., Brito, P. H., & Sampaio, J. P. (2020). Revisiting the Taxonomic Synonyms and Populations of *Saccharomyces cerevisiae*-Phylogeny, Phenotypes, Ecology and Domestication. *Microorganisms*, *8*(6), 903.
168. Praetorius, F., Kick, B., Behler, K. L., Honemann, M. N., Weuster-Botz, D., & Dietz, H. (2017). Biotechnological mass production of DNA origami. *Nature*, *552*(7683), 84–87.
169. Pregeljč, D., Skok, J., Vodopivec, T., Mencin, N., Krušič, A., Ličen, J., Nemec, K. Š., Štrancar, A., & Sekirnik, R. (2023). Increasing yield of in vitro transcription reaction with at-line high pressure liquid chromatography monitoring. *Biotechnol. Bioengineering*, *120*(3), 737–747.
170. Pronk J. T. (2002). Auxotrophic yeast strains in fundamental and applied research. *Appl. Environ. Microbiol.*, *68*(5), 2095–2100.
171. Proske, D., Blank, M., Buhmann, R., & Resch, A. (2005). Aptamers—basic research, drug development, and clinical applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, *69*, 367-374.
172. Puig Lombardi, E., & Londoño-Vallejo, A. (2020). A guide to computational methods for G-quadruplex prediction. *Nucl. Acids Res.*, *48*(1), 1–15.

173. Qiao, L., Lv, B., Feng, X., & Li, C. (2015). A new application of aptamer: One-step purification and immobilization of enzyme from cell lysates for biocatalysis. *J. Biotechnol.*, *203*, 68-76.
174. Qu, H., Csordas, A. T., Wang, J., Oh, S. S., Eisenstein, M. S., & Soh, H. T. (2016). Rapid and Label-Free Strategy to Isolate Aptamers for Metal Ions. *ACS nano*, *10*(8), 7558–7565.
175. Ragni, E., Piberger, H., Neupert, C., García-Cantalejo, J., Popolo, L., Arroyo, J., Aebi, M., & Strahl, S. (2011). The genetic interaction network of CCW12, a *Saccharomyces cerevisiae* gene required for cell wall integrity during budding and formation of mating projections. *BMC genomics*, *12*, 107.
176. Rahimizadeh, K., AlShamaileh, H., Fratini, M., Chakravarthy, M., Stephen, M., Shigdar, S., & Veedu, R. N. (2017). Development of Cell-Specific Aptamers: Recent Advances and Insight into the Selection Procedures. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *22*(12), 2070.
177. Rajeev, A., Siby, A., Koottungal, M. J., George, J., & John, F. (2021). Knocking Down Barriers: Advances in siRNA Delivery. *ChemistrySelect*, *6*(46), 13350-13362.
178. Rajesh, K., Rana, K. V., & Suri, C. R. (2013). Characterization of Hapten-Protein Conjugates: Antibody Generation and Immunoassay Development for Pesticides Monitoring. *BioNanoScience*, *3*(2), 137–144.
179. Rantasalo, A., Kuivanen, J., Penttilä, M., Jäntti, J., & Mojzita, D. (2018). Synthetic Toolkit for Complex Genetic Circuit Engineering in *Saccharomyces cerevisiae*. *ACS Synth. Biol.*, *7*(6), 1573–1587.
180. Razlansari, M., Jafarinejad, S., Rahdar, A., Shirvaliloo, M., Arshad, R., Fathi-Karkan, S., Mirinejad, S., Sargazi, S., Sheervalilou, R., Ajalli, N., & Pandey, S. (2023). Development and classification of RNA aptamers for therapeutic purposes: an updated review with emphasis on cancer. *Mol. Cell. Biochem.*, *478*(7), 1573–1598.

181. Riedel, N., Wise, J. A., Swerdlow, H., Mak, A., & Guthrie, C. (1986). Small nuclear RNAs from *Saccharomyces cerevisiae*: unexpected diversity in abundance, size, and molecular complexity. *Proc Natl. Acad. Sci USA*, *83*(21), 8097–8101.
182. Roxo, C., Kotkowiak, W., & Pasternak, A. (2019). G-Quadruplex-Forming Aptamers- Characteristics, Applications, and Perspectives. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *24*(20), 3781.
183. Ruan, M., Seydou, M., Noel, V., Piro, B., Maurel, F., & Barbault, F. (2017). Molecular dynamics simulation of a RNA aptasensor. *J. Phys. Chem. B*, *121*(16), 4071-4080.
184. Rummyantsev, A., Sidorin, A., Volkov, A., Al Shanaa, O., Sambuk, E., & Padkina, M. (2022). Transcriptome Analysis Unveils the Effects of Proline on Gene Expression in the Yeast *Komagataella phaffii*. *Microorganisms*, *10*(1), 67.
185. Rupaimoole, R., & Slack, F. J. (2017). MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases. *Nature reviews. Drug discovery*, *16*(3), 203–222.
186. Ruscito, A., & DeRosa, M. C. (2016). Small-Molecule Binding Aptamers: Selection Strategies, Characterization, and Applications. *Front. Chem.*, *4*, 14.
187. Sajja, S., Chandler, M., Striplin, C. D., & Afonin, K. A. (2018). Activation of split RNA aptamers: Experiments demonstrating the enzymatic synthesis of short RNAs and their assembly as observed by fluorescent response. *J. Chem. Edu.*, *95*(10), 1861-1866.
188. Samarsky, D. A., & Fournier, M. J. (1999). A comprehensive database for the small nucleolar RNAs from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucl. Acids Res.*, *27*(1), 161–164.
189. Sasano, Y., Kariya, T., Usugi, S., Sugiyama, M., & Harashima, S. (2017). Molecular breeding of *Saccharomyces cerevisiae* with high RNA content by harnessing essential ribosomal RNA transcription regulator. *AMB Express*, *7*(1), 32.
190. Schneider, B., Morávek, Z., & Berman, H. M. (2004). RNA conformational classes. *Nucl. Acids Res.*, *32*(5), 1666–1677.

191. Shanaa, O. A., Rumyantsev, A., Sambuk, E., & Padkina, M. (2021). In Vivo Production of RNA Aptamers and Nanoparticles: Problems and Prospects. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *26*(5), 1422.
192. Shcherbinin, D. S., Gnedenko, O. V., Khmeleva, S. A., Usanov, S. A., Gilep, A. A., Yantsevich, A. V., Shkel, T. V., Yushkevich, I. V., Radko, S. P., Ivanov, A. S., Veselovsky, A. V., & Archakov, A. I. (2015). Computer-aided design of aptamers for cytochrome p450. *J. Struct. Biol.*, *191*(2), 112–119.
193. Shu, D., Shu, Y., Haque, F., Abdelmawla, S., & Guo, P. (2011). Thermodynamically stable RNA three-way junction for constructing multifunctional nanoparticles for delivery of therapeutics. *Nature nanotechnol.*, *6*(10), 658–667.
194. Smith, D., Kirschenheuter, G. P., Charlton, J., Guidot, D. M., & Repine, J. E. (1995). In vitro selection of RNA-based irreversible inhibitors of human neutrophil elastase. *Chem. & Biol.*, *2*(11), 741–750.
195. Smith, M. G., & Snyder, M. (2006). Yeast as a model for human disease. *Curr. Protocols Hum. Gen.*, *48*(1), 15-6.
196. Song, W., Strack, R. L., & Jaffrey, S. R. (2013). Imaging bacterial protein expression using genetically encoded RNA sensors. *Nature methods*, *10*(9), 873–875.
197. Soon, S., & Nordin, N. A. (2019). In silico predictions and optimization of aptamers against *Streptococcus agalactiae* surface protein using computational docking. *Mater. Today: Proc.*, *16*, 2096-2100.
198. Srivastava, S., Abraham, P. R., & Mukhopadhyay, S. (2021). Aptamers: An Emerging Tool for Diagnosis and Therapeutics in Tuberculosis. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, *11*, 656421.
199. Stanek, D., Pridalová-Hnilicová, J., Novotný, I., Huranová, M., Blazíková, M., Wen, X., Sapra, A. K., & Neugebauer, K. M. (2008). Spliceosomal small nuclear ribonucleoprotein particles repeatedly cycle through Cajal bodies. *Mol. Biol. Cell*, *19*(6), 2534–2543.

200. Stoltenburg, R., Reinemann, C., & Strehlitz, B. (2005). FluMag-SELEX as an advantageous method for DNA aptamer selection. *Anal. Bioanal. Chem.*, 383(1), 83–91.
201. Su, Y., & Hammond, M. C. (2020). RNA-based fluorescent biosensors for live cell imaging of small molecules and RNAs. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 63, 157–166.
202. Sun, H., & Zu, Y. (2015). Aptamers and their applications in nanomedicine. *Small (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)*, 11(20), 2352–2364.
203. Svensen, N., & Jaffrey, S. R. (2016). Fluorescent RNA Aptamers as a Tool to Study RNA-Modifying Enzymes. *Cell Chem. Biol.*, 23(3), 415–425.
204. Szczebara, F. M., Chandelier, C., Villeret, C., Masurel, A., Bourot, S., Duport, C., Blanchard, S., Groisillier, A., Testet, E., Costaglioli, P., Cauet, G., Degryse, E., Balbuena, D., Winter, J., Achstetter, T., Spagnoli, R., Pompon, D., & Dumas, B. (2003). Total biosynthesis of hydrocortisone from a simple carbon source in yeast. *Nature biotechnol.*, 21(2), 143–149.
205. Terpe K. (2006). Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 72(2), 211–222.
206. Thakur, S., Sinhari, A., Jain, P., & Jadhav, H. R. (2022). A perspective on oligonucleotide therapy: Approaches to patient customization. *Front. Pharmacol.*, 13, 1006304.
207. Thiviyanathan, V., & Gorenstein, D. G. (2012). Aptamers and the next generation of diagnostic reagents. *Proteomics. Clinical appl.*, 6(11-12), 563–573.
208. Tippelt, A., & Nett, M. (2021). *Saccharomyces cerevisiae* as host for the recombinant production of polyketides and nonribosomal peptides. *Microb. Cell Fact.*, 20(1), 161.
209. Trachman, R. J., 3rd, Demeshkina, N. A., Lau, M. W. L., Panchapakesan, S. S. S., Jeng, S. C. Y., Unrau, P. J., & Ferré-D'Amaré, A. R. (2017). Structural basis for high-affinity fluorophore binding and activation by RNA Mango. *Nature Chem. Biol.*, 13(7), 807–813.

210. Traven, A., Jelcic, B., & Sopta, M. (2006). Yeast Gal4: a transcriptional paradigm revisited. *EMBO reports*, 7(5), 496–499.
211. Truong, L., & Ferré-D'Amaré, A. R. (2019). From fluorescent proteins to fluorogenic RNAs: Tools for imaging cellular macromolecules. *Protein science: a publication of the Protein Society*, 28(8), 1374–1386.
212. Tuerk, C., & Gold, L. (1990). Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science (New York, N.Y.)*, 249(4968), 505–510.
213. Tyagi S. (2009). Imaging intracellular RNA distribution and dynamics in living cells. *Nature meth.*, 6(5), 331–338.
214. Tyagi, R. D. Current Developments in Biotechnology and Bioengineering : Environmental and Health Impact of Hospital Wastewater. Ed. R. D. Tyagi. Amsterdam, Netherlands;: Elsevier, 2020. Print.
215. Umekage, S., & Kikuchi, Y. (2009). In vitro and in vivo production and purification of circular RNA aptamer. *J. Biotechno.*, 139(4), 265–272.
216. van der Vaart, J. M., Caro, L. H., Chapman, J. W., Klis, F. M., & Verrips, C. T. (1995). Identification of three mannoproteins in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.*, 177(11), 3104–3110.
217. Verschoor, A., Warner, J. R., Srivastava, S., Grassucci, R. A., & Frank, J. (1998). Three-dimensional structure of the yeast ribosome. *Nucl. Acids Res.*, 26(2), 655–661.
218. Walch, B., Breinig, T., Schmitt, M. J., & Breinig, F. (2012). Delivery of functional DNA and messenger RNA to mammalian phagocytic cells by recombinant yeast. *Gene therapy*, 19(3), 237–245.
219. Walsh G. (2018). Biopharmaceutical benchmarks 2018. *Nature biotechnol.*, 36(12), 1136–1145.
220. Walsh, G. (2010). Biopharmaceutical benchmarks 2010. *Nature biotechnol.*, 28(9), 917-924.

221. Wang, G., Huang, M., & Nielsen, J. (2017). Exploring the potential of *Saccharomyces cerevisiae* for biopharmaceutical protein production. *Curr. Opin. Biotechnol.*, *48*, 77–84.
222. Wang, H., Zhang, Y., Yang, H., Qin, M., Ding, X., Liu, R., & Jiang, Y. (2018). In Vivo SELEX of an Inhibitory NSCLC-Specific RNA Aptamer from PEGylated RNA Library. *Mol. therapy. Nucleic acids*, *10*, 187–198.
223. Wang, Y., Li, Z., & Yu, H. (2020). Aptamer-Based Western Blot for Selective Protein Recognition. *Front. Chem.*, *8*, 570528.
224. White, R., Rusconi, C., Scardino, E., Wolberg, A., Lawson, J., Hoffman, M., & Sullenger, B. (2001). Generation of species cross-reactive aptamers using "toggle" SELEX. *Molecular therapy: J. Amer. Soc. Gene Therapy*, *4*(6), 567–573.
225. Whitehead, K. A., Langer, R., & Anderson, D. G. (2009). Knocking down barriers: advances in siRNA delivery. *Nature rev. Drug discovery*, *8*(2), 129–138.
226. Wickner, R. B., Fujimura, T., & Esteban, R. (2013). Viruses and prions of *Saccharomyces cerevisiae*. *Adv. Virus Res.*, *86*, 1–36.
227. Winge, Ö., & Laustsen, O. (1937). On two types of spore germination, and on genetic segregations in *Saccharomyces*, demonstrated through single-spore cultures. *Comptes Rendus des Travaux du Laboratoire Carlsberg, Série Physiologique*, *22*, 99–117.
228. Wurster, S. E., Bida, J. P., Her, Y. F., & Maher, L. J., 3rd (2009). Characterization of anti-NF-kappaB RNA aptamer-binding specificity in vitro and in the yeast three-hybrid system. *Nucl. Acids Res.*, *37*(18), 6214–6224.
229. wwPDB consortium (2019). Protein Data Bank: the single global archive for 3D macromolecular structure data. *Nucl. Acids Res.*, *47*(D1), D520–D528.
230. Xie, S., Du, Y., Zhang, Y., Wang, Z., Zhang, D., He, L., Qiu, L., Jiang, J., & Tan, W. (2020). Aptamer-based optical manipulation of protein subcellular localization in cells. *Nature commun.*, *11*(1), 1347.
231. Xu, X., Zhao, P., & Chen, S. J. (2014). Vfold: a web server for RNA structure and folding thermodynamics prediction. *PloS one*, *9*(9), e107504.

232. Zaug, A. J., & Cech, T. R. (1987). Self-splicing RNA and an RNA enzyme in *Tetrahymena*. *J. Protozool.*, *34*(4), 416–417.
233. Zavyalova, E., Samoylenkova, N., Revishchin, A., Turashev, A., Gordeychuk, I., Golovin, A., Kopylov, A., & Pavlova, G. (2017). The Evaluation of Pharmacodynamics and Pharmacokinetics of Anti-thrombin DNA Aptamer RA-36. *Front. Pharmacol.*, *8*, 922.
234. Zemlyanko, O. M., Rogoza, T. M., & Zhouravleva, G. A. (2018). Mechanisms of bacterial multiresistance to antibiotics. *Ecological genetics*, *16*(3), 4-17.
235. Zhang, C., & Zhang, B. (2023). RNA therapeutics: updates and future potential. *Science China. Life sciences*, *66*(1), 12–30.
236. Zhang, L., Peng, H., Feng, M., Zhang, W., & Li, Y. (2020). Yeast microcapsule-mediated oral delivery of IL-1 β shRNA for post-traumatic osteoarthritis therapy. *Mol. therapy. Nucleic acids*, *23*, 336–346.
237. Zhang, X., Potty, A. S., Jackson, G. W., Stepanov, V., Tang, A., Liu, Y., Kourentzi, K., Strych, U., Fox, G. E., & Willson, R. C. (2009). Engineered 5S ribosomal RNAs displaying aptamers recognizing vascular endothelial growth factor and malachite green. *J. Mol. Recognition*, *22*(2), 154–161.
238. Zhou, J., & Rossi, J. (2017). Aptamers as targeted therapeutics: current potential and challenges. *Nature rev. Drug discovery*, *16*(6), 440.
239. Zhou, W., Huang, P. J., Ding, J., & Liu, J. (2014). Aptamer-based biosensors for biomedical diagnostics. *The Analyst*, *139*(11), 2627–2640.
240. Zhou, X., Zhang, X., Han, S., Dou, Y., Liu, M., Zhang, L., Guo, J., Shi, Q., Gong, G., Wang, R., Hu, J., Li, X., & Zhang, J. (2017). Yeast Microcapsule-Mediated Targeted Delivery of Diverse Nanoparticles for Imaging and Therapy via the Oral Route. *Nano letters*, *17*(2), 1056–1064.
241. Zhu, H., Zhang, L., Liu, Y., Zhou, Y., Wang, K., Xie, X., Song, L., Wang, D., Han, C., & Chen, Q. (2016). Aptamer-PEG-modified Fe₃O₄@Mn as a novel T1- and T2-

- dual-model MRI contrast agent targeting hypoxia-induced cancer stem cells. *Scientific reports*, 6, 39245.
242. Zhu, Y., Zhu, L., Wang, X., & Jin, H. (2022). RNA-based therapeutics: an overview and prospectus. *Cell death & disease*, 13(7), 644.
243. Zhuo, Z., Wan, Y., Guan, D., Ni, S., Wang, L., Zhang, Z., Liu, J., Liang, C., Yu, Y., Lu, A., Zhang, G., & Zhang, B. T. (2020). A Loop-Based and AGO-Incorporated Virtual Screening Model Targeting AGO-Mediated miRNA-mRNA Interactions for Drug Discovery to Rescue Bone Phenotype in Genetically Modified Mice. *Adv. Sci.*, (Weinheim, Baden-Wurttemberg, Germany), 7(13), 1903451.
244. Zhuo, Z., Yu, Y., Wang, M., Li, J., Zhang, Z., Liu, J., Wu, X., Lu, A., Zhang, G., & Zhang, B. (2017). Recent Advances in SELEX Technology and Aptamer Applications in Biomedicine. *Int. J. Mol. Sci.*, 18(10), 2142.
245. Zinskie, J. A., Roig, M., Janetopoulos, C., Myers, K. A., & Bruist, M. F. (2018). Live-cell imaging of small nucleolar RNA tagged with the broccoli aptamer in yeast. *FEMS yeast research*, 18(8), 10.1093/femsyr/foy093.
246. Zou, X., Wu, J., Gu, J., Shen, L., & Mao, L. (2019). Application of Aptamers in Virus Detection and Antiviral Therapy. *Front. Microbiol.*, 10, 1462.
247. Zuker M. (2003). Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucl. Acids Res.*, 31(13), 3406–3415.

SUPPLEMENTARY MATERIALS

Table S1

<i>Table S1. Results of DEseq2 analysis for genes with differentiated expression in yeast synthesizing RNA aptamer</i>								
<i>Gene - gene names (retrieved from NCBI and SGD)</i>								
<i>baseMean - the average value of the number of normalized reads</i>								
<i>log2FoldChange — logarithm of expression level change</i>								
<i>lfcSE - standard error of log2FoldChange value</i>								
<i>stat - Wald test statistic value</i>								
<i>P value - p-value</i>								
<i>P adj value - adjusted p-value by the Benjamini-Hochberg method</i>								
List of genes with RNA levels decrease in response to reporter construct synthesis in cells								
	Gene		baseMean	log2FoldChan ge	lfcSE	stat	pvalue	padj
1	YLR227 W-B		812.244317 288633	- 1.4865299415 8653	0.06050085 80640956	- 24.570394 3572449	2.6187437223274 8e-133	3.5126082462152 6e-130
2	YOR142 W-B		962.623712 660624	- 0.8644625801 00935	0.05334152 04686144	- 16.206185 5850093	4.5600729603040 9e-59	3.6699467184527 3e-56
3	YLR110 C	CCW1 2	537.298946 492214	- 0.6168187426 62513	0.06591436 66462934	- 9.3578801 4125141	8.1352461967512 2e-21	1.9256606291604 1e-18
4	YDR050 C	TPI1	120.548808 567361	- 1.0491961210 6366	0.13523455 5267138	- 7.7583434 1297689	8.6045896157600 2e-15	1.5054290701660 1e-12
5	YKL152 C	GPM1	154.095584 692314	- 0.7628223880 57912	0.11669478 1309261	- 6.5369023 3187295	6.2806032898771 9e-11	9.0261241565949 3e-09
6	YLR155 C	ASP3- 1	20.4861956 527702	- 2.9424348392 2052	0.47105314 3560022	- 6.2465029 2530229	4.1974416193327 9e-10	5.2782828363109 9e-08

7	YDL148 C	NOP1 4	38.3745901 743603	- 1.6181552116 4528	0.26023665 6574414	- 6.2180141 4506941	5.0348618240061 1e-10	6.1394799938789 7e-08
8	YDR524 W-C		148.927192 287866	0.7075872314 04013	0.11834703 6019897	5.9789180 6335608	2.2462449818684 1e-09	2.5108027241773 5e-07
9	YDR497 C	ITR1	129.579731 903513	0.7505477699 48193	0.12673462 6298966	5.9221997 3235772	3.1766347095484 1e-09	3.3415585062404 9e-07
10	YGR106 C	VOA1	21.0322242 152243	2.0351324436 2539	0.38350942 4400778	5.3066034 7344847	1.1168677214971 3e-07	8.6428379063547 4e-06
11	YOR298 W	MUM3	80.8437950 872365	0.8336842755 72015	0.16088273 2187744	5.1819375 7798155	2.1959271181175 2e-07	1.5779304863044 4e-05
12	YLR075 W	RPL10	39.9253445 068186	1.2550812638 4436	0.24213612 2308335	5.1833706 259083	2.1791140182897 8e-07	1.5779304863044 4e-05
13	YML028 W	TSA1	111.636588 532236	0.6851955085 97545	0.13548904 7434222	5.0572021 9879911	4.2545207273588 7e-07	2.7174906995066 8e-05
14	YDR025 W	RPS1 1A	31.0999265 12011	1.3771219503 2027	0.28021767 1542702	4.9144721 7707116	8.9021965872573 4e-07	5.3466326965856 e-05
15	YHR179 W	OYE2	115.410739 335061	0.6478505355 80594	0.13287422 8578475	4.8756673 322696	1.0844122692204 9e-06	6.4171690755047 7e-05
16	YKL006 W	RPL14 A	48.0285581 5466	1.0407682640 9958	0.21409571 2457326	4.8612288 9689829	1.1665926534536 e-06	6.8034330978221 5e-05
17	YOL120 C	RPL18 A	69.6987029 743728	0.8438143888 60549	0.17371312 2228694	4.8575166 8057446	1.1886712648523 e-06	6.8331616710938 1e-05
18	YNL265 C	IST1	14.7968995 781532	2.4005133163 4107	0.49556708 0777822	4.8439725 1038815	1.2726854830788 6e-06	7.2130794139567 9e-05

19	YLR197 W	NOP5 6	47.2868231 441662	- 2936	1.0346343736	0.21571825 6471281	- 0182694	4.7962300 5e-06	1.6167962976035 5e-05	8.9123127418584
20	Q0130	OLI1	37.3552045 237033	- 3811	1.1887839619	0.24810419 3985807	- 4320127	4.7914706 5e-06	1.6556324824231 8e-05	9.0030609584739
21	YKL060 C	FBA1	113.469185 111024	- 92647	0.6389196063	0.13387829 5987406	- 3549009	4.7723912 9e-06	1.8205142595901 4e-05	9.6413688278168
22	YIR018C -A		25.0102181 802102	- 375	1.5153248859	0.32113214 6195054	- 266405	4.7186957 4e-06	2.3736152932819 58846	0.0001179188634
23	Gene		baseMean	log2FoldChan ge		lfcSE	stat	pvalue	padj	
24	YEL033 W	MTC7	87.3412960 435425	- 72671	0.7206435319	0.15332085 8980777	- 0641897	4.7002315 2e-06	2.5986672009891 29027	0.0001275248392
25	YLR293 C	GSP1	40.2147277 24967	- 4142	1.1047964500	0.23633451 2677609	- 2486566	4.6747148 8e-06	2.9436236464206 1747	0.0001413442430
26	YAL037 C-A		33.6791688 529941	- 1246	1.2407176419	0.26543763 3026816	- 2333969	4.6742341 8e-06	2.9505259476807 1747	0.0001413442430
27	YPL066 W	RGL1	10.9245958 325049	- 7344	3.6909541901	0.79073072 8798399	- 4376527	4.6677763 6e-06	3.0447707778898 08574	0.0001441430307
28	YDL104 C	QRI7	31.2178889 361233	- 2078	1.2956416136	0.27943810 0303476	- 2706243	4.6365961 4e-06	3.5419351326336 10228	0.0001643541111
29	YLR264 C-A		18.2685822 884157	- 0075	1.8675094384	0.40283392 8891415	- 6413533	4.6359288 5e-06	3.5533816268861 10228	0.0001643541111
30	YDR168 W	CDC3 7	33.7423366 590118	- 8068	1.2042685088	0.26220511 2056992	- 8457057	4.5928490 4e-06	4.3723526294731 33332	0.0001954927442
31	YPL131 W	RPL5	103.602522 800592	- 1853	0.6426354364	0.14006441 8346448	- 7071078	4.5881419 1e-06	4.4720847795684 76739	0.0001977546060

32	YEL009 C	GCN4	132.848295 961614	- 0.5638711877 33709	0.12339894 2420772	- 4.5694977 3370821	4.8889445273614 5e-06	0.0002115388470 76371
33	YPR132 W	RPS2 3B	98.5879196 812728	- 0.6555216978 55469	0.14361597 1457171	- 4.5644066 6873153	5.0090897841171 9e-06	0.0002121744978 03027
34	YHR021 C	RPS2 7B	19.9915904 206145	- 1.6970718289 0608	0.37168830 7337704	- 4.5658466 9305772	4.9748225330084 e-06	0.0002121744978 03027
35	YDR496 C	PUF6	28.3358517 367788	- 1.3330919796 2788	0.29227568 6624242	- 4.5610772 3165405	5.0891856748480 3e-06	0.0002133216995 3738
36	YOR063 W	RPL3	86.0764876 031592	- 0.7001391243 86091	0.15427695 6059958	- 4.5381963 8568699	5.6737410216286 9e-06	0.0002306175138 48827
37	YGR161 C-D		38.6084763 984554	- 1.0843731425 2019	0.24097124 8416266	- 4.5000104 7696358	6.7950113352082 4e-06	0.0002680698589 49784
38	YPR102 C	RPL11 A	54.8202321 61068	- 0.8858848586 58359	0.19709618 6893681	- 4.4946828 8869651	6.9673699029304 8e-06	0.0002722009367 90216
39	YKL096 W-A	CWP2	48.7469361 630839	- 0.9410826948 78092	0.21062925 2396009	- 4.4679581 9750973	7.8969732432413 5e-06	0.0003026420983 88602
40	YMR116 C	ASC1	62.7889148 729763	- 0.8135060036 23055	0.18273998 5625853	- 4.4517131 8601638	8.5187900862881 1e-06	0.0003219729314 7078
41	YJL052 W	TDH1	125.904449 228004	- 0.5614160212 78743	0.12658309 2932811	- 4.4351580 3154483	9.2004771779738 9e-06	0.0003413906401 68327
42	YOL126 C	MDH2	11.5907767 544796	- 2.6698109726 8571	0.60211406 6218605	- 4.4340617 8741621	9.2474104816967 3e-06	0.0003413906401 68327
43	YHR009 C	TDA3	14.2568960 261727	- 2.0628755455 7827	0.48235039 9090797	- 4.2767157 4329921	1.8967073805299 9e-05	0.0006523376495 08776

44	YBR031 W	RPL4 A	56.0622279 430731	- 0.8251574451 08681	0.19343719 8648011	- 4.2657640 3543863	1.9921925174871 3e-05	0.0006680485575 30685
45	YKL145 W	RPT1	28.7935212 187236	- 1.2213487851 0615	0.28675793 54371	- 4.2591629 8792034	2.0519381468910 3e-05	0.0006783786807 31147
46	YNL143 C		21.9747237 585869	- 1.4500382075 333	0.34257861 8204299	- 4.2327166 1008499	2.3088536101652 2e-05	0.0007501493829 30102
47	YJR105 W	ADO1	59.0695785 277891	- 0.7940701800 53525	0.18808488 6623319	- 4.2218712 7477087	2.4228246994230 5e-05	0.0007799557272 38267
48	YCL011 C	GBP2	15.8512042 764884	- 1.7989840521 1872	0.42916860 906087	- 4.1917885 281856	2.7676391714268 4e-05	0.0008838873036 36634
49	YEL071 W	DLD3	48.9319521 988683	- 0.8726657820 91778	0.20845371 9830821	- 4.1863766 3458357	2.8344287407735 9e-05	0.0008980898624 3094

List of genes with RNA levels increase in response to reporter construct synthesis in cells

	Gene	baseMean	log2FoldChange	lfcSE	stat	pvalue	padj	
1	YGR027 W-B	5177.55666 246038	0.9274029367 77303	0.03505721 18876608	26.453984 4112282	3.2832595163505 7e-154	1.3211836293794 7e-150	
2	Q0158 21S_R RNA	8950.69685 244304	0.9140171214 73512	0.03464483 13152821	26.382495 9387327	2.1761332344838 3e-153	4.3783800677814 7e-150	
3	YLR157 C-B	1891.42369 001149	1.0295667978 9585	0.04214435 71018339	24.429529 0923075	8.3064626234515 e-132	8.3563013991922 e-129	
4	YNCG00 24W	SNR4 6	417.496429 877927	1.1610053834 1531	0.07351377 58146927	15.793031 5855613	3.4747128040598 7e-56	2.3303740539228 2e-53
5	YNCB00 19C	LSR1	1747.67476 098585	0.6324454505 46266	0.04252534 12055643	14.872201 6712123	4.9943489019475 4e-50	2.8710371402052 7e-47

6	YEL021 W	URA3	653.322779 119522	0.8577524462 16019	0.05994433 36601607	14.309149 7368013	1.9184449515811 9e-46	9.6497781064533 9e-44
7	YBR012 W-B		66.0373221 090167	2.5082535124 7505	0.20940054 7241925	11.978256 721446	4.6193517886760 1e-33	2.0653635108480 3e-30
8	YDR070 C	FMP1 6	182.293355 594755	1.2758640019 2918	0.10775227 9820584	11.840714 6842145	2.4039564479714 7e-32	9.6735207466371 9e-30
9	YMR169 C	ALD3	485.263486 010032	0.7881704567 70348	0.06743678 64005978	11.687544 7191143	1.4759187773537 7e-31	5.3991792364287 e-29
10	YAR010 C		362.625542 597384	0.8473776568 32268	0.07654686 16912422	11.070050 9218815	1.7530096896937 3e-28	5.6579639058155 8e-26
11	Q0055	AI2	390.032000 807443	0.8199846516 6818	0.07409743 46877849	11.066302 8365725	1.8278710431312 8e-28	5.6579639058155 8e-26
12	Q0050	AI1	974.742295 080594	0.5652459911 8704	0.05114588 27809911	11.051642 0961478	2.1524129063272 6e-28	6.1866496679006 4e-26
13	YER103 W	SSA4	722.174395 614217	0.5987235665 80126	0.05720122 16102242	10.466971 6786802	1.2249928523936 9e-25	3.0808570237701 4e-23
14	YNCN00 05C	SNR1 9	178.018368 606943	0.9403370535 06954	0.10627587 6381379	8.8480762 0999978	8.9040841579882 4e-19	1.9905574806524 8e-16
15	YIL136W	OM45	248.839850 390842	0.7271572479 75309	0.09008886 83663472	8.0715549 1196002	6.9408493254614 9e-16	1.3299989374122 4e-13
16	YDR074 W	TPS2	93.2168843 54478	1.1610420401 1044	0.14784635 0229111	7.8530314 6348366	4.0609973515962 5e-15	7.4279333376469 6e-13
17	YML054 C	CYB2	74.9216016 727923	1.2750686838 5681	0.16594602 4582844	7.6836350 076001	1.5463683659653 2e-14	2.5927442936018 5e-12
18	YGR243 W	MPC3	264.592767 452754	0.5962403147 53222	0.08725105 25395401	6.8336174 4527976	8.2799648529376 5e-12	1.3327431427288 4e-09
19	YKR009 C	FOX2	37.0239382 875122	1.5693243623 6103	0.24551123 047738	6.3920675 2094224	1.6365759601734 5e-10	2.2708902288751 6e-08
20	YDR508 C	GNP1	136.994121 211802	0.7545524811 37564	0.11931307 0810959	6.3241393 0853466	2.5464791722986 9e-10	3.4156773964433 e-08
21	YOR161 C	PNS1	43.4531779 526771	1.3843046958 8834	0.22148949 8768574	6.2499789 0908926	4.1050811568720 6e-10	5.2782828363109 9e-08
22	YKR072 C	SIS2	73.0422913 75705	1.0005380043 6635	0.16487025 3367172	6.0686387 2610249	1.2899896093044 4e-09	1.5267406434826 7e-07
23	YLL029 W	FRA1	100.046563 525315	0.8414504827 9728	0.13965223 2190122	6.0253278 4189038	1.6876717549573 2e-09	1.9403403262709 3e-07

24	YNCN00 18W	SNR4 9	33.9212653 409708	1.5157558289 8814	0.25526399 5256205	5.9379930 4702882	2.8853227640727 9e-09	3.1379834601699 7e-07
25	YOL081 W	IRA2	223.267415 132445	0.5574606568 6165	0.09418118 74924781	5.9190234 4516704	3.2385880154915 3e-09	3.3415585062404 9e-07
26	YKL217 W	JEN1	41.2193951 481103	1.3240468247 3302	0.22622028 7798073	5.8529092 930643	4.8304760768059 6e-09	4.7409355446505 4e-07
27	YDL214 C	PRR2	46.1941414 928606	1.2320528402 6922	0.21138977 408673	5.8283464 5427894	5.5979269321035 5e-09	5.3633471368535 e-07
28	YOR023 C	AHC1	69.5442328 424506	0.9800831026 64557	0.16847859 9147093	5.8172557 6794997	5.9821573491983 5e-09	5.5981863193428 3e-07
29	YMR045 C		108.022392 338259	0.7723199771 13814	0.13388829 5965138	5.7683905 1947388	8.0032178143594 3e-09	7.3193064738596 3e-07
30	YMR250 W	GAD1	71.5984039 606918	0.9451456050 18283	0.16568062 6849708	5.7046235 458515	1.1660049670566 5e-08	1.0426675527635 4e-06
31	YHR033 W		208.285711 000747	0.5542534792 92256	0.09728303 38766616	5.6973292 9993688	1.2169872890383 7e-08	1.0645993154544 3e-06
32	YPR149 W	NCE1 02	159.432334 463537	0.6135599999 92518	0.11040284 2418478	5.5574656 1005051	2.7371989136893 7e-08	2.3435081763161 7e-06
33	YDR316 W-B		99.9506030 19725	0.7718178442 37044	0.13924300 3094011	5.5429560 3432184	2.9740755689737 9e-08	2.4932666853230 3e-06
		<i>Gene</i>	<i>baseMean</i>	<i>log2FoldChan</i> <i>ge</i>	<i>lfcSE</i>	<i>stat</i>	<i>pvalue</i>	<i>padj</i>
34	YMR303 C	ADH2	51.0597122 629782	1.0668859001 761	0.19851930 757787	5.3742173 1514763	7.6916048105202 9e-08	6.1902035515067 3e-06
35	Q0085	ATP6	25.7886638 379389	1.6128392515 6771	0.30112701 3921632	5.3560098 4635489	8.5079874432816 8e-08	6.7129689160324 5e-06
36	YLR410 W-B		12.9564827 388411	2.6711043796 8392	0.50933987 4493895	5.2442475 3184316	1.5692141337671 3e-07	1.1914184291092 3e-05
37	YKR054 C	DYN1	15.4702461 147937	2.2387222985 7885	0.42994183 2539944	5.2070352 9906189	1.9188160248714 e-07	1.4298732748300 9e-05
38	YBR117 C	TKL2	32.0285171 997431	1.3423207700 2441	0.25940336 0974812	5.1746467 9324162	2.2834252706143 5e-07	1.6120181208688 e-05
39	YPL239 W	YAR1	25.3357441 436006	1.5380801814 5915	0.30042374 5426557	5.1197024 3655441	3.0601812165433 6e-07	2.0523615358950 8e-05
40	YNCN00 01W	SNR4 0	37.4632195 598165	1.2008742776 1346	0.23531655 8167037	5.1032289 7363234	3.3390658925505 5e-07	2.2026887133808 8e-05

41	YGR237 C		39.7988076 278411	1.1597192447 0239	0.22765221 8136466	5.0942584 8865306	3.5010882011444 2e-07	2.2723191808718 e-05
42	YDL174 C	DLD1	104.574863 157588	0.6814175720 78508	0.13563081 535582	5.0240616 0643394	5.0589997190079 8e-07	3.1808460733262 7e-05
43	YJR049 C	UTR1	64.1566006 056302	0.8669711143 97005	0.17454228 3985041	4.9671122 35516	6.7957261192748 2e-07	4.2070772159941 4e-05
44	YFL031 W	HAC1	129.887648 728829	0.5862142852 36129	0.12166056 8719082	4.8184411 0551311	1.4468421955710 2e-06	8.0862402708024 9e-05
45	YLR203 C	MSS5 1	18.9785259 491356	1.7027043577 9475	0.35678569 7830113	4.7723447 6648082	1.8209344704624 3e-06	9.6413688278168 4e-05
46	YIL045W	PIG2	159.181517 464676	0.5231591567 13547	0.11020794 7659532	4.7470184 1222698	2.0643716615818 8e-06	0.0001078835268 33837
47	Q0075	AI5_B ETA	59.3988473 947692	0.8602092136 57867	0.18133427 9396997	4.7437760 6108661	2.0977073948140 8e-06	0.0001082201866 24767
48	YDL215 C	GDH2	15.6116711 099699	1.9302332429 7856	0.40837661 927751	4.7266007 6963633	2.2830951553170 7e-06	0.0001148396863 12449
49	YBR212 W	NGR1	65.2972720 042661	0.8148807277 81591	0.17237504 5289664	4.7273706 3774076	2.2744587474586 4e-06	0.0001148396863 12449
50	YGR019 W	UGA1	56.6780968 339772	0.8582371483 35559	0.18584164 0797232	4.6181100 4602549	3.8725088272205 2e-06	0.0001770792672 81084
51	YPL147 W	PXA1	85.9018790 78928	0.6903358659 70523	0.14964064 2749066	4.6132912 3751595	3.9634233126252 4e-06	0.0001792001731 46112
52	YNCB00 10W	TLC1	156.991441 627593	0.5046533073 83107	0.11085995 7158607	4.5521694 2453892	5.3095549281119 5e-06	0.0002202644229 97139
53	YGR248 W	SOL4	42.4731544 01267	0.9938641073 32938	0.21877110 2187808	4.5429405 3187946	5.5474905107558 e-06	0.0002277867532 17157
54	YOR290 C	SNF2	92.1946506 810138	0.6532233390 24443	0.14415444 8769277	4.5314129 7130514	5.8590473992945 6e-06	0.0002357680673 47613
55	YLR330 W	CHS5	81.3644327 072369	0.6926170333 91802	0.15359751 2350269	4.5092985 0876969	6.5042336033648 4e-06	0.0002591389704 94457
56	YLR182 W	SWI6	13.5089557 979557	1.9978568932 4181	0.44629383 934799	4.4765504 6316697	7.5858743915159 e-06	0.0002935149860 71731
57	YCR010 C	ADY2	58.5505887 292302	0.8135144440 54416	0.18278587 587064	4.4506417 1495478	8.5614074720112 8e-06	0.0003219729314 7078
58	YKL010 C	UFD4	36.7890704 396939	1.0399061717 9865	0.23492720 8470083	4.4265037 6076417	9.5772713462547 2e-06	0.0003503539990 66627

59	YBL075 C	SSA3	100.239427 962574	0.6052785302 51782	0.13811291 3292884	4.3824904 9868509	1.1733028443786 e-05	0.0004253487068 26981
60	YNR047 W	FPK1	51.5747603 903873	0.8515613085 43026	0.19505619 9000313	4.3657228 6811381	1.2670303933356 9e-05	0.0004552259198 91325
61	YKR098 C	UBP1 1	35.2462737 29943	1.0475043354 6319	0.24036948 2560257	4.3578923 7596165	1.3132092784239 3e-05	0.0004635398365 24376
62	YIL057C	RG12	127.607110 016945	0.5306953986 39113	0.12259868 7739737	4.3287200 5747498	1.4997842736663 4e-05	0.0005247940797 59422
63	YPL151 C	PRP4 6	13.1198913 04669	1.9445739716 8111	0.45516107 4242387	4.2722765 2302615	1.9348742727721 3e-05	0.0006567374449 71805
64	YDL085 W	NDE2	31.4032414 855992	1.0967738276 213	0.25676905 8568544	4.2714407 7925777	1.9421410524762 6e-05	0.0006567374449 71805
65	YDR361 C	BCP1	8.53519507 34195	2.7852361286 9578	0.65401960 5077031	4.2586431 7686277	2.0567146881013 9e-05	0.0006783786807 31147
66	YDL074 C	BRE1	14.4322764 48923	1.7858653848 804	0.42194601 2551002	4.2324499 6222007	2.3115935259277 5e-05	0.0007501493829 30102
67	YJL131C	AIM23	11.7299094 593826	2.0362246911 56	0.48778304 7466405	4.1744474 3463792	2.9871017719687 9e-05	0.0009390701195 6269

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to thank Saint Petersburg State University for providing me with a scholarship to continue my doctoral work at the Faculty of Biology. I also want to thank the friendly and highly professional team of the Laboratory of Biochemical Genetics of the Department of Genetics and Biotechnology. Special thanks to my supervisor Marina Vladimirovna Padkina for all the efforts she made to complete this work. I would like to thank Andrei Mikhailovich Rumyantsev for always being in the laboratory to help and for all the skills I learned from him, especially in the fields of genetics, biochemistry and molecular biology. Thanks to Anton Vitalyovich Sidorin for his help in the bioinformatic part of the work.

САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

На правах рукописи

Аль Шанаа Усама

СИНТЕЗ АПТАМЕРОВ РНК В КЛЕТКАХ ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES*
CEREVISIAE

Научная специальность 1.5.7. Генетика

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Перевод с английского

Научный руководитель:
доктор биологических наук, доцент
Падкина Марина Владимировна

Санкт-Петербург

2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	116
ВВЕДЕНИЕ.....	118
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	123
1.1 Аптамеры ДНК и РНК	123
1.1.1 Совершенствование методов отбора и синтеза аптамеров РНК.....	125
1.1.2 Аптамеры в фундаментальных и прикладных исследованиях.....	129
1.1.3 Функциональное и структурное разнообразие РНК как основа для получения аптамеров.....	130
1.1.4 Флуорогенные аптамеры РНК.....	133
1.2 Дрожжи <i>Saccharomyces cerevisiae</i> в фундаментальных и прикладных исследованиях.....	137
1.2.1 Дрожжи <i>S. cerevisiae</i> как модельный организм для изучения механизмов и регуляции основных биологических процессов у эукариот.....	138
1.2.2 Дрожжи <i>S. cerevisiae</i> - продуценты белков и других биологически активных соединений.....	140
1.2.3 Перспективы использования дрожжей <i>S. cerevisiae</i> для продукции и доставки аптамеров РНК.....	143
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	146
2.1 Штаммы бактерий <i>Escherichia coli</i> и дрожжей <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	146
2.2 Среды и условия культивирования	146
2.3 Плазмиды, использованные в работе.....	147
2.4 Трансформация бактерий.....	149

2.5 Трансформация дрожжей.....	149
2.6 Молекулярно-биологические методы.....	150
2.6.1 Выделение плазмидной ДНК	150
2.6.2 Выделение хромосомной ДНК дрожжей.....	150
2.6.3 Полимеразная цепная реакция	151
2.6.4 Рестрикция ДНК, лигирование фрагментов ДНК.....	153
2.6.5 Электрофоретическое разделение ДНК.....	153
2.6.6 Секвенирование ДНК	153
2.7 Анализ флуоресценции клеток дрожжей.....	154
2.8 Транскриптомный анализ.....	154
2.8.1 Выделение суммарной РНК дрожжей.....	154
2.8.2 Получение библиотеки кДНК и секвенирование.....	155
2.8.3 Анализ дифференциальной экспрессии генов дрожжей.....	155
2.9 Статистическая обработка данных.....	156
3 РЕЗУЛЬТАТЫ.....	157
3.1 Разработка репортерной конструкции на основе аптамера РНК <i>Brossoli</i>	157
3.1.1 Получение плазмиды pYES2-PGAL-Br-TC.....	158
3.1.2 Получение плазмиды pYES2-PSNR5-Br-TS.....	163
3.1.3. Экспрессия плазмид pYES2-PGAL-Br-TC и pYES2-PSNR5-Br-TS в клетках дрожжей <i>S. cerevisiae</i>	166
3.2 Анализ транскриптома дрожжей, синтезирующих аптамер РНК <i>Brossoli</i>	168
3.3 Получение штамма дрожжей <i>S. cerevisiae</i> с делецией в гене <i>XRN1</i>	172
3.3.1 Получение плазмиды pPICZ-5'-3'-XRN1 для внесения делеции гена <i>XRN1</i>	172
3.3.2 Получение штамма дрожжей с делецией в гене <i>XRN1</i> и оценка его жизнеспособности.....	177

4 ОБСУЖДЕНИЕ.....	181
5 ВЫВОДЫ.....	193
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	194
ПРИЛОЖЕНИЕ.....	220
БЛАГОДАРНОСТИ.....	229

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

ДТТ - дитиотреитол

ИПС – изопропиловый спирт

ЛУК – ледяная уксусная кислота

ПСА – персульфат аммония

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ЭДТА - этилендиаминтетрауксусная кислота

DFHBI-1T (5Z)-5-[(3,5-Difluoro-4-hydroxyphenyl)methylene]-3,5-dihydro-2-methyl-3-(2,2,2-trifluoroethyl)-4H-imidazol-4-one ((5Z)-5-[(3,5-дифтор-4-гидроксифенил)метилен]-3,5-дигидро-2-метил-3-(2,2,2-трифторэтил)-4H-имидазол-4-он)

FACS - Fluorescence-activated cell sorting (сортировки клеток с активированной флуоресценцией)

FDA - Food and Drug Administration (Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов — агентство Министерства здравоохранения и социальных служб США)

GFP - green fluorescent protein (зеленый флуоресцентный белок)

HIS – histidine (гистидин)

Лас – lactose (лактоза)

LB – среда Luria-Bertani для культивирования *E. coli*

LEU – leucine (лейцин)

MBS - MS2 phage binding site (последовательность РНК, с которой взаимодействует бактериофага MS2)

MCP - MS2 coat protein (белок оболочки бактериофага MS2)

PBS - Phosphate buffered saline (фосфатно-солевой буфер)

PGAL - galactose promoter (промотор генов Gal)

RNAi - RNA интерференция

SGD - *Saccharomyces genome database* (База данных генома *Saccharomyces*, база данных по молекулярной биологии и генетике дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*)

TRP – tryptophan (триптофан)

URA – uracil (урацил)

UTR - untranslated region (нетранслируемая область мРНК)

VEGF - Vascular endothelial growth factor (фактор роста эндотелия сосудов)

YPD – Yeast Extract Peptone Dextrose (дрожжевая питательная среда, содержащая дрожжевой экстракт, пептон, глюкозу)

XRN1 - 5'3' exoribonuclease 1 (5'3'экзорибонуклеаза 1)

ZEO – антибиотик зеоцин

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Аптамеры представляют собой синтетические олигонуклеотиды ДНК и РНК с определенной трехмерной структурой, которые с высокой аффинностью и специфичностью взаимодействуют с различными мишенями, начиная от молекул и заканчивая клетками. Благодаря этим особенностям аптамеры используются в фундаментальных исследованиях, а также в прикладных целях (Shanaa O.A. *et al.*, 2021; Niederlender *et al.*, 2021; Srivastava *et al.*, 2021; Razlansari *et al.*, 2022).

Особый интерес представляют аптамеры РНК. Разнообразие структурных мотивов, встречающиеся в молекулах РНК, позволяет получать варианты аптамеров заданной конформации, которая необходима для взаимодействия с конкретными мишенями и лигандами. В настоящее время основным способом получения аптамеров РНК является химический или ферментативный синтез *in vitro*, что связано с высокой стоимостью и низкой производительностью. Синтез аптамеров РНК *in vivo* является важным аспектом РНК нанотехнологии. В данной работе для синтеза аптамеров РНК *in vivo* использованы дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*. Выбор дрожжей *S. cerevisiae* в качестве продуцента аптамеров РНК обусловлен отсутствием компонентов РНК-интерференции, что продлевает период существования молекул РНК *in vivo*. Кроме того, использование эукариотических микроорганизмов для синтеза аптамеров РНК позволяет оценивать поведение, свойства, стабильность таких аптамеров у высших эукариот.

Степень разработанности темы

Создание надежной платформы для биологического синтеза аптамеров РНК представляет собой ключевой шаг к использованию огромных преимуществ РНК в биологии и биомедицине. Терапия на основе аптамеров и наночастиц РНК все еще находится на ранней стадии, но количество РНК-препаратов, одобренных FDA, увеличивается, одновременно повышается и спрос на подобные соединения. Дрожжи *S. cerevisiae* представляют собой эукариотический модельный организм, в геноме которого 23% генов имеют гомологов среди генов человека (Jiang *et al.*, 2006), что позволяет использовать их для моделирования болезней человека (Smith and Snyder, 2006). Эксперименты по «гуманизации» дрожжей дают возможность получать аутентичные белки человека (Kachroo *et al.*, 2022). Несмотря на то, что список возможных применений аптамеров РНК дополняется с каждым годом, до сих пор отсутствуют сведения о возможном влиянии аптамеров РНК на организм эукариот. Также отсутствуют сведения об эффективном синтезе функциональных аптамеров РНК в клетках дрожжей.

Цель и задачи исследования

Целью работы было создание платформы для синтеза аптамеров РНК *in vivo* с использованием клеток дрожжей *S. cerevisiae* и изучение влияния аптамеров на биологию штамма-продуцента. Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

1. Создать систему для синтеза аптамера РНК Broccoli в *S. cerevisiae*.
2. Оценить эффективность системы и оптимизировать синтез аптамера РНК.
3. Синтезировать самособирающиеся аптамеры РНК в дрожжевых клетках.
4. Изучить влияние делеции гена *XRNI*, кодирующего экзонуклеазу, на стабильность аптамера РНК и жизнеспособность штамма-продуцента.
5. Оценить влияние синтеза аптамера на уровень транскрипции генов штамма-продуцента.

Научная новизна исследования

В данной работе была впервые продемонстрирована возможность использования *S. cerevisiae* в качестве платформы для синтеза аптамеров РНК *in vivo*. Доказательство успешного синтеза и самосборки аптамера РНК в клетках дрожжей было получено благодаря использованию флуоресцентного аптамера РНК Broccoli в качестве репортерной системы. Впервые изучено влияние молекулы РНК Broccoli на дрожжи *S. cerevisiae* путем анализа транскриптома штамма, продуцирующего аптамер.

Теоретическая и практическая значимость исследования

Результаты, полученные в работе, позволяют делать предварительные выводы о свойствах и стабильности аптамеров РНК *in vivo*, о возможном влиянии аптамеров РНК на эукариотические клетки, а также будут способствовать развитию исследований в области нанобиотехнологии нуклеиновых кислот. Разработанные подходы для получения векторов экспрессии аптамера РНК Broccoli и штаммов дрожжей – продуцентов этого аптамера могут быть в дальнейшем использованы для синтеза различных вариантов аптамеров РНК, представляющих интерес как для биологии, так и для медицины.

Личный вклад автора

Основные результаты исследования были получены автором лично. Анализ дифференциальной экспрессии генов был проведен автором совместно с научным сотрудником лаборатории биохимической генетики кафедры генетики и биотехнологии СПбГУ Румянцевым Андреем Михайловичем на базе РЦ «Развитие молекулярных и клеточных технологий» СПбГУ. Биоинформатический анализ полученных результатов был проведен автором совместно с А. М. Румянцевым и аспирантом биологического факультета Сидориным Антоном Витальевичем.

Анализ флуоресценции аптамера РНК Broccoli-DFHBI-1 в клетках дрожжей был проведен А. М. Румянцевым в Ресурсном центре СПбГУ «Обсерватория экологической безопасности».

Методология и методы исследования

Для получения результатов этого исследования был использован широкий спектр современных методов генетики, молекулярной биологии и микробиологии, в частности. полимеразная цепная реакция, подготовка нуклеиновых кислот, молекулярное клонирование, бактериальная и дрожжевая трансформация, флуориметрия. В работе проводился транскриптомный анализ с использованием методов секвенирования нового поколения.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Продемонстрирована принципиальная возможность синтеза функционального аптамера РНК Broccoli в клетках дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*.
2. Синтез флуоресцентного аптамера РНК Broccoli приводит к изменению уровня экспрессии ряда генов дрожжей *S. cerevisiae*, но не влияет на жизнеспособность штамма-продуцента.

Степень достоверности и апробация результатов исследования

Основные результаты исследования были представлены и обсуждены на трех международных конференциях и опубликованы в четырех статьях в рецензируемых научных изданиях:

1. Muzaev D.M., Rumyantsev A.M., Al Shanaa O.R., Sambuk E.V. Selective system based on fragments of the M1 virus for the yeast *Saccharomyces cerevisiae* transformation // Ecological genetics. 2020. - Vol. 18, no. 2. P. 251-263

2. **Shanaa O.A.**, Rumyantsev A., Sambuk E., Padkina M. In Vivo Production of RNA Aptamers and Nanoparticles: Problems and Prospects // *Molecules*. 2021. Vol 26, no. 5. P. 1422 (1-19)
3. Rumyantsev A., Sidorin A., Volkov A., **Al Shanaa O.**, Sambuk E., Padkina M. Transcriptome Analysis Unveils the Effects of Proline on Gene Expression in the Yeast *Komagataella phaffii* // *Microorganisms*. 2022. Vol. 10, no. P. 67 (1-16)
4. **Шанаа У.А.**, Румянцев А.М., Самбук Е.В., Падкина М.В. Синтез флуоресцентного РНК-аптамера Broccoli в клетках дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*// *Экологическая генетика*. 2022. Том 20 (4), стр. 339-348.

Финансовая поддержка работы. Основная часть работы выполнена в рамках гранта РФФИ (аспиранты) № 20–34–90139\20 «Разработка подходов к применению дрожжей в качестве объекта для синтеза и изучения свойств РНК-наночастиц».

Объем и структура диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов исследования, обсуждения, выводов, списка литературы, содержащего 247 ссылки на первоисточники, и приложения. Работа изложена на 113 страницах, содержит 21 рисунок и 3 таблицы. Приложение к работе содержит 1 таблицу

1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Аптамеры ДНК и РНК

Термин «аптамер» представляет собой гибридное слово греческого и латинского происхождения (*aptus* означает подходящий на латыни, а *meros* означает вещь или часть на греческом языке), означающий в буквальном переводе «подходящие части». Аптамеры действительно представляют собой искусственные олигонуклеотиды, способные связываться с целевыми химическими веществами, начиная от ионов и заканчивая специфическими поверхностными белками клетки

В 1990 году две независимые группы молекулярных биологов из США сообщили о самых первых этапах изучения и разработки аптамеров. Первая группа из Колорадском университета в Боулдере впервые описала основной метод получения аптамеров, сокращенно SELEX (систематическая эволюция лигандов путем экспоненциального обогащения). Этот метод основан на создании большого количества случайных олигонуклеотидов, которые подвергаются нескольким раундам обогащения, включающими связывание с определенной мишенью, удаление несвязавшихся нуклеотидов, модификации. Это обеспечивает отбор, только олигонуклеотидов с наивысшей аффинностью к целевому химическому веществу для дальнейшего клонирования и анализа (Tuerk, Gold, 1990).

Вторая группа исследователей из отдела Молекулярной биологии Массачусетского госпиталя в Бостоне ввела термин «аптамер» после использования метода SELEX при отборе олигонуклеотидов, взаимодействующих с рядом исходных органических красителей. Они нашли, что только один из 10^{10} РНК-аптамеров

способен связываться с определенной органической молекулой (Ellington, Szostak, 1990).

На момент написания диссертации существует около 775 вариантов аптамеров с их мишенями в базе данных аптамеров Aptagen (<https://www.aptagen.com/apta-index/>), из которых 448 представляют аптамеры ДНК и 177 - аптамеры РНК, остальные являются пептидными, химерными аптамерами. Следует принимать во внимание, что в банке данных белков (<https://www.rcsb.org/>) содержится 259 записей об аптамерах РНК, 119 записей об аптамерах ДНК с доступными рентгеновскими, ЯМР или электронно-микроскопическими изображениями.

Аптамеры представляют собой одноцепочечные олигонуклеотиды РНК или ДНК, которые обладают характерной пространственной структурой, вследствие чего способны узнавать и с высокой специфичностью связывать различные мишени (рисунок 1).

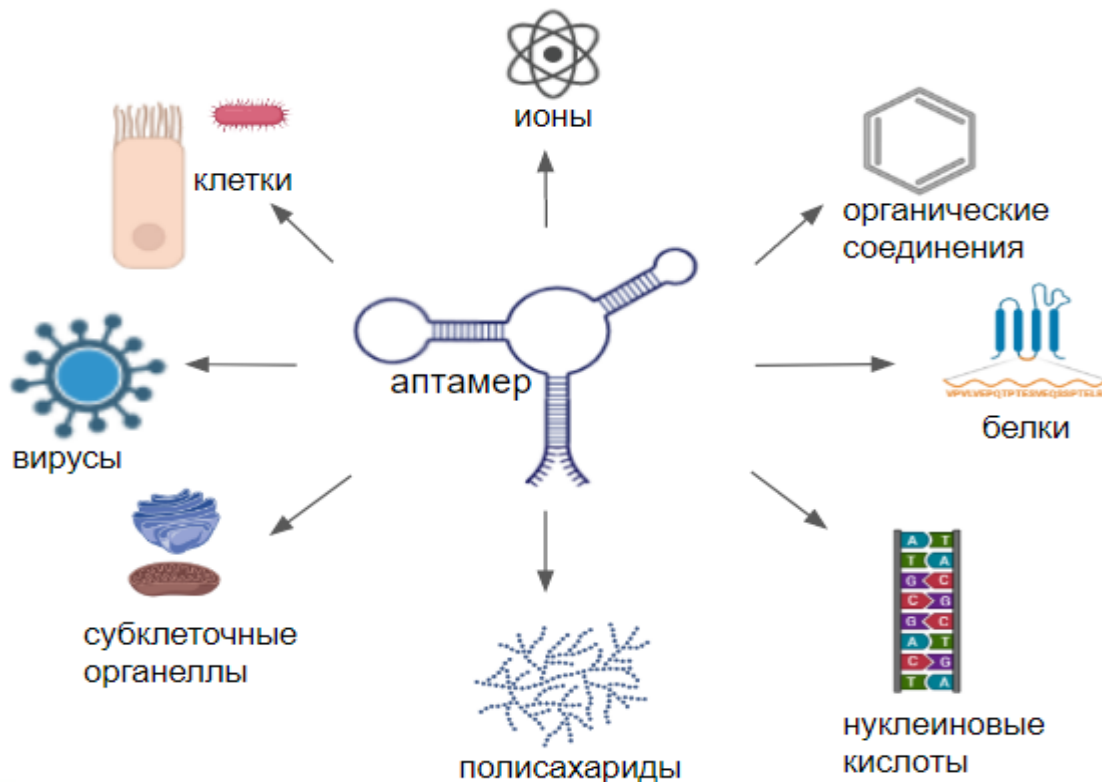


Рисунок 1. Возможные мишени аптамеров

Аптамеры могут связываться с различными химическими веществами-мишенями, включая ионы (Qu *et al.*, 2016), органические соединения (Ruscito, DeRosa, 2016; Miyagawa *et al.*, 2020), белки (Wang *et al.*, 2020), нуклеиновые кислоты (Park *et al.*, 2016; Xie *et al.*, 2020), полисахариды (Low *et al.*, 2009), субклеточные органеллы (Xie *et al.*, 2020), вирусы, прокариотические и эукариотические клетки (Rahimizadeh *et al.*, 2017; Kolm *et al.*, 2020).

1.1.1 Совершенствование методов отбора и синтеза аптамеров РНК

В классическом варианте SELEX используется библиотека случайных последовательностей одноцепочечных ДНК или РНК, в которой уникальные последовательности олигонуклеотидов фланкированы одинаковыми 3' и 5' последовательностями. В ходе повторяющихся циклов, которые включают 3 стадии: а) связывание олигонуклеотидов библиотеки с определенной мишенью, б) удаление несвязавшихся олигонуклеотидов, в) амплификацию связавшихся олигонуклеотидов при помощи ПЦР с использованием общих 3' и 5' последовательностей. Происходит обогащение библиотеки олигонуклеотидами, имеющими сродство к молекуле – мишени. После завершения обогащения библиотеки определяют нуклеотидные последовательности отобранных олигонуклеотидов и синтезируют их в количествах, необходимых для проведения функциональных тестов (Tuerk, Gold, 1990). SELEX считается основным методом создания аптамеров, но этот метод был значительно улучшен с тех пор, как он был впервые представлен в начале 1990-х годов, чтобы сократить время отбора и увеличить вероятность взаимодействия аптамер-мишень, (Aquino-Jarquín, Toscano-Garibay, 2011; Zhuo *et al.*, 2017; Buglak *et al.*, 2020; Lee *et al.*, 2023). В последние годы появилось много модификаций технологии SELEX, которые используют достижения в области секвенирования, хроматографии, электрофореза, клонирования и биоинформатики. Это существенно повысило эффективность

технологии и ускорило процесс получения нужных аптамеров. Разработанные методы автоматического отбора аптамеров позволяют одновременно получать аптамеры к большому числу различных мишеней (Eulberg et al., 2005). В таблице 1 приведены некоторые ключевые модификации и улучшения метода SELEX для разработки аптамеров РНК.

Таблица 1. Модификации метода SELEX для наработки аптамеров РНК

Вариант метода	Преимущество	Приложение
Отрицательный SELEX (Ellington, Szostak, 1992)	Уменьшение неспецифических взаимодействий с неподвижными мишенями	Биосенсоры для органических красителей
Counter SELEX (Jenison et al., 1994)	Получение аптамеров с ко-аффинностью к сходным мишеням	Бронходилататор теофиллиновый биосенсор
Смешанный SELEX (Smith et al., 1995)	Обогащение комбинаторного пула для получения лекарств	Ингибитор нейтрофильной эластазы (valP)
Фото-SELEX (Jensen et al., 1995)	Обеспечение ковалентной поперечной связи за счет использования светочувствительных нуклеотидов	Ковалентное присоединение белка Rev вируса иммунодефицита человека типа 1
<i>In vivo</i> SELEX (Coulter et al., 1997)	Отбор аптамеров, нацеленных на органические и биомолекулы в живых организмах	Открытие сайтов энхансеров сплайсинга
Химерный SELEX (Burke, Willis, 1998)	Объединение двух аптамеров для облегчения сборки бифункциональных молекул и реакций двух соседних молекул	Улучшение понимания функций РНК и гипотезы мира РНК
Клеточный SELEX (Homann, Göringer, 1999)	Распознаванию целых живых клеток с несколькими мишенями	РНК-лиганды живых африканских трипаносом

Непрямой SELEX (Kawakami <i>et al.</i> , 2000)	Модуляция функции аптамера <i>in vivo</i> посредством индукции	Аптамеры для связывания с белками-мишенями после индукции двухвалентными ионами, такими как Zn^{2+}
Toggle SELEX (Bianchini <i>et al.</i> , 2001; White <i>et al.</i> , 2001)	Получение аптамеров, способных связываться с интактными и денатурированными белками, а также аптамеров с перекрестной реактивностью между видами	Разработка диагностических наборов и доклинических исследований кандидатов лекарств
SELEX с капиллярным электрофорезом (Mendonsa, Bowser, 2004)	Уменьшение времени отбора и количества раундов после образования, диссоциации и разделения комплекса аптамер-мишень	Аптамеры с высокой специфичностью к IgE человека по сравнению с IgG человека или мышинным IgE.
FluMag SELEX (Stoltenburg <i>et al.</i> , 2005)	Получение флуоресцентных аптамеров и использование магнитных шариков для иммобилизации мишени облегчает разделение связанных и несвязанных аптамеров	Стрептавидин-специфические аптамеры, используемые для связывания магнитных шариков с биотинилированными молекулами
Атомно-силовая микроскопия + SELEX (Peng <i>et al.</i> , 2007)	Идентификация комплексов аптамер-мишень с помощью флуоресцентных сигналов в одном цикле селекции из ограниченного набора случайных олигонуклеотидов	Аптамер тромбина был успешно обнаружен, визуализирован, выделен и затем охарактеризован с помощью ПЦР-амплификации и секвенирования
Микрофлюидика + SELEX (Huang <i>et al.</i> , 2010)	Использование микрокапилляров и жидкостных чипов для проверки действия различных реагентов на активность аптамера	Аптамеры против С-реактивного белка
Предсказания вторичной	Использование серверов Vfold2d и RNAfold с анализом свободной	Дизайн теофиллинового аптамера (Chushak, Stone, 2009)

структуры аптамера <i>in silico</i> (Zuker, 2003; Xu <i>et al.</i> , 2014)	энергии и конфигурации последовательности аптамеров	
Предсказания третичной структуры аптамера <i>in silico</i>	Использование серверов Vfold3D и 3dRNA для предсказания третичной структуры аптамера на основании особенностей вторичных структур (Wang <i>et al.</i> , 2019)	Аптамеры против белка поверхностного рецептора <i>Streptococcus agalactiae</i> (идентификатор PDB: 2XTL)
Предсказание структуры гуанинового квадруплекса (G4) <i>in silico</i>	Использование технологии машинного обучения для предсказания водородных связей Хугстена, образованных между нуклеиновой кислотой и целевыми белками, например, посредством pqsfinder (Hon <i>et al.</i> , 2017; Puig Lombardi, Londoño-Vallejo, 2019)	Аптамеры G4 с высокой устойчивостью к сывороточным нуклеазам используются в качестве противоопухолевых и антикоагулянтных препаратов (Roxo <i>et al.</i> , 2019)
Молекулярный докинг <i>in silico</i>	Используется за этапами прогнозирования структуры для предсказания наилучшего сайта связывания аптамера и мишени и выбора самой низкой энергии связывания, например, DOCK и rDock (Escamilla-Gutiérrez <i>et al.</i> , 2021).	Аптамер цитохрома p450 был разработан с использованием DOCK (Shcherbinin <i>et al.</i> , 2015)
Моделирование молекулярной динамики <i>in silico</i>	Применяется для оценки стабильности комплекса аптамер-мишень и расчета энергии связи между атомами, участвующими в комплексе как AMBER и GROMACS, (Buglak <i>et al.</i> , 2020)	Изучение РНК-аптамера флавина (Ruan <i>et al.</i> , 2017)
Виртуальный скрининг	Инструменты искусственного интеллекта и машинного обучения, используемые для анализа большого объема данных	РНК-аптамеры против протеазы вируса SARS-CoV-2 протеаза (Morena <i>et al.</i> , 2021)

	о взаимодействии аптамер-мишень, позволяют экономить время и затраты труда при получении новых аптамеров (Zhuo <i>et al.</i> , 2020; Iwano <i>et al.</i> , 2022; Kallert <i>et al.</i> , 2022).	
--	---	--

1.1.2 Аптамеры в фундаментальных и прикладных исследованиях

Аптамеры с репортерной группой позволяют идентифицировать и локализовать различные молекулы в клетке, оценить их участие в тех или иных биологических процессах (Dougherty *et al.*, 2015; Goldsworthy *et al.*, 2018).

С помощью аптамеров можно определять специфичные последовательности белков, отвечающие за взаимодействия с нуклеиновыми кислотами, и выделять такие белки (Cox *et al.*, 2002; Lönne *et al.*, 2015; Qiao *et al.*, 2015; Moccia *et al.*, 2019). Аптамеры могут регулировать транскрипцию, выступая в качестве конкурентных ингибиторов факторов транскрипции (Wurster *et al.*, 2009).

Аптамеры, способные распознавать патогенные микроорганизмы, могут быть использованы в качестве сенсоров для их выявления (Nagarkatti *et al.*, 2012; Paniel, Nogue, 2019).

ДНК аптамер, связывающий и ингибирующий тромбин, может быть использован для создания лекарственного антикоагулирующего препарата (Zavyalova *et al.*, 2017). В 2004 г. был представлен первый одобренный FDA препарат РНК-аптамера для лечения неоваскулярной возрастной дегенерации желтого пятна под названием Pegaptanib или Macugen. Аптамер обладает антиангиогенетическим действием, подавляя образование избыточных кровеносных сосудов за счет связывания с фактором роста эндотелия сосудов. Ряд терапевтических, диагностических, профилактических и сенсорных средств на основе РНК исследуется

в связи с достижениями в производстве, модификации и доставке (Su, Hammond, 2020; Kowalzik *et al.*, 2021; Zhang, Zhang, 2022).

Аптамеры с репортерной группой могут применяться для диагностики заболеваний, локализации опухолей и белков-мишеней, связанных с теми или иными патологиями (Zhou *et al.*, 2014; Dougherty *et al.*, 2015; Hassanzadeh *et al.*, 2018). Традиционно для этих целей используют антитела. Благодаря трехмерной структуре и специфичности связывания с определенными мишенями аптамеры можно рассматривать в качестве многообещающих заменителей антител. Аптамеры, которые часто называют «химическими антителами», лишены недостатков классических антител (Chen, Yang, 2015).

Наиболее известный метод получения антител основан на иммунизации животных анализируемым веществом. Далеко не все соединения являются иммуногенными, и получение подходящих антител требует использования дорогостоящих и трудоемких методов (Hoogenboom, 2005; Rajesh *et al.*, 2013). Для аптамеров не существует подобной проблемы, специфичные аптамеры могут быть получены для разных классов анализируемых субстанций от ионов и небольших молекул (Baker *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2018) до макромолекул и микроорганизмов (Zou *et al.*, 2019; Tyagi *et al.*, 2020). В то же время аптамеры обладают значительно большей стабильностью, чем антитела, и даже после денатурации способны восстанавливать исходную трехмерную структуру (Thiviyanathan, Gorenstein, 2012).

1.1.3 Функциональное и структурное разнообразие РНК как основа для получения аптамеров

Молекулы РНК всегда привлекали большое внимание исследователей в связи с разнообразием выполняемых функций, перечень которых постоянно расширяется (Breaker, Joyce, 2014). Кроме матричной РНК (мРНК), обеспечивающей передачу генетической информации, закодированной в геноме, к аппарату трансляции,

существует большое количество некодирующих РНК, участвующих в осуществлении и регуляции самых разных клеточных процессов, включая транскрипцию, созревание различных типов РНК, трансляцию. Высокоструктурированные транспортная РНК (тРНК) и рибосомные РНК (рРНК) принимают участие в трансляции, тРНК служит адаптерной молекулой (Hoagland, 1996), рРНК являются структурной и каталитической основой рибосом (Nissen *et al.*, 2020).

Ферментативной активностью обладают природные и синтетические рибозимы (Pace *et al.*, 1987; Zaug, Cech, 1987; Bartel, Szostak, 1993; Felletti, Hartig, 2017; Nissen *et al.*, 2020). Бактериальные малые РНК (Григоров и др., 2017); микроРНК (miРНК) (Pasquinelli, 2012); и малые интерферирующие РНК (siРНК) (Sejka *et al.*, 2006) эукариот принимают участие в регуляции экспрессии генов и трансляции. Малые ядерные РНК (мяРНК) участвуют в сплайсинге эукариотических матричных РНК (Stanek *et al.*, 2008). Малые ядрышковые РНК обеспечивают химические модификации (метилирование и псевдоуридилирование) и созревание эукариотической рРНК (Jady, 2001). Аптамеры РНК избирательно связываются с различными мишенями, оказывая влияние на их функционирование (Jady, 2001; Bouchard *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2018). Аптазимы сочетают способность к связыванию определенного лиганда с ферментативной активностью (Felletti, Hartig, 2017). Рибопереключателы - молекулы РНК - в ответ на определенные стимулы изменяют свою конформацию и регулируют экспрессию генов (McCown *et al.*, 2017).

Функциональное разнообразие РНК позволяет говорить об огромном потенциале этих молекул для разработки новых лекарственных препаратов. В первую очередь речь должна идти об аптамерах, микроРНК и малых интерферирующих РНК. МикроРНК и малые интерферирующие РНК способны регулировать и подавлять синтез белков, могут быть использованы в терапии злокачественных опухолей (Filleur *et al.*, 2003; Rupaimoole, Slack, 2017). Комбинация miРНК и siРНК с аптамерами может обеспечить доставку целевой молекулы к определенной мишени (Zhou, Rossi, 2017; Dinis Anjo Bom *et al.*, 2019).

Очевидной проблемой практического использования РНК является короткий период полужизни вследствие расщепления нуклеазами сыворотки крови. Время существования олигонуклеотида в крови не превышает нескольких десятков минут, что явно недостаточно для выполнения молекулами РНК требуемых функций и ограничивает их применение в медицинских целях. Для предотвращения гидролиза РНК нуклеазами используют различные варианты химической модификации нуклеотидов, что позволяет получать молекулы с улучшенными фармакокинетическими и фармакодинамическими свойствами, или заключают РНК в наночастицы (Whitehead *et al.*, 2009; Gavrillov, Saltzman, 2012; Dinis Ano Bom *et al.*, 2019; Rajeev *et al.*, 2021).

Пространственная структура аптамера и выполняемые им функции взаимосвязаны. Структурные мотивы, встречающиеся в молекулах РНК, такие как: Y-подобные структурные элементы (3TWJ – three way junction) (Shu *et al.*, 2011), четырёхцепочечные структуры (4WJ – of four-way junction), подобные структурам Холлидея (Laing, Schlick, 2009), псевдоузлы (Grabow *et al.*, 2011) и др., позволяют получать варианты РНК заданной конформации, которая необходима для взаимодействия с конкретными мишенями и лигандами.

При синтезе аптамеров в живых клетках создание и поддержание необходимой их структуры часто обеспечивают за счёт их встраивания в высокоструктурированные каркасы РНК. Одним из хорошо известных каркасов является тРНК, в частности, лизиновая тРНК человека (Ponchon *et al.*, 2013). Включение аптамеров в антикодоновый стебель тРНК способствует их правильной укладке. Кроме того, такой подход позволил осуществить гетерологичный синтез аптамеров в клетках бактерий и получить аптамеры в количестве, достаточном для биохимических экспериментов и кристаллизации (Ponchon *et al.*, 2013). Возможно использование и других каркасов, например 3WJ мотива «пакующей» РНК бактериофага phi29 (Guo *et al.*, 2018). Также в качестве каркаса для аптамеров использовали 5S рРНК *Vibrio proteolyticus* (V5), в которой аптамер замещал фрагмент «спираль III - петля C». С помощью V5 был

получен функциональный аптамер, взаимодействующий с фактором роста эндотелия сосудов - VEGF (Zhang *et al.*, 2009).

1.1.4 Флуорогенные аптамеры РНК

Многообразие функций РНК в клетке стимулировало развитие методов обнаружения и изучения динамики РНК *in vivo* (Armitage, 2011).

Одним из наиболее популярных методов мечения РНК долгие годы являлся метод MS2-MCP, который основан на высокоаффинном связывании белка оболочки бактериофага MS2 (MCP) с уникальной последовательностью шпильки РНК - MS2-связывающим сайтом (MBS). Клонирование последовательности MBS в выбранной РНК и одновременный синтез MCP, слитого с флуоресцентным белком GFP (green fluorescent protein), позволяет определять локализацию конкретной молекулы РНК в клетке (Tuagi, 2009; Hocine *et al.*, 2013).

Однако фоновая флуоресценция от несвязанного MCP-GFP сильно влияет на отношение сигнал / шум. Кроме того, было обнаружено, что белки оболочки бактериофага MS2, связанные с MBS сайтом в 3'UTR мРНК дрожжей, блокируют активность экзонуклеазы Xrnp1 и 5'-3'-деградацию мРНК. Это приводит к накоплению 3' фрагментов мРНК, которые по-прежнему связываются с MCP-GFP, что затрудняет определение локализации полноразмерной мРНК *in vivo* (Garcia, Parker, 2015).

Альтернативным способом визуализации РНК является использование флуорогенных аптамеров РНК (Dolgosheina, Unrau, 2016; Bouhedda *et al.*, 2017). Поскольку у РНК отсутствует собственная флуоресценция, необходимо наличие экзогенного хромофора, флуоресценция которого индуцируется при взаимодействии с аптамером РНК. Флуорогенные аптамеры РНК представляют собой мощный инструмент для изучения РНК, аналогичной GFP для изучения белков. Встраивание флуорогенного РНК-аптамера в молекулу РНК-мишени дает возможность наблюдать за функционированием РНК в клетке (Truong, Ferré-D'Amaré, 2019).

Наиболее известными флуорогенными аптамерами РНК являются аптамеры Mango и Spinach (Shanaa O.A. *et al.*, 2021). Сочетание технологии SELEX и метода FACS позволило получить новый вариант аптамера Spinach. Этот аптамер длиной 112 нуклеотидов, названный Broccoli, активирует флуоресценцию красителя DFHBI или DFHBI-1T, более стабилен, быстрее складывается и не требует для этого каркаса тРНК *in vitro* (рисунок 2).

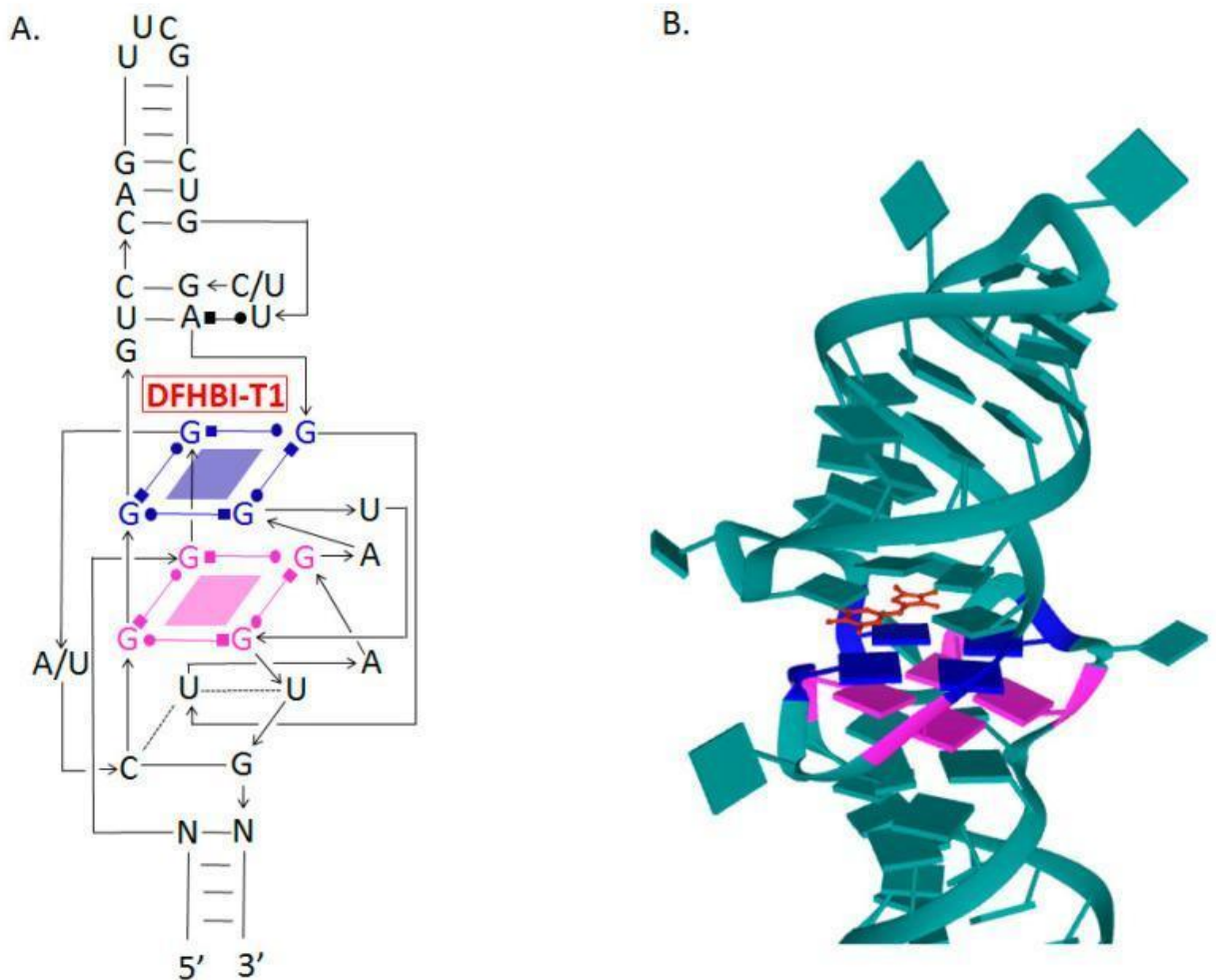


Рисунок 2. Вторичная и третичная структуры РНК-аптамеров Broccoli и Spinach. (А) Вторичная структура обоих аптамеров, показывающая две области G-квадруплекса, служащие сайтом связывания с флуорофором DFHBI-1T (Ouellet, 2016, с модификациями). (В) Третичная структура сайта связывания флуорофора в РНК-аптамере Spinach (идентификатор PDB: 6B14) (Koirala *et al.*, 2018, с модификациями).

Длины волн возбуждения и испускания этого аптамера - 472 нм и 507 нм соответственно (Filonov *et al.*, 2014; Weber, 2014). Аптамер Broccoli, имеет более высокое сродство к флуорофорам, и Broccoli-DFHBI-1T дает более яркий сигнал, чем Spinach-DFHBI (Song *et al.*, 2013). Broccoli сохраняет большую часть нуклеотидов, образующих G-квадруплексы, которые формируют DFHBI-связывающий карман в Spinach2, и, вероятно, имеет похожую структуру для взаимодействия с DFHBI-1T (Filonov *et al.*, 2014; Weber, 2014). Вторичная структура Broccoli, содержащая шпильку-стебель-петлю, позволяет получать димеры аптамера путем замены концевой петли второй молекулой аптамера, что приводит к увеличению флуоресценции на 70% (Filonov *et al.*, 2014).

Дополнительным преимуществом Broccoli, как и Spinach, является возможность их визуализации *in vitro*, флуоресценцию можно наблюдать в микроцентрифужных пробирках (Paige *et al.*, 2011) или с помощью электрофореза в полиакриламидном геле, окрашенного DFHBI (Filonov *et al.*, 2015).

Аптамеры Spinach и Broccoli, слитые с каркасом тРНК, были успешно экспрессированы в клетках бактерий и млекопитающих. Способность аптамера Broccoli сворачиваться *in vitro* без помощи каркаса тРНК была подтверждена и *in vivo*. РНК аптамера была слита с 3'-концом 5S рРНК, и полученные плазмиды были трансфицированы в клетки HEK293T. С помощью проточной цитофлуориметрии 5S РНК-Broccoli была обнаружена в клетках, и яркость клеток была выше, по сравнению с клетками, содержащими 5S РНК-тРНК-аптамер. Это подтверждает идею о том, что каркас тРНК часто подвергается расщеплению нуклеазами клетки и, тем самым, оказывает негативное влияние на экспрессию аптамеров РНК.

Экспрессия аптамеров Broccoli-DFHBI-1T и Spinach-DFHBI в составе 16S рибосомной РНК позволила наблюдать рибосомы и предоставила уникальную возможность для изучения трансляции у прокариот (Okuda *et al.*, 2017).

Broccoli-DFHBI-1T и Spinach-DFHBI были встроены в 5'- шпильку одной из Н/СА малых ядрышковых РНК дрожжей (snoR30), которая принимает участие в

созревании рРНК. Плазмидами, содержащими эти конструкции под контролем GAL-промотора, трансформировали дрожжи. Рост трансформантов не отличался от роста исходных штаммов, аптамеры не нарушали локализацию и функцию snoR30 и обеспечивали флуоресценцию в ядрышках (Zinskie *et al.*, 2018).

Аптамеры Spinach2-тРНК и Broccoli-F30 использовали для изучения регуляции синтеза РНК SINV вируса, который может вызывать сезонные вспышки сыпи и артрита у людей и энцефаломиелита у экспериментально инфицированных мышей. Для этого аптамеры встраивали в 3'UTR вирусной РНК. Полученные рекомбинантные вирусы хорошо реплицировались в нервных клетках и клеточной культуре фибробластов. Уровень флуоресценции коррелировал с количеством копий Broccoli-F30 (Nilaratanakul *et al.*, 2020).

На основе аптамера Broccoli был разработан флуорометрический субстрат РНК, флуоресценция которого была пропорциональна активности ферментов, модифицирующих РНК. Для этого синтезировали вариант аптамера с модифицированными нуклеотидами, такими как N6-метиладенозин (m6A). Такой аптамер не способен нормально функционировать, для восстановления его функции необходима работа специальных деметилаз. Этот подход позволяет осуществлять не только поиск ферментов, модифицирующих РНК, но также их ингибиторов и факторов, влияющих на уровни метилирования РНК в живых клетках (Svensen, Jaffrey, 2016).

Несмотря на совершенствование методов отбора нужных аптамеров проблема получения необходимых количеств аптамеров для широкого использования остается. Как уже говорилось, в настоящее время аптамеры РНК получают или химическим синтезом, или транскрипцией *in vitro* с использованием ДНК-матрицы. Оба метода являются дорогостоящими и трудоемкими. Решением проблемы может быть гетерологичный синтез аптамеров. Наиболее подходящим организмом-продуцентом являются дрожжи *S. cerevisiae*.

1.2 Дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* в фундаментальных и прикладных исследованиях

Дрожжи *S. cerevisiae* представляют эукариотический одноклеточный неподвижный микробный организм, принадлежащий к типу *Ascomycetes*. Впервые он был признан грибковым организмом в 1838 году после того, как был выделен в процессе брожения пива, поэтому его называли «сахарным пивным грибом» (Pontes *et al.*, 2020). Впоследствии этот организм был выделен из разных мест обитания, что указывает на различную метаболическую толерантность. Микроорганизм был выделен из растений, фруктов, насекомых, почвы, соленой воды, кожи и желудочно-кишечного тракта теплокровных организмов (Goddard, Greig, 2015). Также обнаружены некоторые условно-патогенные штаммы, вызывающие инфекции у людей с ослабленным иммунитетом (Pérez-Torrado, Querol, 2015; Fadhel *et al.*, 2019). Как правило, непатогенные лабораторные штаммы *S. cerevisiae* безопасны и требуют только уровня биобезопасности 1.

Первое подробное описание механизма регуляции экспрессии генов было сделано на примере лактозного оперона бактерий *Escherichia coli*. Это открытие, важное для понимания центральной догмы молекулярной биологии, было вскоре подтверждено и на примере других живых объектов. Исследование механизмов регуляции генов *GAL* и действия факторов транскрипции (в частности Gal4) продемонстрировало наличие регулируемой экспрессии генов у эукариотических организмов. (Hahn, Young, 2011).

Подобно оперону *Lac* у *E. coli*, дрожжи *S. cerevisiae* имеют гены *GAL*. Эта особенность позволяет дрожжам использовать галактозу в качестве неферментируемого источника углерода в отсутствие глюкозы. Белок Gal4 представляет собой фактор транскрипции, который взаимодействует с определенной последовательностью в промоторах генов *GAL* в присутствии галактозы в питательной среде. Таким образом обеспечивается регуляция экспрессии ряда

структурных и регуляторных генов, которые обеспечивают внутриклеточный транспорт и метаболизм галактозы (Lohr *et al.*, 1995; Traven *et al.*, 2006). На сегодняшний день исследователи активно используют промоторные области генов *GAL* для обеспечения экспрессии генов интереса, регулируемой в ответ на добавление галактозы в среду для культивирования.

Развитые механизмы гомологической рекомбинации — еще одно природное свойство дрожжей, которое успешно используется в генетических исследованиях и биотехнологии. Этот биологический процесс существует у дрожжей для восстановления повреждения двухцепочечной ДНК, вызванного ионизирующим излучением или окислительным стрессом. Гомологическая рекомбинация происходит во время мейоза, что способствует генетической изменчивости. Также у дрожжей она лежит в основе механизма переключения типов спаривания (Eckert-Boulet *et al.*, 2011; Jagadeesan *et al.*, 2022). Различные методы и подходы, используемые для внесения мутаций или делеций в геном дрожжей, а также для интеграции экспрессионных кассет основаны на прохождении рекомбинации между геномной ДНК и доставляемыми в клетку генетическими конструкциями.

В целом, дрожжи *S. cerevisiae* оказались чрезвычайно полезными для понимания ключевых биологических процессов, работа над которыми была отмечена высшими научными наградами и проложила путь к новым направлениям исследований. Кроме того, дрожжи активно используются в практических областях биологии - промышленной биотехнологии и фармацевтике.

1.2.1 Дрожжи *S. cerevisiae* как модельный организм для изучения механизмов и регуляции основных биологических процессов у эукариот

Геном дрожжей демонстрирует высокую степень сходства в сравнении с геномом человека - 47% основных генов дрожжей имеют ортологи у человека. Вместе с этим работа с дрожжами помогает обойти различные этические или

экспериментальные ограничения, которые возникают при работе с высшими эукариотами. Это позволило успешно использовать *S. cerevisiae* в качестве модельного организма для изучения широкого спектра биологических процессов. (Karathia *et al.*, 2011; Nielsen, 2019).

За последние 20 лет пять Нобелевских премий были присуждены исследователям, работающим с дрожжами в таких областях, как изучение процессов аутофагии, действия ключевых регуляторов клеточного цикла, транскрипции, защиты хромосом теломерами и теломеразой, внутриклеточного транспорта. На основе дрожжей изучали механизмы развития различных болезней человека, таких как онкологические и нейродегенеративные заболевания, наследственные и метаболические нарушения и другие (Bolotin-Fukuhara *et al.*, 2010). Это ещё одна демонстрация значимости дрожжей как модельного объекта, используемого в биологии, генетике и медицине.

Возможность проведения генетического анализа у дрожжей облегчает тот факт, что геном этого организма был секвенирован в 1996 году первым из геномов эукариот. Проект секвенирования *S. cerevisiae* проходил в 19 странах, 94 лабораториях. Было обнаружено, что геном *S. cerevisiae* содержит около 12 миллионов пар оснований, в 16 хромосомах, содержащих около 6 тысяч генов (Goffeau *et al.*, 1996). Помимо сведений о геноме для *S. cerevisiae* доступно множество баз данных, содержащих сведения об экспрессии генов и регуляторных сетях, сетях взаимодействия белков, сетях взаимодействия генов, транскриптоме, протеоме, метаболоме и других (Botstein, Fink, 2011).

Ранние исследования генетики дрожжей были сосредоточены на изучении метаболических процессов и их генетического контроля. Это привело не только к пониманию путей синтеза различных аминокислот, азотистых оснований и других соединений в дрожжевых клетках, но и позволило использовать гены ряда ферментов в качестве удобных селективных маркеров. Действительно маркеры ауксотрофности зарекомендовали себя как полезный инструмент генетического анализа. Наиболее

распространенные ауксотрофные маркерные гены включают *URA3*, *HIS3*, *LEU2*, *TRP1*, которые кодируют ферменты, необходимые для синтеза урацила, L-гистидина, L-лейцина, L-триптофана соответственно (Pronk, 2002; Barnett, 2007).

Другой особенный инструмент генетики дрожжей основывался на том факте, что каждую из четырех аскоспор, образующихся в результате мейоза при делении диплоидной клетки дрожжей, можно отделить от других и вырастить из нее колонию. Этот метод называется тетрадным анализом (Winge, Laustsen, 1937). Данный метод позволял определять наличия сцепления исследуемых селективных маркеров и строить генетические карты. Применению генетического анализа при работе с дрожжами *S. cerevisiae* также способствует тот факт, что большинство штаммов лабораторных дрожжей являются гетероталличными, из-за наличия мутации эндонуклеазы НО. Это позволяет исследователям сохранять и поддерживать стабильные гаплоидные штаммы.

Возможности использования дрожжей в качестве модельного объекта значительно расширились с наступлением геномной эры. На сегодняшний день для *S. cerevisiae* доступны базы данных, содержащие сведения о роли генов, их взаимодействиях, уровнях экспрессии в различных условиях, функциях кодируемых белков. Примером служит база данных генома сахаромицетов SGD (<https://www.yeastgenome.org>), которая является одной из самых известных баз данных для сбора всевозможной информации о клеточных процессах у дрожжей, представленной учеными всего мира.

1.2.2 Дрожжи *S. cerevisiae* - продуценты белков и других биологически активных соединений

Спектр применений биофармацевтических препаратов постоянно расширяется. Природные источники используемых соединений часто ограничены и требуются

новые подходы, обеспечивающие их крупномасштабное производство для удовлетворения клинических потребностей.

Развитие инструментов генной инженерии и секвенирование геномов живых организмов сделали возможным использование организмов продуцентов для синтеза рекомбинантных белков и других компонентов фармацевтических препаратов. Одним из первых примеров является инсулин, синтезированный с помощью бактерий *E. coli*. Он был одобрен американским управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (FDA) и выпущен на рынок в 1982 г. Вторым после инсулина в 1985 г. в бактериях *E. coli* начали промышленно синтезировать гормон роста (GH) (Wang *et al.*, 2017). В настоящее время, помимо гонадотропных гормонов, которые продуцируются только в клетках млекопитающих с учетом их специфического гликозилирования (Orvieto, Seifer, 2016), большинство других коммерчески выпускаемых гормонов синтезируются рекомбинантными *S. cerevisiae* (инсулин, глюкагон, GH) или *E. coli*. (инсулин, ГР, глюкагон, кальцитонин, терипаратид) (Walsh, 2018). За последние десятилетия постоянно расширяющаяся биофармацевтическая промышленность продемонстрировала расцвет производства вакцин, терапевтических моноклональных антител, рекомбинантных ферментов, цитокинов.

Значительное количество рекомбинантных белков синтезируется в клетках млекопитающих (преимущественно в клетках яичников китайского хомяка, CHO), что делает их производство трудоемким и дорогостоящим процессом (Walsh, 2010). С другой стороны, применение бактерий в качестве организма продуцента, которое в целом проще и дешевле, сталкивается с рядом ограничений, таких как отсутствие необходимых посттрансляционных модификаций, неправильная укладка, потенциальная иммуногенность и плохая стабильность синтезированных рекомбинантных белков. Дрожжи же представляют «золотую середину» между двумя подходами. Они сочетают в себе как преимущества одноклеточных микроорганизмов продуцентов, так и преимущества эукариотических систем экспрессии. В частности,

дрожжи, как и бактерии легко поддаются генетическим манипуляциям и экономически эффективны. Но при этом дрожжи в отличие от *E. coli* обладают активным механизмом посттрансляционной модификации, и не содержат эндотоксинов (Demain, Vaishnav, 2009; Martínez *et al.*, 2012). Одним из недостатков штаммов дрожжей – продуцентов целевых белков, является наличие в составе экспрессионных плазмид генов устойчивости к антибиотикам, что может приводить к появлению устойчивых к антибиотикам природных микроорганизмов (Землянко и др., 2018). Перспективным направлением является использование в качестве селективного маркера киллер-токсина (микотоксина) дрожжей (Muzaev *et al.*, 2020).

Гликозилирование белков у дрожжей отличается от N- и O-гликозилирования белков человека. Однако, существуют подходы по обеспечению синтеза в дрожжах белков с гликозилированием, аналогичным модификации белков млекопитающих. Например, для дрожжей *Pichia pastoris* разработана соответствующая система GlycoSwitch. Дрожжи обладают эффективными системами укладки и секреции синтезируемых белков (Martínez *et al.*, 2012; Laukens *et al.*, 2015; Huang *et al.*, 2018). В результате, на сегодняшний день *S. cerevisiae* и другие виды дрожжей (в частности *P. pastoris*, *Yarrowia lipolytica*, *Hansenula polymorpha*) активно используются для синтеза самых разнообразных рекомбинантных белков.

Одновременно с успешным применением дрожжей для синтеза белков, развивается их использование для производства препаратов небелковой природы. Этому способствует наличие подробных знаний о метаболических процессах, полученных при изучении *S. cerevisiae* в качестве модельного объекта. В частности, с помощью *S. cerevisiae* осуществляется промышленное производство прогестерона (Duport *et al.*, 1998), гидрокортизона (Szczebara *et al.*, 2003) и артемизиновой кислоты (предшественник противомалярийного артемизинина) (Paddon *et al.*, 2013).

Отдельно следует отметить наличие современных исследований, направленных на использование дрожжей *S. cerevisiae* для производства и доставки коротких молекул РНК.

1.2.3 Перспективы использования дрожжей *S. cerevisiae* для продукции и доставки аптамеров РНК

Среди возможных эукариотических организмов – продуцентов аптамеров и наночастиц – наибольший интерес представляют дрожжи *S. cerevisiae*. Это обусловлено не только сочетанием простоты культивирования с возможностью проведения сложных генетических манипуляций, а также консервативностью многих ключевых процессов в клетках дрожжей и млекопитающих. Одной из интересных особенностей дрожжей *S. cerevisiae* является отсутствие собственной системы РНК-интерференции, которая была утрачена ими в процессе эволюции. Это обстоятельство делает возможным стабильное поддержание в их клетках эндогенных РНК, что было продемонстрировано на примере двухцепочечных РНК вирусов рода Totivirus (L-А вирусы) и однонитевых РНК вирусов рода Narnavirus семейства Narnaviridae (Wickner *et al.*, 2013). Дрожжи также рассматриваются как перспективная система для синтеза и доставки малых интерферирующих РНК (Duman-Scheel, 2019). Существенным преимуществом использования эукариотических организмов для производства аптамеров и наночастиц РНК по сравнению с бактериями также является отсутствие у эукариот эндотоксинов, что упрощает процедуру очистки интересующих соединений и подготовки их для использования в медицине (Terpe, 2006).

Для синтеза аптамеров РНК или РНК наночастиц могут быть использованы штаммы дрожжей с интегрированным в геном структурным геном РНК-полимеразы фага T7 (Dower, Rosbash, 2002; Hobl *et al.*, 2013; Duman-Scheel, 2019). Трансформация таких штаммов плазмидами, содержащими необходимую нуклеотидную последовательность под контролем промотора T7, обеспечит синтез интересующей РНК.

В дополнение к вышеупомянутым важным аспектам настоящей работы, эксперименты, включающие работу с дрожжами *S. cerevisiae* и РНК-аптамером,

обеспечивают хорошую образовательную платформу для обучения студентов различным аспектам современной молекулярной генетики и биотехнологии. Безопасные дрожжи можно использовать для обучения синтетической биологии, клеточной биологии и «омикс» технологиям (Macreadie, Dhakal, 2022). РНК-аптамер Broccoli представляет собой модель не только для освоения лабораторных методов, ориентированных на исследования нуклеиновых кислот, но и для изучения нанотехнологии РНК и наноструктур (Sajja *et al.*, 2018).

Системы доставки терапевтических препаратов на основе РНК с помощью дрожжей могут быть востребованы для вакцин и генной терапии (Ivanova, 2021). Дрожжи *S. cerevisiae* использовали для доставки shRNA и подавления экспрессии гена интерлейкина-1 β за счет РНК-интерференции, направленной на мРНК, кодирующую этот белок (Zhang *et al.*, 2021). Рекомбинантные штаммы дрожжей, способные продуцировать желаемые транскрипты sh РНК (short hairpin), заключали в микрокапсулы, которые поглощались макрофагами. Использование дрожжей в качестве системы доставки при генной терапии может обеспечить иммуномодулирующую терапию дегенерации суставов. Рекомбинантный штамм *S. cerevisiae*, синтезирующий цитомегаловирусный фосфопротеин pp65, использовался для доставки мРНК в дендритные клетки, это можно рассматривать в качестве нового типа живой вакцины (Walch *et al.*, 2011). Поглощение дрожжевых клеток не нарушало рост или функцию антигенпрезентирующих клеток (Breinig *et al.*, 2003).

Многочисленные публикации, посвященные использованию аптамеров и наночастиц РНК с соответствующими лигандами, демонстрирует положительный опыт их применения как в биологии, так и в медицине. Поэтому разработка и усовершенствование способов получения аптамеров является актуальной задачей. Достижения современной биотехнологии позволяют конструировать организмы - продуценты биологически активных соединений и различных макромолекул. Синтез аптамеров РНК *in vivo* является важным элементом нанотехнологии РНК. Работы по получению продуцентов аптамеров и наночастиц РНК продолжаются, но они по-

прежнему ограничиваются использованием бактерий *E. coli* (Li *et al.*, 2018). Получение функциональных аптамеров РНК в клетках эукариот представляется особенно важным, т.к. позволит не только получить аптамеры, но также исследовать их свойства, стабильность внутри клеток и оценить возможное влияние аптамеров на состояние самой эукариотической клетки.

2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Штаммы бактерий *Escherichia coli* и дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*

На протяжении работы для амплификации плазмид использовали бактериальный штамм *E. coli* DH5 alpha (F⁻ φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169 recA1 endA1 hsdR17(rK⁻, mK⁺) phoA supE44 λ⁻ thi-1 gyrA96 relA1) (Thermo Fisher Scientific Inc., США).

Для синтеза аптамера РНК Broccoli использовали штамм дрожжей *S. cerevisiae* D623 (*ura3 lys2 leu2 trp1*), полученный в споровом потомстве диплоида от скрещивания 1-GRF18 (*his3 leu2 pho3*) из коллекции штаммов лаборатории биохимической генетики и YM954 (*ura3 his3 ade2 lys2 leu2 trp1 gal4 gal80*) (Clontech, США)

2.2 Среды и условия культивирования

Для культивирования бактерий *E. coli* использовали жидкие и твердые среды LB (1% триптон, 0.5% дрожжевой экстракт, 171 мМ NaCl) и ТУМ (0.8% триптон, 0.5% дрожжевой экстракт, 85 мМ NaCl. Твердые среды получали добавлением 2.4% агара. Для отбора трансформантов в твердые среды добавляли антибиотики зеоцин (Invitrogen, США) – 20–1000 мкг/мл, ампициллин — 500 мкг/мл.

Для культивирования дрожжей, использовали полные среды YEPD (дрожжевой экстракт 1%, пептон 2%, D-глюкоза 2%), YEPDS (YEPD с добавлением 1 М сорбитола), и минимальную Md (1% глюкоза; 0.9 мМ CaCl₂, 37.85 мМ (NH₄)₂SO₄, 7.34 мМ KH₂PO₄, 0.95 мМ K₂HPO₄·2H₂O, 4 мМ MgSO₄·7H₂O, 1.7 мМ NaCl; витамины,

микроэлементы - 400 мкл/мл 2500х раствора). При необходимости в среду Md добавляли аминокислоты: гистидин – 5 мг/л, лейцин – 5 мг/л, триптофан – 5 мг/л и азотистое основание урацил – 5 мг/л). Твердые среды содержали 2.4% агара. Для культивирования трансформантов дрожжей использовали минимальную среду Md с добавлением необходимых аминокислот и разных источников углерода – 2% глюкозы или 2% галактозы.

Бактерии культивировали при 37°C, дрожжи - при 30°C в термостатированный качалке при 180 об/мин.

2.3 Плазмиды, использованные в работе

В исследовании использовали ряд плазмид для наработки генетических конструкций в бактериях и для экспрессии генов в дрожжах. Мы использовали коммерческие плазмиды и плазмиды, полученные в ходе работы (таблица 2)

Таблица 2. Плазмиды, использованные в работе

Название вектора	Основные характеристики плазмиды		Источник
	Промотор, терминатор, клонированная последовательность	Селективные маркеры	
pUC57x2Broccoli	x2Broccoli	<i>Amp^R</i>	Lumiprobe, Россия
pYES2	Промотор GAL, MCS, терминатор СУС1-	<i>URA3, Amp^R</i>	Thermo Fisher

			Scientific Inc., США
pYES2-PGAL-Br-TC	Промотор GAL-х2Broccoli-терминатор СУС1	<i>URA3, Amp^R</i>	Получен в ходе работы
pYES2-PSNR-Br-TS	Промотор SNR52-х2Broccoli-терминатор SUP4	<i>URA3, Amp^R</i>	Получен в ходе работы
pPICZαB	Промотор АОХ1, альфа-фактор, MCS, Мус эпитоп, 6His, терминатор АОХ1-	<i>Zeo^R</i>	Thermo Fisher Scientific Inc., США
pPICZ-5'-3'-XRN1	Промотор АОХ1, альфа-фактор, MCS, Мус эпитоп, 6His, 3'НА_5'НА XRN1, терминатор АОХ1	<i>Zeo^R</i>	Получен в ходе работы

*MCS (multiple cloning site), p – плазида, P – промотор, 6His - последовательность нуклеотидов, кодирующая 6 остатков гистидина, с-мус эпитоп - последовательность нуклеотидов, кодирующая аминокислоты, узнаваемые моноклональными антителами, НА ((homologous arms) – последовательности нуклеотидов, фланкирующие ген *XRN1*.

2.4 Трансформация бактерий

Компетентные клетки для трансформации готовили по предложенной методике (Passarinha, 2021).

Трансформацию бактерий методом теплового шока проводили по методике (Hanahan, 1983). Для отбора трансформантов клетки бактерий высевали на среду LB с антибиотиком (ампициллин/зеоцин) для отбора трансформантов.

2.5 Трансформация дрожжей

Для трансформации дрожжей с помощью метода электропорации использовали ранее описанную методику с модификациями (Muzaev *et al.*, 2020). Свежую ночную культуру в YEPD центрифугировали в 1.5 мл пробирке 2 минуты при 7000 об/мин. После этого отбирали супернатант и инкубировали клетки при комнатной температуре 30 минут в 500 мкл буфера для электропорации (100 mM LiAc, 10 mM ДТТ, 0.6 M сорбитола, 10 mM трис-HCl pH 7.5). Далее клетки центрифугировали 3 минуты в охлажденном роторе при 7000 об/мин и отбирали супернатант. Затем ресуспендировали клетки в 500 мкл 1 M охлажденного сорбитола, центрифугировали и повторяли этот этап 3 раза. Затем сливали супернатант и добавляли раствор ДНК в 80 мкл 1 M сорбитола и ресуспендировали клетки. Далее пробу переносили в стерилизованные и охлажденные кюветы и проводили электропорацию (с разницей потенциала 1600 В в течение 5 мс). После электропорации в кювету сразу добавляли 500 мкл холодного 1 M сорбитола, и инкубировали клетки 1 час при 30°C. Последний этап включал центрифугирование 2 минуты при 7000 об/мин, удаление супернатанта, ресуспендирование клеток в остатках сорбитола и выращивание клеток на чашках с селективной средой.

2.6 Молекулярно-биологические методы

2.6.1 Выделение плазмидной ДНК

Выделение плазмидной ДНК из клеток бактерий с помощью набора Plasmid Miniprep (Евроген, Россия) проводили согласно протоколу производителя.

Выделение ДНК из реакционных смесей и агарозных гелей проводили с помощью набора Cleanup Standard (Евроген, Россия).

2.6.2 Выделение хромосомной ДНК дрожжей

Для выделения хромосомной ДНК из клеток дрожжей (Guthrie, Fink, 1991) дрожжи растили в среде YEPD до $OD_{600} = 0.5$. Далее центрифугировали 1 мл инокулюма 2 мин. (7000 об/мин). После удаления супернатанта промывали клетки стерилизованной деионизованной водой. Клетки суспендировали в 500 мкл буфера (50 мМ трис-HCl pH 7.5, 20 мМ ЭДТА, 1% SDS). К смеси добавляли 0.6 г стеклянных шариков Баллотини и перемешивали ее на вортексе в течение 15 мин. при 0°C для разрушения клеток. Далее инкубировали 10 мин. при 70°C и добавляли 20 мкл 5 М CH_3COOK и 150 мкл 5 М NaCl. Затем инкубировали 20 минут при 0°C и центрифугировали клетки 20 мин (13400 об/мин). Отбирали супернатант в новую пробирку и два раза обрабатывали хлороформом. Для этого к супернатанту добавляли равный объем хлороформа, смесь перемешивали и центрифугировали 10 мин. (13400 об/мин), после чего отбирали верхнюю фазу в новую пробирку. Далее к смеси, содержащей ДНК, добавляли 3 М CH_3COONa (pH = 5.2) в объеме, равном 1/10 V раствора ДНК, и 2 суммарных объема 96% этанола. Смесь перемешивали и инкубировали 20 мин. при -70°C, затем центрифугировали в течение 15 мин. (13400 об/мин). Супернатант отбирали и два раза промывали осадок 70% этанолом. Далее высушивали ДНК в концентраторе, после чего растворяли ДНК в деионизованной H_2O или в 1 М сорбитоле.

2.6.3 Полимеразная цепная реакция

Для амплификации последовательностей ДНК использовали метод ПЦР с помощью набора реактивов и полимеразы Encyclo (Евроген, Россия) и праймеров (таблица 3). ПЦР проводили в термоциклере (T100 Biorad, США) с помощью следующей программы:

94 °С – 3 минуты (1 цикл)

94 °С – 30 секунд; 52°С – 30 секунд; 70 °С – 85 секунд (30 циклов)

72 °С – 5 минут (1 цикл)

При проведении градиентной ПЦР использовали диапазон различных температур отжига праймеров (между 40 и 60°С).

Таблица 3. Праймеры, использованные в работе

Название	Последовательность (5'→3')
PGAL-F-BamHI	<u>GGATCC</u> ACTAGTACGGATTAGAAG
PGAL R	TCGTCCTCACGGACTCATCAGGTTGCCCTTAATATTCCTA TAGTGAGTCG
Broccoli2 F	GATGAGTCCGTGAGGACGAAACGAGTAAGCTCGTCGTTGC CATGTGTATGTGG
Broccoli2 R	TGCCGGCCGTTGCCATGAATGATCCC
CYC1-R-PstI	<u>CTGCAGTACGGT</u> TCCCGAAGTATG

PSNR2xBroc-AgeI-F	ATTACAACCGGTCACACAGGAAACAGCTATGAC
PSNR2xBroc-BsrGI-R	ATTACATGTACAAGACATAAAAAACAAAAAATGAAGCT TGCCATGAATGA
PSNR2xBr-R	AGTGGATCATTATCTTTCCTACTGC
PSNR2xBr-F	AGATAAATGATCCACTGGTTCCAATTGTATTGC
5'HA F	CAAACATTGTGCCCACTAC
5'HA R	CTCCTTATAGTACACGAATCGTC
3'HA F	ATTAATGGTAAACAGCACAGC
3'HA R	GGTGTCCACAGATCAAATG
3'XRN-HA-F	ATACAGGATCCATTAATGGTAAACAGCACAGC
5'XRN-HA-R	ATACAGGATCCCTCCTTATAGTACACGAATCGTC
5'XRN-HA-F	GTGGACACCGAATTCCAAACATTGTGCCCACTAC
3'XRN-HA-R	CACAATGTTTGGAATTCGGTGTCCACAGATCAAATG
5'HA-ZeoR-F	AGGATACTGTCTTCTTCCGTA CTTATAATCGGGTTCACACA CCATAGCTTCAAATG
3'HA-ZeoR-R	TGTTTACCATTAATGAATTTTTTCAAATCTTGGCTTTTGCTC ACATGTTGGTCT

2.6.4 Рестрикция ДНК, лигирование фрагментов ДНК

Гидролиз ДНК и дефосфорилирование векторов проводили в буферах и в условиях, предложенных фирмой-производителем фермента (Thermo Fisher Scientific Inc., США).

Лигирование фрагментов ДНК осуществляли с помощью T4 ДНК лигазы (Евроген, Россия) согласно протоколу производителя.

2.6.5 Электрофоретическое разделение ДНК

Электрофорез проводили в горизонтальной камере Sub-Cell GT Cell (Bio-Rad, США). Для проведения электрофореза и приготовления агарозного геля использовали буфер ТАЭ (40 мМ Трис-НСl рН 7.0; 20 мМ уксусная кислота; 1 мМ ЭДТА). Фрагменты ДНК разделяли при напряженности электрического поля 5 В/см. Для визуализации ДНК добавляли бромистый этидий в агарозный гель до конечной концентрации 0,5 мкг/мл (ООО «Хеликон», Россия) и регистрировали с помощью УФ-трансиллюминатора при длине волны 365 нм. В качестве маркера использовали маркер длин ДНК 1 kb DNA Ladder и маркер длин ДНК 100+ bp DNA Ladder (Евроген, Россия).

2.6.6 Секвенирование ДНК

Для подтверждения структуры полученных плазмид проводили секвенирование по методу Сэнгера в Ресурсном центре СПбГУ «Развитие молекулярных и клеточных технологий» на автоматическом капиллярном секвенаторе ABI Prism 3500 xl (Applied Biosystems, США). Для секвенирования использовали праймеры, специфичные для анализируемых последовательностей (таблица 3).

2.7 Анализ флуоресценции клеток дрожжей

Для анализа флуоресценции аптамера РНК 1 мл суспензии дрожжей после выращивания в определенной среде собирали центрифугированием при 6000 об/мин в течение 2 минут, промывали 0,5 мл буфера PBS (200 мг/л, KCl, 200 мг/л KH_2PO_4 , 8 г/л NaCl, pH 7,4), центрифугировали в тех же условиях. К осадку добавляли 100 мкл буфера PBS с красителем DFHBI-1 в концентрации 500 мкМ и инкубировали 1 час. Затем клетки собирали центрифугированием, промывали 2 раза буфером PBS для удаления остатков красителя, ресуспендировали в 1 мл буфера PBS. В комплексе с аптамером Broccoli краситель DFHBI-1T имеет максимумы поглощения и эмиссии при длинах волн 482 нм и 505 нм соответственно. Таким образом, для измерения его флуоресценции использовали оборудование и фильтры, применяемые при работе с зелёным флуоресцентным белком (GFP). Интенсивность флуоресценции измеряли на спектрофлуориметре в Ресурсном центре СПбГУ «Обсерватория экологической безопасности».

2.8 Транскриптомный анализ

2.8.1 Выделение суммарной РНК дрожжей

Выделение суммарной РНК дрожжей проводили с использованием набора YeaStar RNA Kit (ZymoResearch, США). Качество полученной РНК оценивали с помощью электрофореза в агарозном геле (Rumyantsev *et al.*, 2022). После выделения РНК обрабатывали ДНКазой 1 согласно рекомендациям фирмы производителя (Thermo Fisher Scientific Inc., США). После обработки РНК снова очищали с помощью набора CleanRNA Standard (Евроген, Россия). Концентрацию РНК определяли с помощью спектрофотометра Nanodrop (Thermo Fisher Scientific Inc., США).

2.8.2 Получение библиотеки кДНК и секвенирование

300 нг тотальной РНК каждого образца использовали для приготовления библиотек с помощью набора QuantSeq 3' mRNA-Seq Library Prep Kit FWD for Illumina (cat #015.96, Lexogen, Австрия). Качественный и количественный анализ образцов производили с помощью флуориметра Qubit и капиллярного электрофореза в системе Agilent 2200 TapeStation System. Секвенирование производили с помощью набора MiSeq Reagent Kit v2, (1x300, cat. #MS-102-2002, Illumina, США) на секвенаторе MiSeq.

2.8.3 Анализ дифференциальной экспрессии генов дрожжей

С помощью программы Trimmomatic были удалены адаптеры и индексы и отфильтрованы прочтения. Качество прочтений проверяли с помощью программы FastQC. Для выравнивания использовали геном штамма S288C дрожжей *S. cerevisiae* (GCA_000146045.2 R64) и аннотацию из базы данных NCBI (National Center for Biotechnology Information). Прочтения выравнивали с помощью hisat-2 со стандартными параметрами. После выравнивания прочтения отсортировали и проиндексировали с помощью samtools. Для подсчета количества выровненных прочтений использовали программу featureCounts. Анализ дифференциальной экспрессии генов проводили при помощи языка программирования R (версия 3.6.3) и библиотеки DESeq2 (версия 1.24.0). Для дальнейшего анализа использовались гены, скорректированное значение p-value которых было меньше 0.05 и значение логарифма изменения экспрессии ($\log_2\text{FoldChange}$) было больше 0.5 по модулю (Rumyantsev *et al.*, 2022).

2.9 Статистическая обработка данных

Статистическую обработка полученных данных проводили при помощи программного пакета R-Studio (версия R 3.5.1). Анализ выборок проводился при помощи U-теста Манна — Уитни.

3 РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1 Разработка репортерной конструкции на основе аптамера РНК Broccoli

Для разработки эффективной системы для синтеза коротких молекул РНК в дрожжевых клетках необходимо иметь возможность определять и анализировать количество и стабильность синтезированных молекул и оптимизировать условия культивирования штаммов-продуцентов. С этой целью была разработана и получена удобная репортерная система на основе аптамера РНК Broccoli.

Аптамер Broccoli представляет собой транскрипт РНК из 112 нуклеотидов, состоящий из двух частично комплементарных последовательностей. Синтезированный аптамер начинает флуоресцировать только после образования правильной вторичной структуры и взаимодействия с красителем DFHBI-1T (эмпирическая формула $C_{13}H_9F_5N_2O_2$). Молекула флуорофора нетоксична и легко может проходить через клеточную мембрану. Таким образом, анализируя флуоресценцию клеток можно оценивать уровень синтеза репортерного аптамера и эффективность используемых векторов экспрессии (Filonov *et al.*, 2016).

Структура аптамера Broccoli и его сравнительно небольшой размер позволяют получать димеры аптамера. Это приводит к увеличению флуоресценции примерно на 70% (Ouellet, 2016).

Для клонирования аптамера Broccoli мы использовали два варианта экспрессионных кассет: в первом случае дублированная последовательность аптамера находилась под контролем регулируемого *GALI* промотора, узнаваемого РНК-полимеразой II, во втором – под контролем *SNR52* промотора, узнаваемого РНК-полимеразой III.

3.1.1 Получение плазмиды pYES2-PGAL-Br-TC

Использование плазмиды pYES2 с промотором гена *GAL1* для экспрессии аптамера потребовало включения в состав экспрессионной кассеты последовательностей рибозимов вируса гепатита дельта (HDV) и типа Hammerhead (HH) (рисунок 3). Это было необходимо для удаления 5' (кэп) и 3' (полиА) последовательностей, характерных для продуктов РНК-полимеразы 2 (Шанаа У.А и др., 2022).

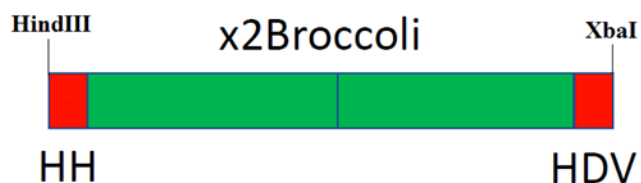


Рисунок 3. Относительное расположение элементов репортерной конструкции. Указаны рибозимы Hammerhead (HH) и HDV, тандемный повтор аптамера Broccoli и сайты рестрикции HindIII и XbaI.

Для экспрессии аптамера РНК Broccoli в дрожжевых клетках мы использовали вектор pYES2, размер которого 5,9 т.п.н. (Thermo Fisher Scientific Inc., США). Плазмида представляет собой челночный вектор с рядом полезных свойств, облегчающих трансформацию, клонирование и регуляцию экспрессии генов как у бактерий, так и у дрожжей. Плазмида включает дрожжевой промотор *GAL1* для высокого уровня индуцируемой экспрессии галактозой, терминатор *CYC1*, сайт множественного клонирования между промотором и терминатором, а также селективные маркеры для отбора трансформантов *E. coli* (ген устойчивости к ампициллину) и селекции трансформантов дрожжей (ген *URA3*). Вектор содержит два ориджина для поддержания и репликации большого количества копий: pUC для бактерий и 2μ ДНК для дрожжей.

Структура репортерной конструкции была подобрана таким образом, чтобы обеспечить правильную укладку и функционирование рибозимов и аптамеров Broccoli (Шанаа У.А и др., 2022) (рисунок 4).

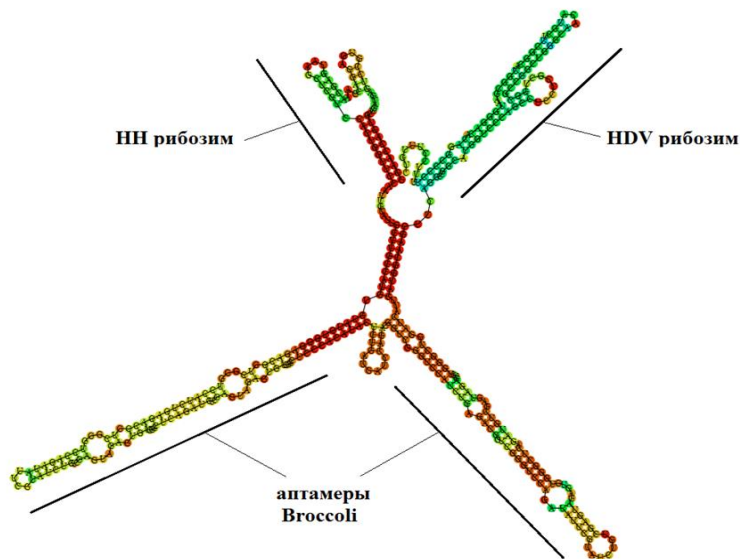


Рисунок 4. Результат предсказания вторичной структуры рибозимов НН и HDV, а также тандемного повтора аптамера Broccoli в составе разработанной репортерной конструкции. Анализ проведен с помощью сервиса RNAfold (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>).

Последовательность тандемного повтора аптамера, фланкированного рибозимами, была получена химическим синтезом и клонирована сначала в промежуточную плазмиду pUC57 (Lumiprobe, Россия). Полученную плазмиду pUC57-Br обработали двумя рестрикционными ферментами HindIII и XbaI. Фрагменты разделяли с помощью электрофореза. Вставку, кодирующую репортерную конструкцию, выделяли из агарозного геля. Одновременно с этим плазмиду pYES2 обрабатывали с использованием тех же рестрикционных ферментов и обрабатывали фосфатазой. Полученный фрагмент также очищали из агарозного геля. Затем фрагменты лигировали с последовательностью аптамера Broccoli, фланкированной рибозимами Hammerhead (НН) и вируса гепатита D (HDV), чтобы создать кассету

экспрессии аптамера под контролем промотора *GAL1* и терминатора *CYC1*. Лигазной смесью трансформировали бактерий *E. coli*. Из полученных трансформантов выделяли плазмидную ДНК. Общая схема конструирования плазмиды pYES2-PGAL-Br-TC представлена на рисунке 5.

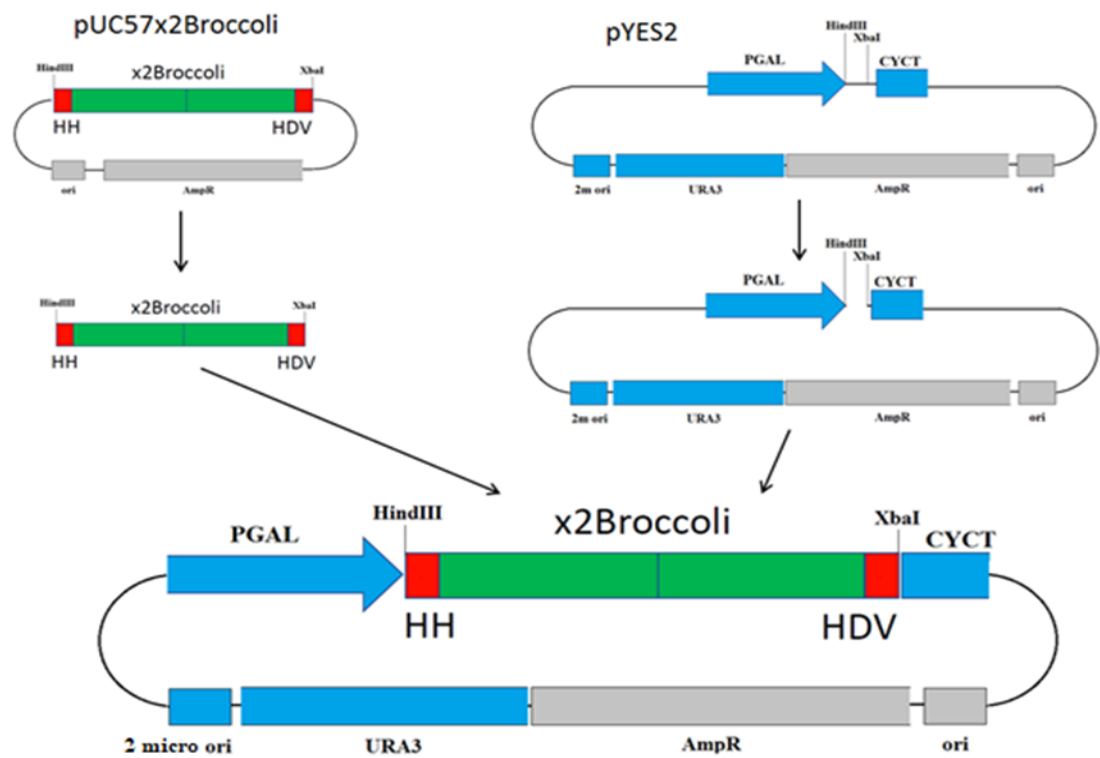


Рисунок 5. Схема конструирования плазмиды pYES2-PGAL-Br-TC. Красным выделены рибозимы Hammerhead (HH) и HDV, зелёным - тандемный повтор аптамера Broccoli), серым – ориджин репликации ori и ген устойчивости к ампициллину AmpR), синим – промотор *PGAL*, терминатор *CYC*, селективный маркер – ген *URA3*, ориджин репликации 2 micron ori).

Полученную плазмиду pYES2-PGAL-Br-TC анализировали с помощью ПЦР, используя праймеры к промотору *GAL1* (PGAL-F и PGAL-R), последовательности аптамера (Broccoli 2F и Broccoli 2R), терминатору транскрипции *CYC1* (CYC1-R),

приведенные в таблице 3. Результаты ПЦР и рестрикционного анализа приведены на рисунке 6 (a, b, c, d).

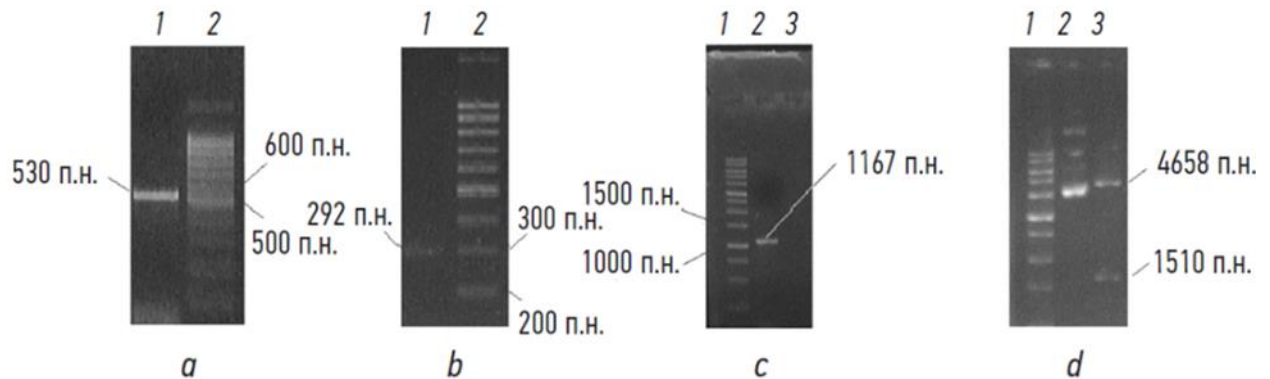


Рисунок 6. Электрофореграммы результатов ПЦР-амплификации фрагментов экспрессионной кассеты в составе плазмиды pYES2-PGAL-Br-TC (a–c) и рестрикционного анализа (d):

a, 1 — промотор гена *GAL1*, амплифицированный с использованием праймеров PGAL-F и PGAL-R (530 п.н.); 2 – маркер DNA Ladder 100+ bp (Евроген, Россия);

b, 1 — тандемный повтор *x2Broccoli* (292 п.н.), амплифицированный с использованием праймеров *Broccoli 2F* и *Broccoli 2R*; 2 - маркер DNA Ladder 100+ bp (Евроген, Россия);

c, 1 - маркер DNA Ladder 100+ bp (Евроген, Россия); 2 — полноразмерная кассета экспрессии (1167 п.н.), включающая промотор гена *GAL1*, аптамеры *Broccoli*, рибозимы *HN* и *HDV* и терминатор *CYC1*, амплифицированная с использованием праймеров PGAL-F и *CYC1-R*;

d, 1 - маркер DNA Ladder 1000 bp (Евроген, Россия); 3 — результаты рестрикционного анализа плазмиды pYES2-PGAL-Br-TC, имеющей два сайта рестрикции *BglII* (один в экспрессионной кассете, а другой вне ее).

Размеры полученных фрагментов соответствовали теоретически ожидаемым (Шанаа У.А. и др., 2022).

Дополнительно проводили секвенирование полученной плазмиды с использованием праймеров, специфичных к последовательности промотора *PGAL* и терминатора *CYC1* (*PGAL-F* и *CYC1-R*). Результаты секвенирования представлены на рисунке 7.

```

result      AAGCTTGGAAACCAGTGCTGATG
ordered     AAGCTTGGAAACCAGTGCTGATG
            *****

result      AGTCCGTGAGGACGAAACGAGTAAGCTCGTCCACTGGTTCCAATTGTATTGCTTGCCATG
ordered     AGTCCGTGAGGACGAAACGAGTAAGCTCGTCCACTGGTTCCAATTGTATTGCTTGCCATG
            *****

result      TGTATGTGGGAGACGGTCGGGTCCATCTGAGACGGTCGGGTCCAGATATTCGTATCTGTC
ordered     TGTATGTGGGAGACGGTCGGGTCCATCTGAGACGGTCGGGTCCAGATATTCGTATCTGTC
            *****

result      GAGTAGAGTGTGGGCTCAGATGTGAGTAGAGTGTGGGCTCCACATACTCTGATGATCC
ordered     GAGTAGAGTGTGGGCTCAGATGTGAGTAGAGTGTGGGCTCCACATACTCTGATGATCC
            *****

result      AGACGGTCGGGTCCATCTGAGACGGTCGGGTCCAGATATTCGTATCTGTCGAGTAGAGTG
ordered     AGACGGTCGGGTCCATCTGAGACGGTCGGGTCCAGATATTCGTATCTGTCGAGTAGAGTG
            *****

result      TGGGCTCAGATGTGAGTAGAGTGTGGGCTGGATCATTGATGGCAAGCTTCAGGCCGGCA
ordered     TGGGCTCAGATGTGAGTAGAGTGTGGGCTGGATCATTGATGGCAAGCTTCAGGCCGGCA
            *****

result      TGGTCCCAGCCTCCTCGTGGCGCCGGCTGGGCAACATGCTTCGGCATGGCGAATGGGAC
ordered     TGGTCCCAGCCTCCTCGTGGCGCCGGCTGGGCAACATGCTTCGGCATGGCGAATGGGAC
            *****

result      ACAGGCCCTTTTCCTTTGTCGATTCTAGA
ordered     ACAGGCCCTTTTCCTTTGTCGATTCTAGA
            *****

```

Рисунок 7. Результаты выравнивания разработанной репортерной последовательности (ordered) и последовательности, полученной при секвенировании плазмиды *pYES2-PGAL-Br-TC* (result). Последовательности полностью совпадают. Встраивание произошло точно в использованные сайты рестрикции *HindIII* и *XbaI*, выделенные прямоугольниками.

Таким образом была получена плазмида рYES2-PGAL-Br-TC. Подробная ее схема представлена на рисунке 8.

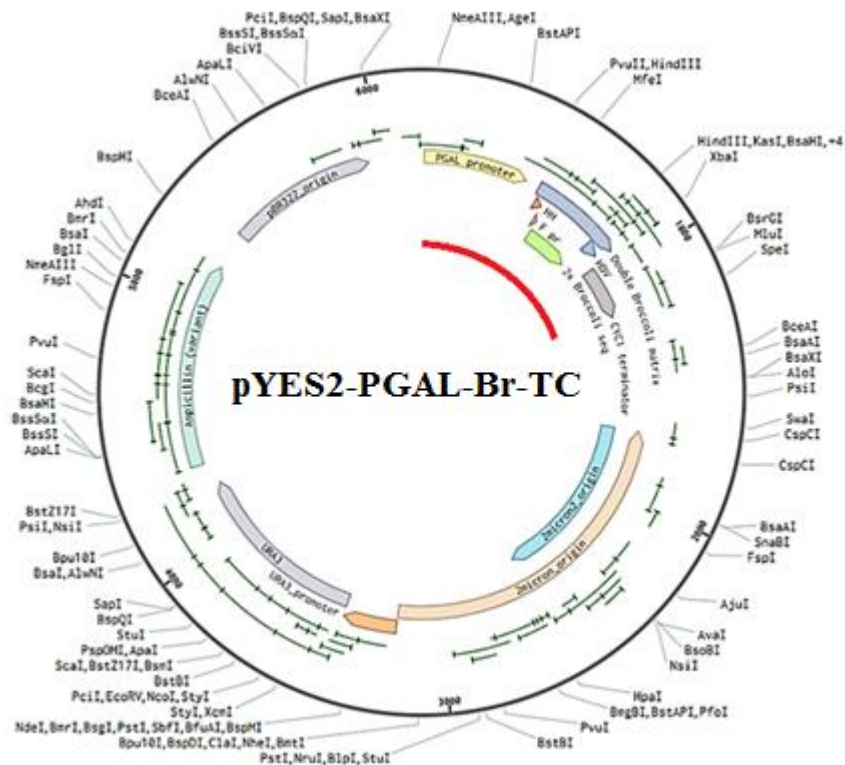


Рисунок 8. Схема плазмиды рYES2-PGAL-Br-TC. Красным отмечена экспрессионная кассета, обеспечивающая синтез репортерной конструкции. Указаны её элементы: промотор PGAL, рибозимы NH и HDV, тандемный повтор аптамера Broccoli и терминатор CYC1.

3.1.2 Получение плазмиды рYES2-PSNR-Br-TS

Альтернативный вариант экспрессионной кассеты, обеспечивающей синтез аптамера Broccoli, был получен на основе промотора гена *SNR52*, распознаваемого

РНК-полимеразой III, и терминатора гена *SUP4*. Последовательности tandemного повтора аптамера Broccoli, промотора *SNR52* и терминатора *SUP4* были амплифицированы с помощью метода ПЦР. Использовали пары праймеров (PSNR2xBr-AgeI-F и PSNR2xBr-R, PSNR2xBr-F и PSNR2xBr-BsrGI-R) с перекрывающимися последовательностями в первых раундах ПЦР. Далее очищенные из агарозного геля фрагменты служили матрицей во втором раунде ПЦР. При этом использовали прямой праймер к последовательности промотора *SNR52* (PSNR2xBr-AgeI-F) и обратный праймер к последовательности терминатора *SUP4* (PSNR2xBr-BsrGI-R), содержащие сайты рестрикции для AgeI и BsrGI. Наличие перекрывающихся последовательностей обеспечило соединение фрагментов в единый фрагмент SNR52-x2Broccoli-SUP4. Этот итоговый фрагмент клонировали в вектор pYES2 с использованием сайтов рестрикции AgeI и BsrGI вместо промотора *GAL1* и терминатора *CYC1*. Полученная плазмида pYES2-PSNR-Br-TS была проверена с помощью ПЦР (рисунок 9).

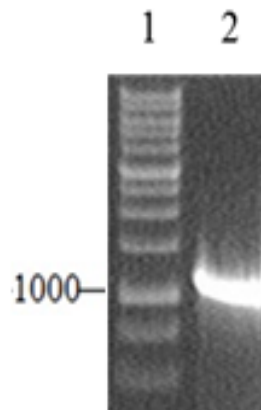


Рисунок 9. Электрофореграмма результатов ПЦР-амплификации экспрессионной кассеты в составе плазмиды pYES2-PSNR-Br-TS. 1 - маркер DNA Ladder 1000 bp (Евроген, Россия), 2- результаты ПЦР с использованием праймеров, специфичных к последовательности промотора *SNR52* (PSNR2xBr-AgeI-F) и

3.1.3 Экспрессия плазмид pYES2-PGAL-Br-TC и pYES2-PSNR-Br-TS в клетках дрожжей *S. cerevisiae*

Плазмиды pYES2-PGAL-Br-TC и pYES2-PSNR-Br-TS содержат ген *URA3* в качестве селективного маркера, поэтому в качестве реципиента использовали штамм дрожжей *S. cerevisiae* D623 (*ura3 lys2 leu2 trp1*). Отбор трансформантов происходил на селективной среде за счет восстановления прототрофности по урацилу (Шанаа У.А. и др., 2022).

У полученных трансформантов анализировали экспрессию репортерной конструкции. Для этого трансформанты с плазмидой pYES2-PGAL-Br-TC с экспрессионной кассетой PGAL-x2Broccoli-CYC1 выращивали в жидкой среде Md с глюкозой в течение 24 часов. После наращивания биомассы клетки центрифугировали и переносили в среду Md, содержащую галактозу в качестве источника углерода. Контрольные варианты переносили в среду Md с глюкозой в качестве источника углерода. Клетки инкубировали в течение 24 часов. Далее клетки из 1 мл культуры собирали центрифугированием, промывали 0,5 мл буфера PBS, снова центрифугировали, удаляли супернатант. К осадку добавляли 100 мкл буфера PBS с красителем DFHBI-1T в концентрации 500 мкМ и инкубировали 1 час. После инкубации клетки собирали центрифугированием, дважды промывали от остатков красителя буфером PBS и ресуспендировали в 1 мл буфера PBS.

При инкубировании клеток полученных трансформантов в средах с галактозой происходила активация промотора *GAL1*. В результате происходила экспрессия репортерной конструкции и синтез аптамера Broccoli. Он взаимодействовал с проникающим в клетки красителем DFHBI-1T, что приводило к их свечению. При инкубировании клеток в средах с глюкозой промотор *GAL1* был репрессирован, не происходило экспрессии репортерной конструкции, синтеза аптамера Broccoli и не наблюдалось флуоресценции (Шанаа У.А. и др., 2022). Флуоресценцию

анализировали с помощью спектрофлуориметра. Результаты представлены на рисунке 11А, В.

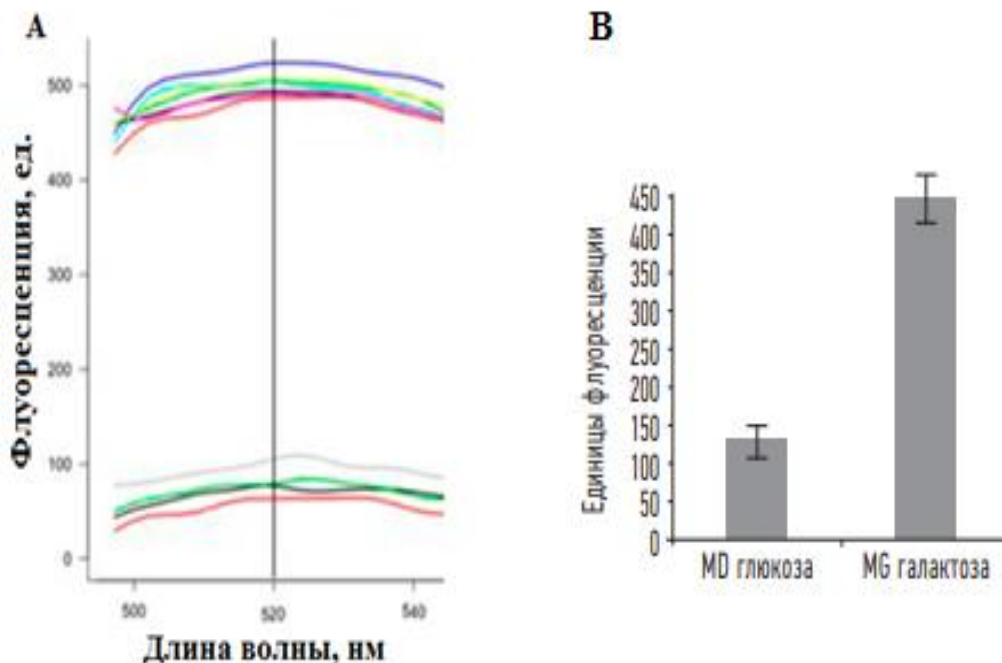


Рисунок 11. А) Кривые флуоресценции суспензий клеток дрожжей *S. cerevisiae* в диапазоне от 500 до 540 нм, полученные при облучении их светом длиной волны 450 нм. Верхние кривые соответствуют клеткам с плазмидой pYES2-PGAL-Br-TC, инкубированным в средах с галактозой. В них происходила экспрессия репортерной конструкции и синтез аптамера Broccoli. Нижние кривые соответствуют клеткам с плазмидой pYES2-PGAL-Br-TC, инкубированным в средах с глюкозой, в которых синтез аптамера подавлен. В) Средние значения флуоресценции (при длине волны 520 нм) суспензий клеток дрожжей *S. cerevisiae*, инкубированных в средах с глюкозой и галактозой. Измерения проводили в четырех повторностях. Указан 95 % доверительный интервал. Достоверность полученных отличий подтверждается с помощью критерия Манна-Уитни ($p < 0,02$).

Таким образом, было продемонстрировано, что полученная плазмида pYES2-PGAL-Br-TC обеспечивает синтез и функционирование аптамера РНК Broccoli в клетках дрожжей *S. cerevisiae*.

У трансформантов, содержащих pYES2-PSNR-Br-TS с экспрессионной кассетой PSNR52-x2Broccoli-SUP4, также оценивали синтез аптамера по уровню флуоресценции с использованием флуорофора DFHBI-1T. В этом случае дрожжи также выращивали в жидкой среде Md с глюкозой в течение 24 часов, но далее их не переносили в среду с галактозой. Контрольный вариант представляли клетки дрожжей, трансформированные плазмидой pYES2 без последовательности аптамера и выращенные в тех же условиях. Уровень флуоресценции при использовании этой экспрессионной кассеты практически не отличался от контроля. Это свидетельствует о том, что данный вариант экспрессионной плазмиды не обеспечивал синтез нужного количества функционального аптамера Broccoli. Поэтому в дальнейшей работе использовали плазмиду pYES2-PGAL-Br-TC и соответствующих трансформантов *S. cerevisiae*.

3.2 Анализ транскриптома дрожжей, синтезирующих аптамер РНК Broccoli

Для того, чтобы оценить, как на экспрессию генов у *S. cerevisiae* влияет синтез больших количеств РНК, содержащих репортерную конструкцию с аптамером Broccoli и рибозимами, использовали методы транскриптомного анализа. В две стадии выращивали культуры трансформанта с плазмидой pYES2-PGAL-Br-TC, синтезирующего репортерную конструкцию, а также культуры контрольного штамма, содержащего исходную плазмиду pYES2 без экспрессионной кассеты.

Сначала наращивали биомассу клеток селективной среде Md с глюкозой в течение 24 часов. В этих условиях была подавлена активность промотора *PGAL*, под контролем которого находится репортерная конструкция. Далее клетки переносили в среды с галактозой для индукции синтеза РНК (Rumyantsev *et al.*, 2022). После

культивирования из клеток выделяли РНК, которую использовали для приготовления библиотек для проведения секвенирования нового поколения. Для каждого из штаммов эксперимент проводили в трех повторностях (Rumyantsev *et al.*, 2022).

На основе результатов секвенирования был проведен биоинформатический анализ. Были получены списки генов, которые достоверно демонстрировали понижение или повышение уровня мРНК в ответ на синтез в клетке аптамера РНК Вроссоли (таблица П1 Приложения). Всего было выявлено 115 таких генов, что составляет примерно 1,8% от общего числа генов у *S. cerevisiae*.

Было обнаружено, что 67 генов характеризуются повышением уровня соответствующих РНК при синтезе репортерной конструкции с аптамером Вроссоли. Для 48 генов, наоборот, наблюдается понижение количества РНК. При этом обнаруженные гены кодируют не только белки, но и разные виды РНК, синтезируемые РНК-полимеразой II, в частности, малые ядерные РНК (мяРНК) и малые ядрышковые РНК (мякРНК).

Синтез репортерной конструкции с аптамером Вроссоли приводит к снижению уровня мРНК ряда генов, кодирующих белки большой субъединицы рибосомы: *RPL3*, *RPL4A*, *RPL5*, *RPL10*, *RPL11A*, *RPL14A*, *RPL18A*. Также подавляется экспрессия ряда генов, кодирующих белки малой субъединицы: *RPS11A*, *RPS23B*, *RPS27B*.

В целом у дрожжей *S. cerevisiae* большая субъединица рибосомы содержит 42 основных белка и по 2 копии двух дополнительных белков. В состав малой субъединицы входят 32 белка (Verschoor *et al.*, 1998). То есть синтез репортерной конструкции воздействует на уровень мРНК малой части рибосомных белков. Эти белки выполняют различные функции и располагаются в разных частях рибосомы (рисунок 12).

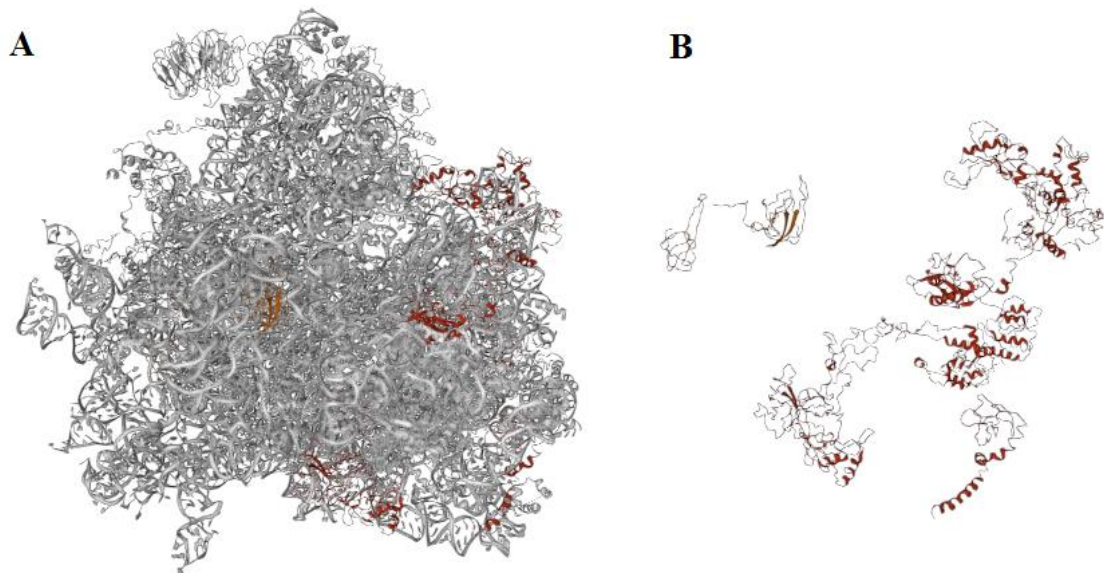


Рисунок 12. Структура рибосомы дрожжей *S. cerevisiae* (модифицировано на основе (Dinman 2009) и соответствующей структуры 4V7R в базе данных PDB ([wwPDB consortium, 2019]). А) Представлена структура рибосомы и обозначено пространственное расположение рибосомных белков, кодируемых генами, подавляемыми при синтезе репортерной конструкции с аптамером Broccoli. Желтым отмечены такие белки в составе малой субъединицы (кодируются генами *RPS11A* и *RPS23B*). Красным – белки в составе большой субъединицы рибосомы (кодируются генами *RPL3*, *RPL4A*, *RPL5*, *RPL10*, *RPL11A*, *RPL14A*, *RPL18A*). В) Представлены только обозначенные белки с сохранением их пространственного расположения.

Одну из групп генов, у которых уровень РНК изменялся при синтезе репортерной конструкции с аптамером Broccoli, составили гены, связанные со сплайсингом мРНК. В частности, увеличивался уровень РНК генов *SNR19* и *LSR1*, кодирующих ключевые мяРНК – U1, которая узнает 5' границу сплайсинга, и U2, которая связывается с точкой ветвления в составе интрона (Kretzner et al., 1987; Riedel et al., 1986).

В ответ на синтез репортерной конструкции возросло также количество РНК генов, кодирующих малые ядрышковые РНК (мякРНК), вовлеченные в созревание рибосомных РНК (Smarsky, Fournier, 1999). Это касается генов мякРНК, содержащих

Н/АСА последовательность (Н/АСА-box) - *SNR46* и *SNR49*. Эти мякРНК обеспечивают образование псевдоуридинов в определенных положениях созревающих рибосомных РНК (рисунок 13 В) (Ni *et al.*, 1997). Также повышается активность гена *SNR40*, кодирующего мякРНК с C/D последовательностью, которая участвует в 2'-О-метилировании определенных нуклеотидов рРНК (рисунок 13 В) (Smarsky, Fournier, 1999; Lowe, Eddy, 1999). Это происходит на фоне снижения активности гена *NOP56*, кодирующего один из важнейших компонентов комплекса белков и соответствующих мякРНК, который осуществляет 2'-О-метилирование (Gautier *et al.*, 1997).

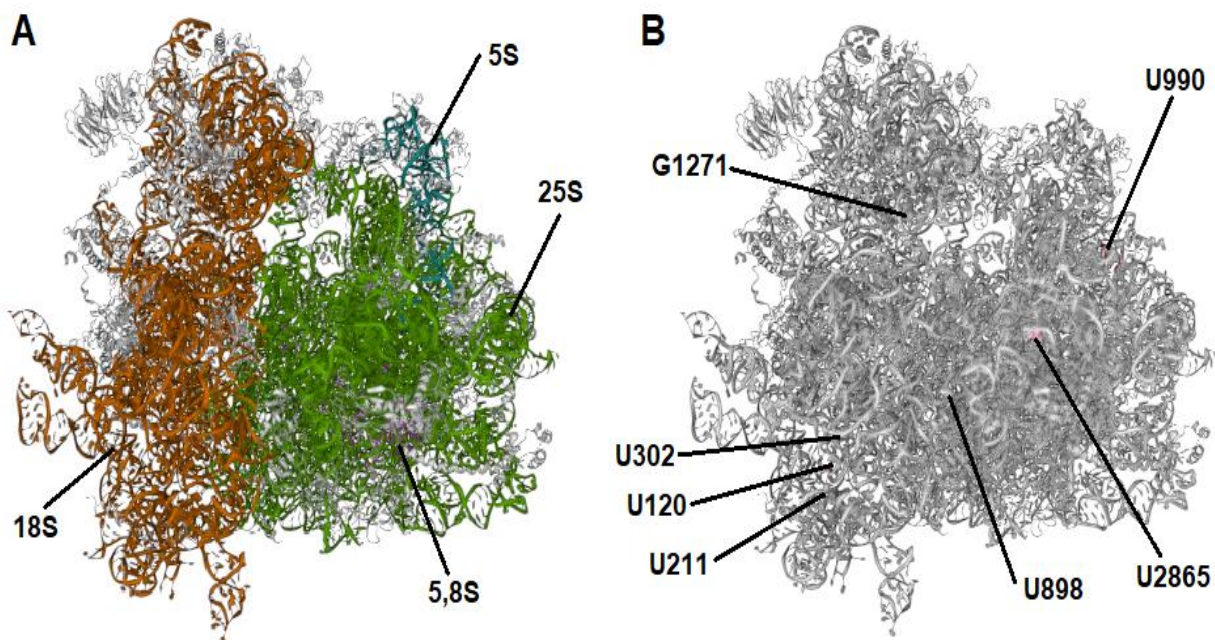


Рисунок 13. Пространственное расположение рибосомных РНК в составе малой субъединицы (18S) и большой субъединицы (5S, 5,8S и 25S) рибосомы дрожжей *S. cerevisiae* (модифицировано на основе (Dinman 2009) и соответствующей структуры 4V7R в базе данных PDB ([wwPDB consortium, 2019]). А) Обозначены структура и пространственное расположение рибосомных РНК в составе малой субъединицы (18S) и большой субъединицы (5S, 5,8S и 25S). В) Обозначены нуклеотиды, модифицируемые с участием мякРНК, кодируемых генами *SNR40*, *SNR46* и *SNR49*. мякРНК *SNR40* направляет 2'-О-метилирование в положении U898 в 25S

рРНК и в положении G1271 в 18S рРНК. мяРНК SNR46 направляет образование псевдоуридинов в положении U2865 в 25S рРНК. мяРНК SNR49 направляет образование псевдоуридинов в положении U990 в 25S рРНК и в положениях U120, U211 и U302 в 18S рРНК. Для исследуемых мякРНК характерно разное расположение мишеней в РНК и осуществление различных модификаций.

3.3 Получение штамма дрожжей *S. cerevisiae* с делецией в гене *XRN1*

С помощью полученной в данной работе репортерной системы на основе аптамера Broccoli была продемонстрирована возможность эффективного синтеза небольших молекул РНК в клетках дрожжей. С использованием методов транскриптомного анализа было изучено влияние синтеза коротких молекул аптамеров РНК на активность генов, процессинг РНК и работу нуклеаз в клетках дрожжей *S. cerevisiae*. На следующем этапе исследования была предложена и отработана методика по модификации штаммов дрожжей *S. cerevisiae* для увеличения стабильности синтезируемых молекул РНК и аптамеров РНК.

3.3.1 Получение плазмиды pPICZ-5'-3'-XRN1 для внесения делеции гена *XRN1*

Стабильность и время существования определенных молекул РНК в живых клетках может различаться в зависимости от их типа и функций. Регуляция деградации молекул РНК является одним из важных уровней регуляции экспрессии генов. Гидролиз молекул РНК в клетках могут осуществлять различные экзо- и эндонуклеазы. Их повышенная активность может уменьшать стабильность и время жизни коротких РНК в клетках.

В связи с этим был произведен анализ литературы и баз данных для дрожжей *S. cerevisiae*. В результате был составлен список известных нуклеаз, среди которых в

качестве объекта для дальнейшей работы была выбрана экзонуклеаза, кодируемая геном *XRN1*.

Эволюционно консервативная 5'-3'-экзонуклеаза Xrn1 играет ключевую роль в распаде мРНК. Помимо этого, она способна проникать в ядро и положительно регулировать инициацию транскрипции. Она также участвует в процессах, опосредованных микротрубочками, созревании рибосомной РНК и поддержании теломер (Jones *et al.*, 2012; Nagarajan *et al.*, 2013).

Для оценки возможности модификации штаммов дрожжей *S. cerevisiae* для увеличения стабильности синтезируемых молекул РНК был получен штамм, содержащий делецию в гене *XRN1*.

Общая схема эксперимента по получению штамма дрожжей с делецией гена *XRN1* приведена на рисунке 14.



Рисунок 14. Схема экспериментов по внесению делеции в последовательность гена *XRN1* у дрожжей *S. cerevisiae*. Обозначены фрагменты,

соответствующие плечам гомологии 5'НА (синим) и 3'НА (красным), последовательности гена устойчивости к антибиотику зеоцину ZeoR (зеленым) и кодирующей последовательности гена *XRN1* (серым) в составе генома.

Сначала было проведено определение как вышестоящего, так и нижестоящего участков гена *XRN1*, в геноме *S. cerevisiae* (рисунок 15).

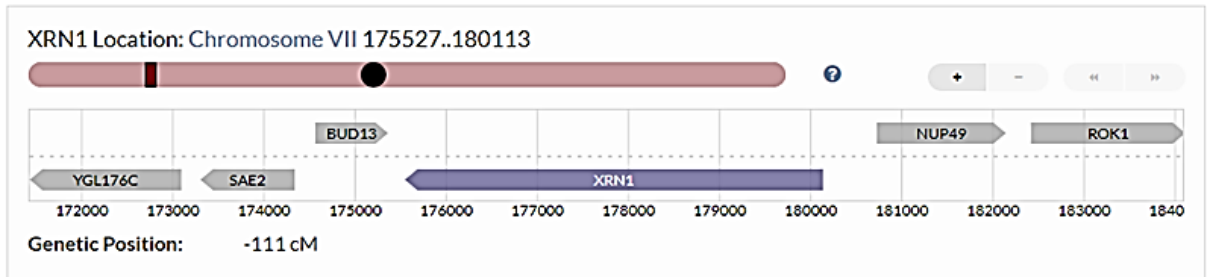


Рисунок 15. Схема локуса гена *XRN1* и соседних участков из базы данных SGD (<https://www.yeastgenome.org/locus/SGD:S000003141>).

Размер гена составляет 4587 п.н., Мы выбрали две межгенные области выше и ниже последовательности локуса *XRN1*. Размеры этих плечей гомологии составили 540 п.н. (для 5') и 451 п.н. (для 3') соответственно. К их последовательностям были подобраны соответствующие праймеры (таблица 3).

Хромосомную ДНК дрожжей *S. cerevisiae* (штамм D623) использовали в качестве матрицы для ПЦР-амплификации как 5'-, так и 3'- плечей гомологии. Оптимальные условия для амплификации подбирали с помощью градиентной ПЦР, в которой мы использовали диапазон различных температур отжига праймеров (между 40 и 60°C). Результаты первой ПЦР представлены на рисунке 16. Амплифицированные фрагменты содержали перекрывающийся участок с сайтом рестрикции *EcoRI*.

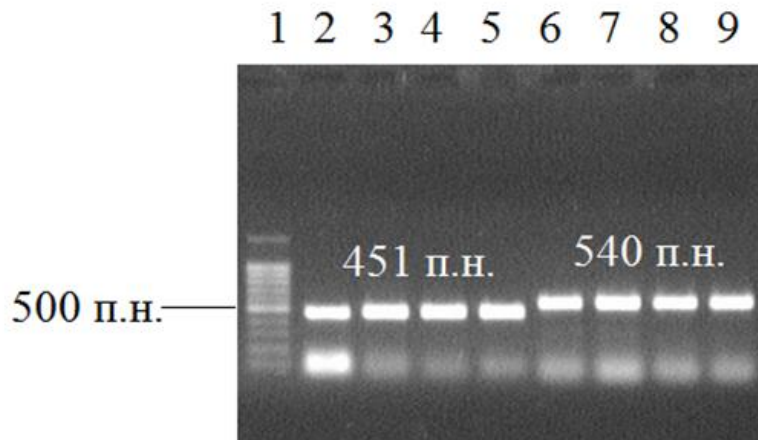


Рисунок 16. Электрофореграмма результатов ПЦР с геномной ДНК дрожжей *S. cerevisiae* и праймерами к 3'-гомологичному плечу (2-5 дорожки, ожидаемый размер 451 п.н.) и 5'-гомологичному плечу (6-9 дорожки, ожидаемый размер 540 п.н.). 1 - Маркер длин ДНК 100bp (Евроген).

Полученные фрагменты очищали из агарозного геля. Далее проводили следующий этап ПЦР, в котором в качестве матрицы использовалась смесь полученных фрагментов. При этом использовали праймеры 3'XRN1-НА-F и 5'XRN1-НА-R, содержащие сайты BamHI (таблица 3). В ходе второго раунда ПЦР фрагменты соединялись в единый фрагмент 3'-5'XRN1 (рисунок 17).

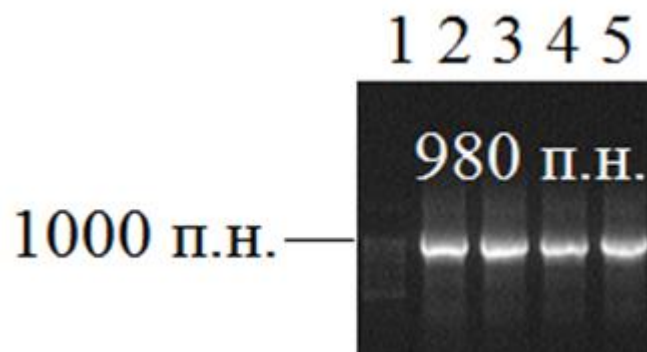


Рисунок 17. Электрофореграмма результатов ПЦР со смесью фрагментов, соответствующих 3'-гомологичному плечу и 5'-гомологичному плечу, в качестве матрицы и праймерами 3'XRN1-НА-F и 5'XRN1-НА-R (дорожки 2-5, ожидаемый фрагмент 980 п.н.). Маркер длин ДНК 100bp (Евроген, дорожка 1).

На концах полученного фрагмента находятся сайты *Vam*HI, введенные в составе праймеров. Фрагмент обрабатывали рестриктазой *Vam*HI и очищали из агарозного геля. Одновременно проводили рестрикцию плазмиды *p*ICZaB, используя рестриктазы *Vam*HI и *Bgl*II, которые образуют одинаковые «липкие концы» в месте разрезания. Нужный фрагмент плазмиды, содержащий ген устойчивости к зеоцину отделяли с помощью метода электрофореза и очищали из агарозного геля. Фрагмент 3'-5'XRN1 и фрагмент плазмиды *p*ICZaB лигировали.

Лигазной смесью трансформировали бактерии *E. coli*, отбирали трансформантов на среде с антибиотиком зеоцином. Из полученных трансформантов выделяли плазмиду *p*ICZ-5'-XRN-3' и анализировали ее с помощью ПЦР (рисунок 18).

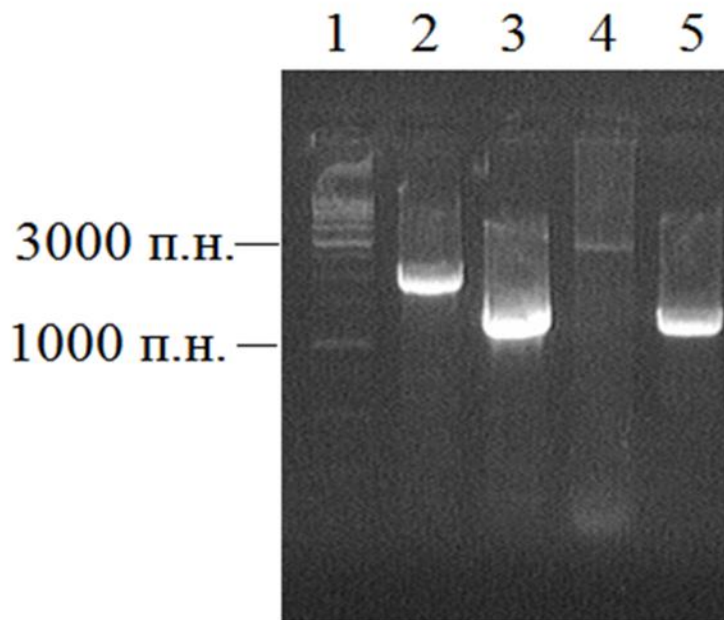


Рисунок 18. Электрофореграмма результатов ПЦР-анализа плазмиды *p*ICZ-5'-3'-XRN1. 1 - маркер длин ДНК 1kb (Евроген); 2 - ПЦР продукт, полученный с использованием праймеров к 3' плечу гомологии (3'XRN1-НА-R) и гену устойчивости к зеоцину (*ZeoDown*); 3 - ПЦР продукт, полученный с использованием праймеров к 5' плечу гомологии (5'XRN1-НА-F) и гену устойчивости к зеоцину (*ZeoUp*); 4 - результат ПЦР с праймерами 5'НА-*ZeoR*-F и 3'НА-*ZeoR*-R, в ходе

которой амплифицируется вся последовательность плазмиды; 5 - результат проверки полученного далее в ходе работы штамма 1-D623 (см. рисунок 20). Размеры всех полученных фрагментов соответствовали теоретически ожидаемым.

Схема плазмиды pPICZ-5'-3'-XRN1 приведена на рисунке 19.

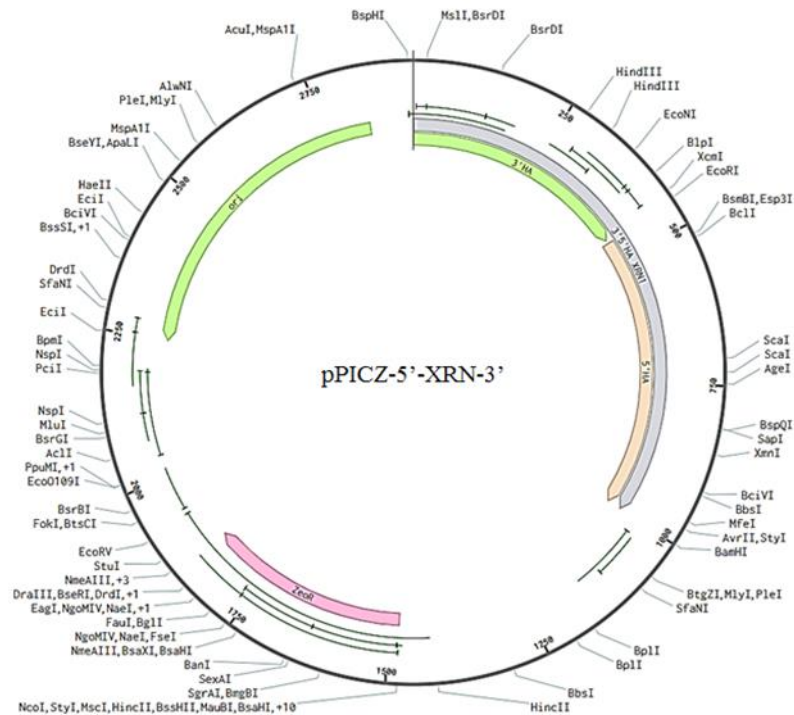


Рисунок 19. Схема плазмиды pPICZ-5'-3'-XRN1 для внесения делеции в ген XRN1 у дрожжей *S. cerevisiae*. Указаны следующие элементы: 3'-гомологичное плечо (3'-НА), 5'-гомологичное плечо (5'-НА), бактериальный ориджин репликации (ori) и ген устойчивости к зеоцину (Zeo).

3.3.2 Получение штамма дрожжей с делецией в гене XRN1 и оценка его жизнеспособности

Полученная плазмида pPICZ-5'-3'-XRN была линейаризована рестриктазой EcoRI. Образующийся при этом фрагмент содержит ген устойчивости к антибиотику

зеоцину, фланкированный плечами гомологии. Этим фрагментом был трансформирован штамм дрожжей *S. cerevisiae* D623 (*ura3 lys2 leu2 trp1*). Отбор трансформантов проводили на полной среде с антибиотиком зеоцином.

Из клонов, устойчивых к антибиотику зеоцину, была выделена геномная ДНК. С помощью метода ПЦР было подтверждено наличие в геноме у отобранных трансформантов делеции в гене *XRN1* (рисунок 20).

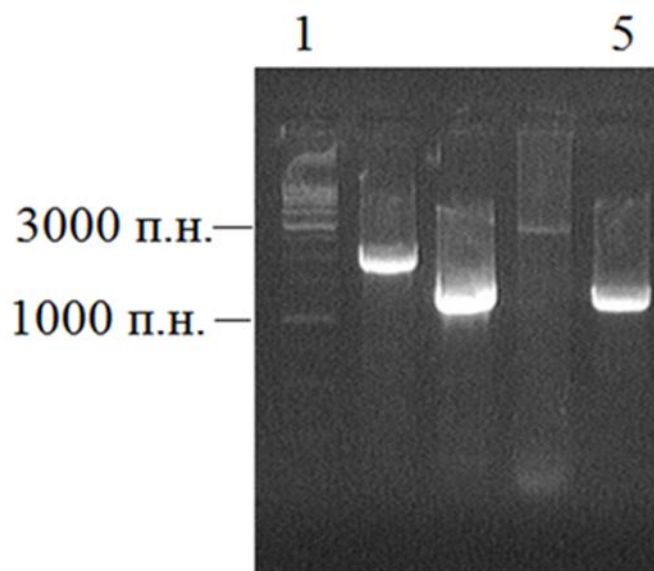


Рисунок 20. Электрофореграмма результатов ПЦР-анализа штамма 1-D623 (*ura3 lys2 leu2 trp1 Δxrn1 ZeoR*). 1 - маркер длин ДНК 1kb (Евроген); 5- ПЦР продукт, полученный с использованием праймеров к 5' плечу гомологии (5'*XRN1*-НА-*F*) и гену устойчивости к зеоцину (*ZeoUp*). Размеры всех полученных фрагментов соответствовали теоретически ожидаемым.

Таким образом был получен штамм 1-D623 (*ura3 lys2 leu2 trp1 Δxrn1 ZeoR*), содержащий делецию в гене эндонуклеазы *XRN1*. Далее был проведен анализ влияния этой делеции на жизнеспособность штамма 1-D623. Для этого клетки штамма 1-D623 и контрольного штамма (D623) выращивали в жидкой среде YEPD в течение 4 часов, далее их высевали на твердые среды в виде серии разведений.

Сравнение роста штамма $\Delta xrn1$ и исходного штамма D623 показало, что делеция гена *XRN1* не влияла на его жизнеспособность, но незначительно снижала скорость роста (рисунок 21а, б).

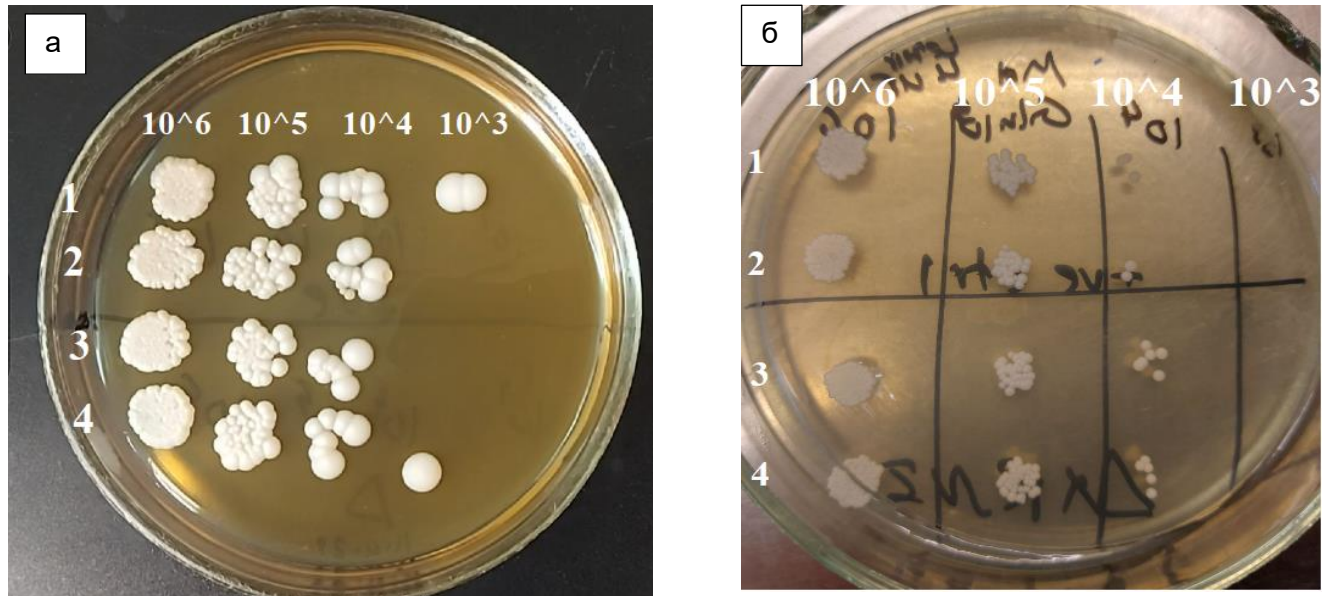


Figure 21. Рост дрожжей *S. cerevisiae* на среде YEPD (а) и Md (б).

1, 2 - штамм D623 (*ura3 lys2 leu2 trp1*); 3, 4 – штамм 1-D623 (*ura3 lys2 leu2 trp1 Δxrn1 ZeoR Δxrn*). По 10 мкл клеточной суспензии в последовательном разведении в диапазоне от 10^6 до 10^3 кое/мл наносили на чашку (слева направо для каждого штамма).

Следует отметить, что делеция гена *XRN1* не оказала влияния на стабильность аптамера РНК Вроссоли, по-видимому, аптамер не является субстратом экзонуклеазы *Xrn1*.

Таким образом, при выполнении работы нами было проведена оценка возможности экспрессии последовательности аптамера РНК Вроссоли и его синтеза в клетках дрожжей *S. cerevisiae*. Мы показали, использование экспрессионной кассеты с регулируемым промотором *GAL1* оказалось более оптимальным вариантом. При этом аптамер РНК, синтезированный в клетках дрожжей, принимал нативную

пространственную структуру, о чем свидетельствовала способность связывать флуоресцентный краситель DFHBI-1T. Делеция структурного гена экзонуклеазы *XRNI* незначительно снижала скорость роста мутантного штамма, но не влияла на стабильность аптамера. Синтез аптамера РНК не приводил к снижению жизнеспособности клеток дрожжей-продуцентов, но сопровождался изменением уровня транскрипции 115 генов. Повышение уровня транскрипции наблюдали у 67 генов, а уровень транскрипции 48 генов понижался. Среди генов с измененным уровнем экспрессии были обнаружены гены, кодирующие белки и некоторые виды РНК, синтезируемые РНК-полимеразой II. Отсутствие существенного влияния синтеза аптамера РНК на жизнедеятельность штамма-продуцента позволяет говорить о перспективности использования дрожжей для получения аптамеров РНК.

4. ОБСУЖДЕНИЕ

Аптамеры представляют собой последовательности нуклеиновых кислот, которые можно легко запрограммировать и синтезировать для связывания практически с любым типом целевого химического вещества, называемого «лигандом». Полученные аптамеры нуклеиновых кислот могут образовывать различные трехмерные конформации из-за сил электростатического притяжения и отталкивания, которые варьируют в зависимости от самой последовательности. Благодаря семи торсионным степеням свободы нуклеотидов общая последовательность обладает определенной гибкостью, что позволяет происходить различным трехмерным конформационным изменениям (Adachi *et al.*, 2019).

Разные конформации аптамера обладают разным сродством к определенным лигандам. Аптамеры обычно связываются со своими лигандами-мишенями нековалентными связями, такими как водородные связи, π - π -стэкинг, дисперсионные силы Лондона, ион-ионные взаимодействия и диполь-дипольные взаимодействия.

В последние годы все больший интерес исследователей привлекают аптамеры РНК, это обусловлено тем, что молекулы РНК способны образовывать больше разнообразных пространственных структур, чем ДНК (Guo, 2010; Shanaa O.A. *et al.*, 2021).

Исследования аптамеров значительно ускорились вследствие использования новых технологий в области искусственного интеллекта и машинного обучения при разработке олигонуклеотидной последовательности для целевого лиганда (Xiao *et al.*, 2021; Song *et al.*, 2020).

Аптамеры РНК используют в фундаментальных исследованиях для изучения динамики нуклеиновых кислот в клетке, регуляции экспрессии генов и метаболизма (Dolgoshina, Unrau, 2016; Trachman *et al.*, 2017.).

Аптамеры также могут быть востребованы для решения задач прикладных биологических, экологических исследований и промышленного использования. Учитывая широкий спектр мишеней аптамеров от отдельных ионов до целых клеток, флуоресцентные аптамеры могут использоваться в качестве чувствительного элемента для обнаружения патогенных микроорганизмов и измерения количества определенных молекул (Zou *et al.*, 2019).

Аптамеры могут быть использованы для диагностики заболеваний, выявления белков, ассоциированных с определенными заболеваниями. Благодаря высокой специфичности связывания аптамеров с белками-мишенями, их можно рассматривать в качестве аналога антител (Adachi, Nakamura, 2019). По сравнению с антителами, которые состоят из 20 аминокислот, аптамеры могут иметь более низкую степень изменчивости, аптамеры имеют многочисленные преимущества перед антителами, включая время разработки, меньший размер, минимальный размер мишени, стабильность и способность к повторной укладке (Li *et al.*, 2021; Chen *et al.*, 2023). В результате аптамеры отличаются более низкой иммуногенностью и обладают лучшей способностью проникать в ткани-мишени (Zhu *et al.*, 2016).

Уже разработан ряд аптамеров, которые можно использовать в качестве потенциальных терапевтических средств при злокачественных новообразованиях, заболеваниях крови, инфекционных болезнях (Afrasiabi *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2021; Aljohani *et al.*, 2022). В настоящее время более 18 терапевтических средств на основе олигонуклеотидов, аптамеров были одобрены FDA для лечения различных заболеваний (Gragoudas *et al.*, 2004; Thakur *et al.*; 2022; Egli *et al.*, 2023). Терапевтические средства для лечения распространенных и редких заболеваний на основе РНК становятся все более популярными из-за различных способов действия, таких как антисмысловое редактирование генома на основе CRISPR-Cas, регуляция экспрессии генов, опосредованная РНК-интерференцией, мРНК-вакцины и РНК-аптамеры (Zhu *et al.*, 2022).

Для широкого применения аптамеров РНК необходимо разработать доступные и экономичные способы их получения.

Современные методы получения олигонуклеотидов РНК, в основном, основаны на химическом синтезе или используют систему транскрипции *in vitro* (IVT) (Josephson *et al.*, 1984). В IVT последовательность ДНК, кодирующую продукт РНК, клонируют под контролем промотора, распознаваемого ДНК-зависимой РНК-полимеразой фага, обычно T7, T3 или SP6 (Beckert, Masquida, 2011). Проблемой IVT и химического синтеза является низкий выход, высокая стоимость, наличие коротких abortивных транскриптов, необходимость очистки для защиты транскриптов РНК от деградации (Kao *et al.*, 1999; Pregeljc *et al.*, 2023). Одним из возможных способов повышения качества и количества аптамеров РНК является использование организмов-продуцентов.

В 2007 г. были получены штаммы бактерий *E. coli*, синтезирующие рекомбинантные транскрипты РНК. При этом авторы маскировали последовательность рекомбинантной РНК каркасом тРНК, чтобы избежать ее деградации эндогенной РНКазой *E. coli* (Ponchon, Dardel, 2007). Другой подход к стабилизации структур рекомбинантной РНК, продуцируемых *E. coli in vivo*, заключался в циркуляризации транскрипта РНК для повышения устойчивости к нуклеазам (Umekage, Kikuchi, 2009; Ortolá, Daròs, 2022). Однако ни один из двух вариантов не подходит для крупномасштабного производства наноструктур РНК, поскольку способы защиты рекомбинантной РНК от деградации будут мешать получению желаемой конформации, а также потребуется обработка полученного транскрипта РНКазой H для удаления фланкирующих фрагментов тРНК (Ponchon, Dardel, 2007).

В 2017 г. сообщалось о попытках крупномасштабного получения наноструктур нуклеиновых кислот *in vivo* в клетках бактерий, но при этом требовались дополнительные процедуры по экстракции рекомбинантной РНК из клеток *E. coli* и дальнейшей термической и химической обработке для получения нужной

конформации (Praetorius *et al.*, 2017). В 2018 году появились сведения о синтезе сложных трехмерных РНК-наноструктур в *E. coli*, которые обладали термодинамической стабильностью и подходящими кинетическими свойствами. Авторы публикации разработали последовательность РНК, которая обеспечивала сначала формирование вторичной структуры - шпилек и их топологическую стабильность, а затем неспаренные нуклеотиды обеспечивали образование третичной структуры (Li *et al.*, 2018). Работы по созданию организмов-продуцентов аптамеров и наночастиц РНК пока ограничиваются использованием бактерий *E. coli* (Li *et al.*, 2018).

Использование в качестве организмов-продуцентов эукариотических организмов представляет особый интерес, т.к. позволяет не только усовершенствовать технологию получения аптамеров РНК *in vivo*, но и выяснить их функционирование в клетках эукариот.

Выбор дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* в качестве продуцента аптамеров РНК был обусловлен несколькими причинами. Дрожжи являются эукариотическим микроорганизмом, их легко культивировать, они безопасны для работы в лаборатории и не требуют дорогостоящих питательных сред, для изучения этого организма разработаны генетические и биохимические методы. Еще более важной характеристикой дрожжей *S. cerevisiae* является то, что они имеют сходство во многих ключевых процессах с млекопитающими. Поэтому многие исследователи предлагали проверить способность *S. cerevisiae* производить наноструктуры РНК в больших масштабах (Drinnenberg *et al.*, 2009; Sasano *et al.*, 2017; Duman-Scheel, 2019; Chen *et al.*, 2022).

Одной из интересных особенностей дрожжей *S. cerevisiae* является отсутствие системы РНК-интерференции, что может способствовать накоплению транскриптов рекомбинантных дцРНК *in vivo* (Duman-Scheel, 2019). В клетках с механизмом РНК-интерференции дцРНК распознаются и превращаются в более мелкие транскрипты siRNA, которые далее могут участвовать в подавлении транскрипции определенных

генов и трансляции мРНК. Эта функция является ключевой для производства продуктов рекомбинантной РНК, включая аптамеры, мРНК-вакцины и даже сложные структуры РНК.

При разработке подходов для синтеза аптамеров РНК в клетках дрожжей в качестве репортерной молекулы использовали аптамер РНК Broccoli. Этот аптамер представляет короткую молекулу РНК, которая за счёт своей вторичной структуры взаимодействует с флуоресцентным красителем DFHBI-1T и активирует его (Quellet, 2016; рисунок 2). Появление флуоресценции является доказательством синтеза функционального аптамера с нативной вторичной структурой.

Аптамер Broccoli в комплексе с флуоресцентным красителем DFHBI-1T широко используется для визуализации молекул РНК в живых клетках. Интересной особенностью данного аптамера является возможность его разделения на две части, которые по отдельности не связываются с красителем DFHBI-1T, но при взаимодействии друг с другом способны собираться в функциональный аптамер (Schneider *et al.*, 2004). Для усиления интенсивности сигнала флуоресценции использовали тандемный повтор аптамера РНК Broccoli (Zinskie *et al.*, 2018).

На основе последовательности, кодирующей аптамер Broccoli, мы получили плазмиды, содержащие различные варианты экспрессионных кассет, обеспечивающих синтез полноразмерного аптамера в клетках дрожжей:

Первый вариант экспрессионной кассеты был основан на применении промотора гена *SNR52*, распознаваемого РНК-полимеразой III, и терминатора гена *SUP4*. Для получения экспрессионной кассеты PSNR52-x2Broccoli-SUP4 использовали несколько последовательных ПЦР с праймерами, содержащими перекрывающиеся последовательности. Полученную экспрессионную кассету PSNR52-xBroccoli-SUP4T клонировали в дрожжевой плазмиде pYES2 и полученной плазмидой pYES2-PSNR-Br-TS трансформировали дрожжи (рисунки 9, 10).

Второй вариант экспрессионной кассеты была основан на применении промотора гена *GAL1*, распознаваемого РНК-полимеразой II, и терминатора гена

CYC1. Промотор гена *GAL1* позволил обеспечить синтез аптамера, строго регулируемый в зависимости от источника углерода в среде. При наличии глюкозы в среде данный промотор репрессирован, а его индукция наблюдается в среде с галактозой. Характерной особенностью молекул РНК, транскрибируемых РНК-полимеразой II является наличие протяжённых 5' и 3' нетранслируемых областей и модификация концов (кэпирование и полиаденилирование). Чтобы обеспечить синтез молекул РНК с заданными 5' и 3' концами в состав кассеты экспрессии были введены последовательности рибозимов, фланкирующие последовательность аптамера Broccoli (рисунок 3). Рибозим Hammerhead, находящийся с 5' конца Broccoli, и HDV рибозим на 3' конце обеспечили корректное выщепление последовательности аптамера из первичной молекулы РНК, о чем свидетельствовало появление флуоресценции при взаимодействии синтезированного аптамера с красителем (рисунок 11А, В).

Для получения экспрессионной кассеты PGAL1-*HH*-x2Broccoli-HDV-*CYC1T* использовали несколько последовательных ПЦР с праймерами, содержащими перекрывающиеся последовательности (рисунок 5). Далее полученную экспрессионную кассету клонировали в дрожжевой плазмиде pYES2, полученной плазмидой pYES2-PGAL-Br-TC трансформировали дрожжи (рисунки 6, 7, 8)

Ранее был предложен вариант синтеза аптамера РНК в клетках дрожжей с использованием РНК-полимеразы фага T4 (Dower, Rosbash, 2002). Мы не использовали этот вариант в связи с тем, что в этом случае, сначала нужно было получить клетки дрожжей, синтезирующие гетерологичную РНК-полимеразу фага T4. Таким образом полученные в дальнейшем трансформанты дрожжей должны будут синтезировать не только аптамеры РНК, но и гетерологичный белок. Это может оказаться серьезной метаболической нагрузкой и отрицательно сказаться на жизнеспособности клеток-продуцентов.

При трансформации обоими вариантами полученных нами экспрессионных плазмид pYES2-PSNR-Br-TS и pYES2-PGAL-Br-TC были получены штаммы дрожжей

D623 (pYES2-PSNR-Br-TS) и D623 (pYES2-PGAL-Br-TC), синтезирующие аптамер РНК *Broccoli*, о чем свидетельствовало появление флуоресценции после добавления красителя DFHBI-1T к клеткам трансформантов (рисунок 11А, В).

Уровень флуоресценции, наблюдаемый у трансформанта D623 (pYES2-PGAL-Br-TC) был значительно выше, чем у трансформанта D623 (pYES2-PSNR-Br-TS). Мы проводили двухстадийное культивирование этого штамма, сначала на среде с глюкозой в качестве источника углерода происходило только наращивание биомассы, промотор в этих условиях репрессирован, транскрипции аптамера не происходит. Только при переносе выросших дрожжей в новую среду с галактозой в качестве источника углерода происходила активация промотора и начиналась транскрипция аптамера. Такая схема культивирования продуцентов позволяет снизить метаболическую нагрузку на дрожжевую клетку. В случае трансформанта D623 (pYES2-PSNR-Br-TS) экспрессия аптамера начинается сразу, возможно, отрицательно влияя на рост и метаболические процессы дрожжей. Кроме того, в этой экспрессионной кассете транскрипцию последовательности аптамера контролирует промотор гена *SNR52*, а не сильный промотор гена *GAL1*. Таким образом, было продемонстрировано, что дрожжи способны синтезировать функциональные аптамеры РНК, а регулируемая экспрессия последовательности аптамера обеспечивает более высокий уровень синтеза аптамера *Broccoli* в клетках дрожжей *S. cerevisiae*.

Используя в качестве продуцента аптамера РНК *Broccoli* штамм дрожжей с делецией структурного гена экзонуклеазы *XRNI*, которая, в частности, играет ключевую роль в распаде мРНК, мы надеялись увеличить выход аптамера за счет повышения его стабильности. Делеция этого гена не оказала влияния на жизнеспособность штамма 1-D623, но и не привела к желаемому результату – повышению стабильности аптамера. Возможно, экзонуклеаза Xrn1 не принимает участия в деградации коротких РНК с четко выраженной вторичной структурой.

Как было показано при анализе транскриптома дрожжей, синтезирующих аптамер РНК, происходит изменение уровня РНК 115 генов (таблица П1). У 67 генов наблюдали повышение уровня РНК, у 48 генов - снижение количества РНК. При этом исследованные гены кодировали не только белки, но и разные виды РНК. Среди генов со сниженным уровнем мРНК оказались структурные гены некоторых рибосомных белков, которые вовлечены в процессинг рРНК и созревание рибосом. Можно предположить, что синтез репортерной конструкции, содержащей большое количество вторичных структур, каким-то образом влияет на процессинг молекул рРНК, что приводит к изменению экспрессии генов, вовлеченных в него на разных этапах.

Однако более вероятной выглядит гипотеза, согласно которой при синтезе репортерной конструкции нарушаются процессы созревания и стабильность исследуемых мРНК рибосомных белков, других мРНК, а также мяРНК и мякРНК. Выявленный набор разнообразных генов, для которых изменяется количество соответствующих РНК, связан общими этапами и компонентами процессинга РНК. Так было обнаружено, что ряд исследуемых генов рибосомных белков содержит интрон. Это гены *RPS11A*, *RPS23B*, *RPS27B*, *RPL14A*, *RPL18A*. При этом для пре-мРНК гена *RPL18A* ранее было показано, что его интрон формирует вторичные структуры в виде шпилек. Эти вторичные структуры являются мишенью РНКазы III, кодируемой геном *RNT1* (Danin-Kreiselman *et al.*, 2003).

РНКазы III также вовлечена и в процессинг 3'конца предшественников ряда мяРНК. В данной работе одну из групп генов, у которых уровень РНК изменялся при синтезе репортерной конструкции с аптамером Вроссоли, составили гены, связанные со сплайсингом мРНК. В частности, речь идет об увеличении уровня РНК генов, кодирующих ключевые мяРНК - *SNR19* и *LSR1*. Ген *SNR19* кодирует мяРНК U1, которая обеспечивает распознавание границы между интроном и 5' экзоном (Kretzner *et al.*, 1987). Ген *LSR1* кодирует мяРНК U2, которая связывается с точкой ветвления в составе сплайсируемого интрона (Riedel *et al.*, 1986). Также увеличивался уровень

РНК гена *PRP46*, кодирующего один из компонентов белкового комплекса NTC (NineTeen associated Complex) (Albers *et al.*, 2003). Данный комплекс начинает работать в составе сплайсосомы во время и после высвобождения U4 мяРНК. Он стабилизирует U5 и U6 мяРНК во время последующих каталитических этапов работы сплайсосомы, при которых происходит вырезание интрона в ходе двух последовательных реакций трансэтерификации (Chan *et al.*, 2003; Chan, Cheng 2005).

Следует отметить, что предшественники мяРНК U1 и U2 являются продуктами РНК-полимеразы II, поэтому они подвергаются соответствующим модификациям на 5' и 3' концах. При пробоподготовке для транскриптного анализа использовали набор, обеспечивающий синтез кДНК на основе олиго-дТ праймера, который присоединяется к поли-А последовательности на 3' конце. Таким образом, полученные данные об увеличении уровня РНК генов *SNR19* и *LSR1* могут свидетельствовать не только об увеличении их экспрессии, но и о возможном нарушении процессинга их 3' концов, приводящем к накоплению полиаденилированных незрелых РНК.

Действительно, ранее было продемонстрировано, что нарушение в работе гена *RNT1* приводят к накоплению не полностью процессированных, но функциональных мяРНК U2 сохраняющих 3' конец с поли-А последовательностью (Abou Elela, Ares, 1998). Это очень хорошо сочетается с результатами данной работы, в которой было продемонстрировано повышение уровней полиаденилированных незрелых мяРНК U1 и U2, кодируемых генами *SNR19* и *LSR1*. Можно предположить, что синтез репортерной конструкции, содержащей большое количество вторичных структур, влияет на работу РНКазы III, например, отвлекая на себя часть фермента. Это, в свою очередь, приводит к нарушению процессинга и стабильности ряда молекул РНК, в созревании которых эта РНКаза вовлечена. И в результате проявляются эффекты, сходные с эффектами, наблюдаемыми при нарушении работы гена *RNT1*. В частности, накопление полиаденилированных предшественников мяРНК (Abou Elela, Ares, 1998).

В ответ на синтез репортерной конструкции возрастало количество РНК генов, кодирующих малые ядрышковые РНК (мякРНК), вовлеченные в созревание рибосомных РНК (Smarsky, Fournier, 1999). Это касается генов мякРНК, содержащих H/ACA последовательность (H/ACA-box) - *SNR46* и *SNR49*. Эти мякРНК обеспечивают образование псевдоуридинов в определенных положениях созревающих рибосомных РНК (рисунок 13 В) (Ni *et al.*, 1997). Также повышается активность гена *SNR40*, кодирующего мякРНК с C/D последовательностью, которая участвует в 2'-О-метилировании определенных нуклеотидов рРНК (рисунок 13 В) (Smarsky, Fournier, 1999; Lowe, Eddy, 1999). Это происходит на фоне снижения активности гена *NOP56*, кодирующего один из важнейших компонентов комплекса белков и соответствующих мякРНК, который осуществляет 2'-О-метилирование (Gautier *et al.*, 1997).

Для исследуемых мякРНК характерно разное расположение мишеней в РНК и осуществление различных модификаций. Это позволяет предположить, что наблюдаемое увеличение уровня полиаденилированных предшественников этих мякРНК связано не с одинаковым изменением экспрессии соответствующих генов в ответ на синтез репортерной конструкции в клетках. Более вероятной выглядит гипотеза, согласно которой при синтезе больших количеств конструкции с аптамером нарушаются процессы созревания и стабильность исследуемых мякРНК. Действительно мишенями РНКазы III являются также предшественники различных мякРНК (Chanfreau *et al.*, 1998), в том числе snR40 и snR46. Нарушение их процессинга из-за отвлечения активности РНКазы III при синтезе больших количеств молекул РНК с репортерной конструкцией может объяснить наблюдаемое накопление их полиаденилированных предшественников. Аналогично тому, как это происходит для рассмотренной выше мяРНК U2 при нарушении работы РНКазы III (Abou Elela, Ares, 1998).

РНКазы III участвует в процессинге и деградации самых разнообразных молекул РНК (Gagnon *et al.*, 2015). Показано ее участие в регуляции синтеза субъединиц

теломеразы. Нарушение работы гена *RNT1* у дрожжей *S. cerevisiae* приводит к повышению экспрессии генов теломеразы, в частности гена *TLC1*, кодирующего её РНК-субъединицу (Larose *et al.*, 2007). Это очень хорошо сочетается с результатами данной работы, которые демонстрируют, что синтез в клетках дрожжей репортерной конструкции с аптамером Broccoli, приводит к увеличению количества теломеразной РНК, кодируемой геном *TLC1*.

РНКаза III участвует в защите клеток от избыточных концентраций ионов железа. При избытке железа она распознает и разрезает шпильки в мРНК генов, вовлеченных в его транспорт внутрь клетки – *FIT1-3*, *ARN1-4*, *FRE1-2* (Martínez-Pastor *et al.*, 2013). В результате происходит быстрая деградация соответствующих транскриптов. В данной работе не наблюдали значительных изменений в уровнях мРНК этих генов. Однако, наблюдали увеличение уровня мРНК гена *FRA1* в ответ на синтез больших количеств репортерных РНК с аптамером. Кодируемый этим геном белок входит в состав комплекса, который подавляет транскрипцию генов, обеспечивающих транспорт и метаболизм железа (Kumánovics *et al.*, 2008). В ходе проведенного эксперимента клетки *S. cerevisiae* культивировали в среде с достаточным количеством железа. Можно предположить, что в этих условиях нарушение работы регуляторного механизма с участием РНКазы III, приводящего к деградации транскриптов генов, обеспечивающих транспорт железа в клетку, компенсируется активацией другого механизма с участием белка FraI.

РНКаза III играет важную роль в регуляции синтеза белков клеточной стенки (КС), в ответе клетки на различные стрессорные воздействия, связанные с КС, и в контроле процессов, происходящих с КС в ходе деления клеток (Catala *et al.*, 2012). В нашей работе наблюдается изменение уровней мРНК ряда генов, вовлеченных в биогенез и функционирование КС у *S. cerevisiae*. При синтезе репортерной конструкции с аптамером Broccoli в клетках дрожжей уменьшалось количество мРНК генов *CCW12*, *MUM3* и *CWP2*. Ген *CCW12* кодирует маннопротеин, участвующий в формировании недавно синтезированных участков КС дрожжей (Ragni *et al.*, 2011).

Продукт гена *CWP2* является одним из основных маннопротеинов в составе КС (van der Vaart *et al.*, 1995). Продукт гена *MUM3* работает при образовании внешней оболочки в ходе споруляции (Engebrecht *et al.*, 1998). Таким образом, можно предположить, что синтез аптамера РНК в клетках дрожжей не только изменяет уровень определенных РНК, но и влияет на эффективность работы РНКазы III. Учитывая разнообразие функций и субстратов этого фермента, можно заключить, что РНК-аза III может играть ключевую роль в ответе клетки дрожжей на синтез аптамера РНК.

Несмотря на то, что синтез аптамера РНК приводил к изменению уровня РНК 115 генов, это не сказалось на жизнеспособности штаммов-продуцентов. Поэтому разработанные в настоящей работе подходы к получению функционального аптамера РНК *Brossoli* могут быть в дальнейшем использованы в нанобиотехнологии РНК для синтеза в дрожжах аптамеров с заданной структурой, способных взаимодействовать с определенными лигандами.

5. ВЫВОДЫ

На основании полученных результатов можно сделать следующие выводы:

1. Продемонстрирована принципиальная возможность регулируемого синтеза аптамера РНК Broccoli в клетках дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*.
2. Синтезированный аптамер РНК Broccoli принимает нативную вторичную структуру, о чем свидетельствует связывание с флуорофором DFHBI-1T.
3. Синтез аптамера РНК Broccoli не приводит к снижению жизнеспособности клеток дрожжей-продуцентов, но сопровождается изменением уровня транскрипции ряда генов, контролирующих белки субъединиц рибосомы, а также процессы созревания и стабильность разных РНК.
4. Изменения транскриптома при синтезе аптамера РНК Broccoli подобны изменениям, происходящим при нарушении работы структурного гена РНКазы III, и, возможно, обусловлены изменением спектра субстратов и эффективности работы этого фермента.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 Григоров, А. С., Мазурова, А. С., Салина, Е. Г., Майоров, К. Б. и др. (2017). Роль малых некодирующих РНК NCRV11733 при адаптации микобактерий к стрессу. *Вестник Центрального научно-исследовательского института туберкулеза*, (1), 50-53.
- 2 Шанаа, У. А., Румянцев, А. М., Самбук, Е. В., Падкина, М. В. (2022). Синтез флуоресцентного РНК-аптамера Broccoli в клетках дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. *Экологическая генетика*. 20(4). С. 339–348.
- 3 Abou Elela, S., & Ares, M., Jr (1998). Depletion of yeast RNase III blocks correct U2 3' end formation and results in polyadenylated but functional U2 snRNA. *The EMBO journal*, 17(13), 3738–3746.
- 4 Adachi, T., & Nakamura, Y. (2019). Aptamers: A Review of Their Chemical Properties and Modifications for Therapeutic Application. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 24(23), 4229.
- 5 Afrasiabi, S., Pourhajibagher, M., Raoofian, R., Tabarzad, M., & Bahador, A. (2020). Therapeutic applications of nucleic acid aptamers in microbial infections. *J. Biomedical Sci*, 27(1), 6.
- 6 Albers, M., Diment, A., Muraru, M., Russell, C. S., & Beggs, J. D. (2003). Identification and characterization of Prp45p and Prp46p, essential pre-mRNA splicing factors. *RNA (New York, N.Y.)*, 9(1), 138–150.
- 7 Aljohani, M. M., Cialla-May, D., Popp, J., Chinnappan, R., Al-Kattan, K., & Zourob, M. (2022). Aptamers: Potential Diagnostic and Therapeutic Agents for Blood Diseases. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 27(2), 383.
- 8 Anju, V.T., Siddhardha, B., Dyavaiah, M. (2020). *Saccharomyces cerevisiae*: Model Organism to Evaluate Nanoparticle Toxicity. In: Siddhardha, B., Dyavaiah, M.,

- Kasinathan, K. (eds) Model Organisms to Study Biological Activities and Toxicity of Nanoparticles. Springer, Singapore.
- 9 Aquino-Jarquin, G., & Toscano-Garibay, J. D. (2011). RNA aptamer evolution: two decades of SELEction. *Intern. J. Mol. Sci*, 12(12), 9155–9171.
 - 10 Armitage B. A. (2011). Imaging of RNA in live cells. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 15(6), 806–812.
 - 11 Baker, B. R., Lai, R. Y., Wood, M. S., Doctor, E. H., Heeger, A. J., & Plaxco, K. W. (2006). An electronic, aptamer-based small-molecule sensor for the rapid, label-free detection of cocaine in adulterated samples and biological fluids. *J. Amer. Chem. Soc.*, 128(10), 3138–3139.
 - 12 Barnett J. A. (2007). A history of research on yeasts 10: foundations of yeast genetics. *Yeast (Chichester, England)*, 24(10), 799–845.
 - 13 Bartel, D. P., & Szostak, J. W. (1993). Isolation of new ribozymes from a large pool of random sequences [see comment]. *Science (New York, N.Y.)*, 261(5127), 1411–1418.
 - 14 Bashir, A., Yang, Q., Wang, J., Hoyer, S., Chou, W., McLean, C., Davis, G., Gong, Q., Armstrong, Z., Jang, J., Kang, H., Pawlosky, A., Scott, A., Dahl, G. E., Berndl, M., Dimon, M., & Ferguson, B. S. (2021). Machine learning guided aptamer refinement and discovery. *Nat. Commun.*, 12(1), 2366.
 - 15 Beckert, B., & Masquida, B. (2011). Synthesis of RNA by in vitro transcription. *Meth. Mol. Biol. (Clifton, N.J.)*, 703, 29–41.
 - 16 Besada-Lombana, P. B., McTaggart, T. L., & Da Silva, N. A. (2018). Molecular tools for pathway engineering in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 53, 39–49.
 - 17 Bianchini, M., Radrizzani, M., Brocardo, M. G., Reyes, G. B., Gonzalez Solveyra, C., & Santa-Coloma, T. A. (2001). Specific oligobodies against ERK-2 that recognize both the native and the denatured state of the protein. *J. Immunol. Methods*, 252(1-2), 191–197.

- 18 Bolotin-Fukuhara, M., Dumas, B., & Gaillardin, C. (2010). Yeasts as a model for human diseases. *FEMS yeast research*, *10*(8), 959–960.
- 19 Botstein, D., & Fink, G. R. (2011). Yeast: an experimental organism for 21st Century biology. *Genetics*, *189*(3), 695–704.
- 20 Bouchard, P. R., Hutabarat, R. M., & Thompson, K. M. (2010). Discovery and development of therapeutic aptamers. *Annu. Rev. Pharmacol.Toxico.*, *50*, 237–257.
- 21 Bouhedda, F., Autour, A., & Ryckelynck, M. (2017). Light-Up RNA Aptamers and Their Cognate Fluorogens: From Their Development to Their Applications. *Int. J. Mol. Sci.*, *19*(1), 44.
- 22 Breaker, R. R., & Joyce, G. F. (2014). The expanding view of RNA and DNA function. *Chem. & Biol.*, *21*(9), 1059–1065.
- 23 Breinig, F., Heintel, T., Schumacher, A., Meyerhans, A., & Schmitt, M. J. (2003). Specific activation of CMV-primed human T lymphocytes by cytomegalovirus pp65 expressed in fission yeast. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, *38*(3), 231–239.
- 24 Buglak, A.A., Samokhvalov, A.V., Zherdev, A.V. and Dzantiev, B.B., 2020. Methods and applications of in silico aptamer design and modeling. *Int. J. Mol. Sci.*, *21*(22), p.8420.
- 25 Burgess, S. M., Powers, T., & Mell, J. C. (2017). Budding Yeast *Saccharomyces Cerevisiae* as a Model Genetic Organism. In: eLS. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester.
- 26 Burke, D. H., & Willis, J. H. (1998). Recombination, RNA evolution, and bifunctional RNA molecules isolated through chimeric SELEX. *RNA (New York, N.Y.)*, *4*(9), 1165–1175.
- 27 Cai, R., Chen, X., Zhang, Y., Wang, X. and Zhou, N., 2023. Systematic bio-fabrication of aptamers and their applications in engineering biology. *Systems Microbiol. Biomanufact.*, *3*(2), pp.223-245.
- 28 Carlson B. (2007). Aptamers: the new frontier in drug development?. *Biotechnol. Healthcare*, *4*(2), 31–36.

- 29 Catala, M., Aksouh, L., & Abou Elela, S. (2012). RNA-dependent regulation of the cell wall stress response. *Nucl. Acids Res.*, *40*(15), 7507–7517.
- 30 Cejka, D., Losert, D., & Wacheck, V. (2006). Short interfering RNA (siRNA): tool or therapeutic? *Clinical science (London, England): 1979*, *110*(1), 47–58.
- 31 Chan, S. P., & Cheng, S. C. (2005). The Prp19-associated complex is required for specifying interactions of U5 and U6 with pre-mRNA during spliceosome activation. *J. Biol. Chem.*, *280*(35), 31190–31199.
- 32 Chan, S. P., Kao, D. I., Tsai, W. Y., & Cheng, S. C. (2003). The Prp19p-associated complex in spliceosome activation. *Science (New York, N.Y.)*, *302*(5643), 279–282.
- 33 Chanfreau, G., Legrain, P., & Jacquier, A. (1998). Yeast RNase III as a key processing enzyme in small nucleolar RNAs metabolism. *J. Mol. Biol.*, *284*(4), 975–988.
- 34 Chen, A., & Yang, S. (2015). Replacing antibodies with aptamers in lateral flow immunoassay. *Biosensors & bioelectronics*, *71*, 230–242.
- 35 Chen, H., Wang, J., Li, Q., Xu, X., Niu, C., Zheng, F., & Liu, C. (2022). Fed-Batch Fermentation of *Saccharomyces pastorianus* with High Ribonucleic Acid Yield. *Foods (Basel, Switzerland)*, *11*(18), 2742.
- 36 Chen, Z., Hu, L., Zhang, B. T., Lu, A., Wang, Y., Yu, Y., & Zhang, G. (2021). Artificial Intelligence in Aptamer-Target Binding Prediction. *Int. J. Mol. Sci.*, *22*(7), 3605.
- 37 Chen, Z., Luo, H., Gubu, A., Yu, S., Zhang, H., Dai, H., Zhang, Y., Zhang, B., Ma, Y., Lu, A., & Zhang, G. (2023). Chemically modified aptamers for improving binding affinity to the target proteins *via* enhanced non-covalent bonding. *Front. Cell Development. Biol.*, *11*, 1091809.
- 38 Chen, Z., Yoo, S. H., & Takahashi, J. S. (2018). Development and Therapeutic Potential of Small-Molecule Modulators of Circadian Systems. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, *58*, 231–252.

- 39 Chushak, Y., & Stone, M. O. (2009). In silico selection of RNA aptamers. *Nucl. Acids Res.*, *37*(12), e87.
- 40 Climent-Catala, A., Ouldrige, T. E., Stan, G. B. V., & Bae, W. (2022). Building an RNA-based toggle switch using inhibitory RNA aptamers. *ACS Synth. Biol.*, *11*(2), 562-569.
- 41 Coulter, L. R., Landree, M. A., & Cooper, T. A. (1997). Identification of a new class of exonic splicing enhancers by in vivo selection. *Mol. Cell. Biol.*, *17*(4), 2143–2150.
- 42 Cox, J. C., Hayhurst, A., Hesselberth, J., Bayer, T. S., Georgiou, G., & Ellington, A. D. (2002). Automated selection of aptamers against protein targets translated in vitro: from gene to aptamer. *Nucl. Acids Res.*, *30*(20), e108-e108.
- 43 Danin-Kreiselman, M., Lee, C. Y., & Chanfreau, G. (2003). RNase III-mediated degradation of unspliced pre-mRNAs and lariat introns. *Mol. Cell*, *11*(5), 1279–1289.
- 44 Demain, A. L., & Vaishnav, P. (2009). Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnol. Adv.*, *27*(3), 297–306.
- 45 Dinis Ano Bom, A. P., da Costa Neves, P. C., Bonacossa de Almeida, C. E., Silva, D., & Missailidis, S. (2019). Aptamers as Delivery Agents of siRNA and Chimeric Formulations for the Treatment of Cancer. *Pharmaceutics*, *11*(12), 684.
- 46 Dinman J. D. (2009). The eukaryotic ribosome: current status and challenges. *J. Biol. Chem.*, *284*(18), 11761–11765.
- 47 Dolgosheina, E. V., & Unrau, P. J. (2016). Fluorophore-binding RNA aptamers and their applications. *Wiley interdiscip. Rev.. RNA*, *7*(6), 843–851.
- 48 Dougherty, C. A., Cai, W., & Hong, H. (2015). Applications of aptamers in targeted imaging: state of the art. *Curr. Topics Med. Chem.*, *15*(12), 1138–1152.
- 49 Dower, K., & Rosbash, M. (2002). T7 RNA polymerase-directed transcripts are processed in yeast and link 3' end formation to mRNA nuclear export. *RNA (New York, N.Y.)*, *8*(5), 686–697.

- 50 Drinnenberg, I. A., Weinberg, D. E., Xie, K. T., Mower, J. P., Wolfe, K. H., Fink, G. R., & Bartel, D. P. (2009). RNAi in budding yeast. *Science (New York, N.Y.)*, 326(5952), 544–550.
- 51 Duman-Scheel M. (2019). *Saccharomyces cerevisiae* (Baker's Yeast) as an Interfering RNA Expression and Delivery System. *Curr. drug targets*, 20(9), 942–952.
- 52 Dunn, M. R., Jimenez, R. M., & Chaput, J. C. (2017). Analysis of aptamer discovery and technology. *Nat. Rev. Chem.*, 1(10), 0076.
- 53 Duport, C., Spagnoli, R., Degryse, E., & Pompon, D. (1998). Self-sufficient biosynthesis of pregnenolone and progesterone in engineered yeast. *Nature biotechno.*, 16(2), 186–189.
- 54 Eckert-Boulet, N., Rothstein, R., & Lisby, M. (2011). Cell biology of homologous recombination in yeast. *Meth. Mol. Biol. (Clifton, N.J.)*, 745, 523–536.
- 55 Egli, M., & Manoharan, M. (2023). Chemistry, structure and function of approved oligonucleotide therapeutics. *Nucl. Acids Res.*, 51(6), 2529–2573.
- 56 Einav, T., & Bloom, J. D. (2020). When two are better than one: Modeling the mechanisms of antibody mixtures. *PLoS Comput. Biol.*, 16(5), e1007830.
- 57 Ellington, A. D., & Szostak, J. W. (1990). In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature*, 346(6287), 818–822.
- 58 Ellington, A. D., & Szostak, J. W. (1992). Selection in vitro of single-stranded DNA molecules that fold into specific ligand-binding structures. *Nature*, 355(6363), 850–852.
- 59 Engebrecht, J., Masse, S., Davis, L., Rose, K., & Kessel, T. (1998). Yeast meiotic mutants proficient for the induction of ectopic recombination. *Genetics*, 148(2), 581–598.
- 60 Engel, S. R., Dietrich, F. S., Fisk, D. G., Binkley, G., Balakrishnan, R., Costanzo, M. C., Dwight, S. S., Hitz, B. C., Karra, K., Nash, R. S., Weng, S., Wong, E. D., Lloyd, P., Skrzypek, M. S., Miyasato, S. R., Simison, M., & Cherry, J. M. (2014). The

- reference genome sequence of *Saccharomyces cerevisiae*: then and now. *G3 (Bethesda, Md.)*, 4(3), 389–398.
- 61 Escamilla-Gutiérrez, A., Ribas-Aparicio, R. M., Córdova-Espinoza, M. G., & Castelán-Vega, J. A. (2021). *In silico* strategies for modeling RNA aptamers and predicting binding sites of their molecular targets. *Nucleosides, nucleotides & nucleic acids*, 40(8), 798–807.
- 62 Espah Borujeni, A., Mishler, D. M., Wang, J., Huso, W., & Salis, H. M. (2016). Automated physics-based design of synthetic riboswitches from diverse RNA aptamers. *Nucl. Acids Res.*, 44(1), 1-13.
- 63 Eulberg, D., Buchner, K., Maasch, C., & Klussmann, S. (2005). Development of an automated in vitro selection protocol to obtain RNA-based aptamers: identification of a biostable substance P antagonist. *Nucl. Acids Res.*, 33(4), e45.
- 64 Fadhel, M., Patel, S., Liu, E., Levitt, M., & Asif, A. (2018). *Saccharomyces cerevisiae* fungemia in a critically ill patient with acute cholangitis and long term probiotic use. *Med. Mycol. case rep.*, 23, 23–25.
- 65 Felletti, M., & Hartig, J. S. (2017). Ligand-dependent ribozymes. *Wiley interdisciplinary reviews. RNA*, 8(2), 10.1002/wrna.1395.
- 66 Filleur, S., Courtin, A., Ait-Si-Ali, S., Guglielmi, J., Merle, C., Harel-Bellan, A., Clézardin, P., & Cabon, F. (2003). SiRNA-mediated inhibition of vascular endothelial growth factor severely limits tumor resistance to antiangiogenic thombospondin-1 and slows tumor vascularization and growth. *Cancer res.*, 63(14), 3919–3922.
- 67 Filonov, G. S., Kam, C. W., Song, W., & Jaffrey, S. R. (2015). In-gel imaging of RNA processing using broccoli reveals optimal aptamer expression strategies. *Chem. & Biol.*, 22(5), 649–660.
- 68 Filonov, G. S., Moon, J. D., Svensen, N., & Jaffrey, S. R. (2014). Broccoli: rapid selection of an RNA mimic of green fluorescent protein by fluorescence-based selection and directed evolution. *J. Amer. Chem. Soc.*, 136(46), 16299–16308.

- 69 Gagnon, J., Lavoie, M., Catala, M., Malenfant, F., & Elela, S. A. (2015). Transcriptome wide annotation of eukaryotic RNase III reactivity and degradation signals. *PLoS genetics*, *11*(2), e1005000.
- 70 Gamalinda, M., & Woolford, J. L., Jr (2014). Deletion of L4 domains reveals insights into the importance of ribosomal protein extensions in eukaryotic ribosome assembly. *RNA (New York, N.Y.)*, *20*(11), 1725–1731.
- 71 Garcia, J. F., & Parker, R. (2015). MS2 coat proteins bound to yeast mRNAs block 5' to 3' degradation and trap mRNA decay products: implications for the localization of mRNAs by MS2-MCP system. *RNA (New York, N.Y.)*, *21*(8), 1393–1395.
- 72 García-Gómez, J. J., Fernández-Pevida, A., Lebaron, S., Rosado, I. V., Tollervey, D., Kressler, D., & de la Cruz, J. (2014). Final pre-40S maturation depends on the functional integrity of the 60S subunit ribosomal protein L3. *PLoS genetics*, *10*(3), e1004205.
- 73 Gautier, T., Bergès, T., Tollervey, D., & Hurt, E. (1997). Nucleolar KKE/D repeat proteins Nop56p and Nop58p interact with Nop1p and are required for ribosome biogenesis. *Mol. Cell. Biol.*, *17*(12), 7088–7098.
- 74 Gavrillov, K., & Saltzman, W. M. (2012). Therapeutic siRNA: principles, challenges, and strategies. *The Yale J. Biol. Med.*, *85*(2), 187–200.
- 75 Gazda, H. T., Sheen, M. R., Vlachos, A., Choismel, V., O'Donohue, M. F., Schneider, H., Darras, N., Hasman, C., Sieff, C. A., Newburger, P. E., Ball, S. E., Niewiadomska, E., Matysiak, M., Zaucha, J. M., Glader, B., Niemeyer, C., Meerpohl, J. J., Atsidaftos, E., Lipton, J. M., Gleizes, P. E., ... Beggs, A. H. (2008). Ribosomal protein L5 and L11 mutations are associated with cleft palate and abnormal thumbs in Diamond-Blackfan anemia patients. *Amer. J. Hum. Gen.*, *83*(6), 769–780.
- 76 Giangrande, P. H., de Franciscis, V., & Rossi, J. J. (Eds.). (2022). *RNA Therapeutics: The Evolving Landscape of RNA Therapeutics*. Academic Press.
- 77 Goddard, M. R., & Greig, D. (2015). *Saccharomyces cerevisiae*: a nomadic yeast with no niche?. *FEMS Yeast Res.*, *15*(3), fov009.

- 78 Goffeau, A., Barrell, B. G., Bussey, H., Davis, R. W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J. D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E. J., Mewes, H. W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H., & Oliver, S. G. (1996). Life with 6000 genes. *Science (New York, N.Y.)*, 274(5287), 546–567.
- 79 Goldsworthy, V., LaForce, G., Abels, S., & Khisamutdinov, E. F. (2018). Fluorogenic RNA Aptamers: A Nano-platform for Fabrication of Simple and Combinatorial Logic Gates. *Nanomaterials (Basel, Switzerland)*, 8(12), 984.
- 80 Grabow, W. W., Zakrevsky, P., Afonin, K. A., Chworos, A., Shapiro, B. A., & Jaeger, L. (2011). Self-assembling RNA nanorings based on RNAI/II inverse kissing complexes. *Nano letters*, 11(2), 878–887.
- 81 Gragoudas, E. S., Adamis, A. P., Cunningham, E. T., Jr, Feinsod, M., Guyer, D. R., & VEGF Inhibition Study in Ocular Neovascularization Clinical Trial Group (2004). Pegaptanib for neovascular age-related macular degeneration. *The New England J.Med.*, 351(27), 2805–2816.
- 82 Guan, B., & Zhang, X. (2020). Aptamers as Versatile Ligands for Biomedical and Pharmaceutical Applications. *Intern. J. Nanomed.*, 15, 1059–1071.
- 83 Guo, S., Piao, X., Li, H., & Guo, P. (2018). Methods for construction and characterization of simple or special multifunctional RNA nanoparticles based on the 3WJ of phi29 DNA packaging motor. *Methods (San Diego, Calif.)*, 143, 121–133.
- 84 Guo, X., Zhao, B., Zhou, X., Ni, X., Lu, D., Chen, T., Chen, Y., & Xiao, D. (2020). Increased RNA production in *Saccharomyces cerevisiae* by simultaneously overexpressing FHL1, IFH1, and SSF2 and deleting HRP1. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 104(18), 7901–7913.
- 85 Guthrie C., Fink G. (1991) Guide to yeast genetics and molecular biology. Volume 194, pp. 3-933. Academic Press; 1st edition ISBN-10:0123106702
- 86 Hahn, S., & Young, E. T. (2011). Transcriptional regulation in *Saccharomyces cerevisiae*: transcription factor regulation and function, mechanisms of initiation, and roles of activators and coactivators. *Genetics*, 189(3), 705–736.

- 87 Hanahan D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J.Mol.Biol.*, 166(4), 557–580.
- 88 Hassanzadeh, L., Chen, S., & Veedu, R. N. (2018). Radiolabeling of Nucleic Acid Aptamers for Highly Sensitive Disease-Specific Molecular Imaging. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, 11(4), 106.
- 89 Hoagland M. (1996). Biochemistry or molecular biology? the discovery of 'soluble RNA'. *Trends in Biochem. Sci.*, 21(2), 77–80.
- 90 Hobl, B., Hock, B., Schneck, S., Fischer, R., Mack, M. (2013). Bacteriophage T7 RNA polymerase-based expression in *Pichia pastoris*. *Protein Expr. Purif.* 92(1), 100–104.
- 91 Hocine, S., Raymond, P., Zenklusen, D., Chao, J. A., & Singer, R. H. (2013). Single-molecule analysis of gene expression using two-color RNA labeling in live yeast. *Nature methods*, 10(2), 119–121.
- 92 Homann, M., & Göringer, H. U. (1999). Combinatorial selection of high affinity RNA ligands to live African trypanosomes. *Nucl. Acids Res.*, 27(9), 2006–2014.
- 93 Hon, J., Martínek, T., Zendulka, J., & Lexa, M. (2017). pqsfinder: an exhaustive and imperfection-tolerant search tool for potential quadruplex-forming sequences in R. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 33(21), 3373–3379.
- 94 Hoogenboom H. R. (2005). Selecting and screening recombinant antibody libraries. *Nat.Biotech.*, 23(9), 1105–1116.
- 95 Huang, C. J., Lin, H. I., Shiesh, S. C., & Lee, G. B. (2010). Integrated microfluidic system for rapid screening of CRP aptamers utilizing systematic evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX). *Biosensors & bioelectronics*, 25(7), 1761–1766.
- 96 Huang, H., Suslov, N. B., Li, N. S., Shelke, S. A., Evans, M. E., Koldobskaya, Y., ... & Piccirilli, J. A. (2014). A G-quadruplex-containing RNA activates fluorescence in a GFP-like fluorophore. *Nat. Chem. Biol.*, 10(8), 686-691.

- 97 Huang, M., Wang, G., Qin, J., Petranovic, D., & Nielsen, J. (2018). Engineering the protein secretory pathway of *Saccharomyces cerevisiae* enables improved protein production. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *115*(47), E11025–E11032.
- 98 Ivanova E. (2021). Yeasts in nanotechnology-enabled oral vaccine and gene delivery. *Bioengineered*, *12*(1), 8325–8335.
- 99 Iwano, N., Adachi, T., Aoki, K., Nakamura, Y., & Hamada, M. (2022). Generative aptamer discovery using RaptGen. *Nat. Comput. Sci.*, *2*(6), 378-386.
- 100 Jány, B. E., & Kiss, T. (2001). A small nucleolar guide RNA functions both in 2'-O-ribose methylation and pseudouridylation of the U5 spliceosomal RNA. *The EMBO J.*, *20*(3), 541–551.
- 101 Jaffrey S. R. (2018). RNA-Based Fluorescent Biosensors for Detecting Metabolites in vitro and in Living Cells. *Adv. Pharmacol.*, (San Diego, Calif.), *82*, 187–203.
- 102 Jagadeesan, S. K., Potter, T., Al-Gafari, M., Hooshyar, M., Hewapathirana, C. M., Takallou, S., Hajikarimlou, M., Burnside, D., Samanfar, B., Moteshareie, H., Smith, M., & Golshani, A. (2022). Discovery and identification of genes involved in DNA damage repair in yeast. *Gene*, *831*, 146549.
- 103 Jenison, R. D., Gill, S. C., Pardi, A., & Polisky, B. (1994). High-resolution molecular discrimination by RNA. *Science (New York, N.Y.)*, *263*(5152), 1425–1429.
- 104 Jensen, K. B., Atkinson, B. L., Willis, M. C., Koch, T. H., & Gold, L. (1995). Using in vitro selection to direct the covalent attachment of human immunodeficiency virus type 1 Rev protein to high-affinity RNA ligands. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *92*(26), 12220–12224.
- 105 Jiang, Q., Lin, L., & Wang, T. (2008). A new model for apoptosis research: Yeast. *Progr. Biochem. Biophys.*, *35*(4), 361-367.

- 106 Jones, C. I., Zabolotskaya, M. V., & Newbury, S. F. (2012). The 5' → 3' exoribonuclease XRN1/Pacman and its functions in cellular processes and development. *Wiley interdiscipl. Rev. RNA*, 3(4), 455–468.
- 107 Josephson, S., Lagerholm, E., & Palm, G. (1984). Automatic synthesis of oligodeoxynucleotides and mixed oligodeoxynucleotides using the phosphoramidite method. *Acta Chem. Scand. Series B: Org. Chem. Biochem.*, 38(7), 539–545.
- 108 Kachroo, A. H., Vandelloo, M., Greco, B. M., & Abdullah, M. (2022). Humanized yeast to model human biology, disease and evolution. *Disease models & mechanisms*, 15(6), dmm049309.
- 109 Kallert, E., Fischer, T. R., Schneider, S., Grimm, M., Helm, M., & Kersten, C. (2022). Protein-Based Virtual Screening Tools Applied for RNA–Ligand Docking Identify New Binders of the preQ1-Riboswitch. *J. Chem. Inform. Modeling*, 62(17), 4134-4148.
- 110 Kang, K. N., & Lee, Y. S. (2013). RNA aptamers: a review of recent trends and applications. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, 131,153-169.
- 111 Kao, C., Zheng, M., & Rüdissler, S. (1999). A simple and efficient method to reduce nontemplated nucleotide addition at the 3 terminus of RNAs transcribed by T7 RNA polymerase. *RNA (New York, N.Y.)*, 5(9), 1268–1272.
- 112 Karathia, H., Vilaprinyo, E., Sorribas, A., & Alves, R. (2011). *Saccharomyces cerevisiae* as a model organism: a comparative study. *PloS one*, 6(2), e16015.
- 113 Kawakami, J., Imanaka, H., Yokota, Y., & Sugimoto, N. (2000). In vitro selection of aptamers that act with Zn²⁺. *Journal of inorganic biochemistry*, 82(1-4), 197–206.
- 114 Klussmann, S. (Ed.). (2006). *The aptamer handbook: functional oligonucleotides and their applications*. John Wiley & Sons.
- 115 Koirala, D., Shelke, S. A., Dupont, M., Ruiz, S., DasGupta, S., Bailey, L. J., Benner, S. A., & Piccirilli, J. A. (2018). Affinity maturation of a portable Fab-RNA

- module for chaperone-assisted RNA crystallography. *Nucl. Acids Res.*, 46(5), 2624–2635.
- 116 Kolm, C., Cervenka, I., Aschl, U. J., Baumann, N., Jakwerth, S., Krska, R., Mach, R. L., Sommer, R., DeRosa, M. C., Kirschner, A. K. T., Farnleitner, A. H., & Reischer, G. H. (2020). DNA aptamers against bacterial cells can be efficiently selected by a SELEX process using state-of-the art qPCR and ultra-deep sequencing. *Scientific reports*, 10(1), 20917.
- 117 Kowalzik, F., Schreiner, D., Jensen, C., Teschner, D., Gehring, S., & Zepp, F. (2021). mRNA-based vaccines. *Vaccines*, 9(4), 390.
- 118 Kretzner, L., Rymond, B. C., & Rosbash, M. (1987). *S. cerevisiae* U1 RNA is large and has limited primary sequence homology to metazoan U1 snRNA. *Cell*, 50(4), 593–602.
- 119 Kumánovics, A., Chen, O. S., Li, L., Bagley, D., Adkins, E. M., Lin, H., Dingra, N. N., Outten, C. E., Keller, G., Winge, D., Ward, D. M., & Kaplan, J. (2008). Identification of FRA1 and FRA2 as genes involved in regulating the yeast iron regulon in response to decreased mitochondrial iron-sulfur cluster synthesis. *J. Biol. Chem.*, 283(16), 10276–10286.
- 120 Laing, C., & Schlick, T. (2009). Analysis of four-way junctions in RNA structures. *J. Mol. Biol.*, 390(3), 547–559.
- 121 Larose, S., Laterreur, N., Ghazal, G., Gagnon, J., Wellinger, R. J., & Elela, S. A. (2007). RNase III-dependent regulation of yeast telomerase. *J. Biol. Chem.*, 282(7), 4373–4381.
- 122 Laukens, B., De Visscher, C., & Callewaert, N. (2015). Engineering yeast for producing human glycoproteins: where are we now? *Future microbiol.*, 10(1), 21–34.
- 123 Lee, J. F., Hesselberth, J. R., Meyers, L. A., & Ellington, A. D. (2004). Aptamer database. *Nucl. Acids Res.*, 32(Database issue), D95–D100.
- 124 Lee, S.J., Cho, J., Lee, B.H., Hwang, D., Park, J.W. (2023) Design and Prediction of Aptamers Assisted by In Silico Methods. *Biomedicines*, 11(2), 356.

- 125 Li, M., Zheng, M., Wu, S., Tian, C., Liu, D., Weizmann, Y., Jiang, W., Wang, G., & Mao, C. (2018). In vivo production of RNA nanostructures via programmed folding of single-stranded RNAs. *Nat. Commun.*, 9(1), 2196.
- 126 Li, Z., Fu, X., Huang, J., Zeng, P., Huang, Y., Chen, X., & Liang, C. (2021). Advances in Screening and Development of Therapeutic Aptamers Against Cancer Cells. *Front. Cell Development. Biol.*, 9, 662791.
- 127 Liti G. (2015). The fascinating and secret wild life of the budding yeast *S. cerevisiae*. *eLife*, 4, e05835.
- 128 Liu, C. W., Tsai, T. C., Osawa, M., Chang, H. C., & Yang, R. J. (2018). Aptamer-based sensor for quantitative detection of mercury (II) ions by attenuated total reflection surface enhanced infrared absorption spectroscopy. *Anal. Chim. Acta*, 1033, 137–147.
- 129 Lohr, D., Venkov, P., & Zlatanova, J. (1995). Transcriptional regulation in the yeast GAL gene family: a complex genetic network. *FASEB J.: official publication of the Fed. of Amer. Soc. r Exper. Biol.*, 9(9), 777–787.
- 130 Lönne, M., Bolten, S., Lavrentieva, A., Stahl, F., Scheper, T., & Walter, J. G. (2015). Development of an aptamer-based affinity purification method for vascular endothelial growth factor. *Biotechnol. reports (Amsterdam, Netherlands)*, 8, 16–23.
- 131 Low, S. Y., Hill, J. E., & Peccia, J. (2009). DNA aptamers bind specifically and selectively to (1→3)-beta-D-glucans. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 378(4), 701–705.
- 132 Lowe, T. M., & Eddy, S. R. (1999). A computational screen for methylation guide snoRNAs in yeast. *Science (New York, N.Y.)*, 283(5405), 1168–1171.
- 133 Macreadie, I., & Dhakal, S. (2022). The awesome power of yeast. *Microbiology Australia*, 43(1), 19-21.
- 134 Martell, R. E., Nevins, J. R., & Sullenger, B. A. (2002). Optimizing aptamer activity for gene therapy applications using expression cassette SELEX. *Molecular therapy: J. Amer. Soc. Gene Therapy*, 6(1), 30–34.

- 135 Martínez, J. L., Liu, L., Petranovic, D., & Nielsen, J. (2012). Pharmaceutical protein production by yeast: towards production of human blood proteins by microbial fermentation. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 23(6), 965–971.
- 136 Martínez-Pastor, M. T., de Llanos, R., Romero, A. M., & Puig, S. (2013). Post-transcriptional regulation of iron homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Int. J. Mol. Sci.*, 14(8), 15785–15809.
- 137 McCown, P. J., Corbino, K. A., Stav, S., Sherlock, M. E., & Breaker, R. R. (2017). Riboswitch diversity and distribution. *RNA*, 23(7), 995-1011.
- 138 Mendonsa, S. D., & Bowser, M. T. (2004). In vitro selection of high-affinity DNA ligands for human IgE using capillary electrophoresis. *Anal. Chem.*, 76(18), 5387–5392.
- 139 Meyen, F. J. F. (1836). Jahresbericht über die Resultate der Arbeiten im Felde der physiologischen Botanik von dem Jahre 1835. *Archiv für Naturgeschichte*, 2(2), 15-130.
- 140 Miyagawa, A., Okada, Y., & Okada, T. (2020). Aptamer-Based Sensing of Small Organic Molecules by Measuring Levitation Coordinate of Single Microsphere in Combined Acoustic-Gravitational Field. *ACS omega*, 5(7), 3542–3549.
- 141 Moccia, F., Riccardi, C., Musumeci, D., Leone, S., Oliva, R., Petraccone, L., & Montesarchio, D. (2019). Insights into the G-rich VEGF-binding aptamer V7t1: when two G-quadruplexes are better than one! *Nucl. Acids Res.*, 47(15), 8318–8331.
- 142 Morena, F., Argentati, C., Tortorella, I., Emiliani, C., & Martino, S. (2021). De novo ssRNA Aptamers against the SARS-CoV-2 Main Protease: In Silico Design and Molecular Dynamics Simulation. *Int. J. Mol. Sci.*, 22(13), 6874.
- 143 Muzaev, D. M., Rumyantsev, A. M., Al Shanaa, O. R., & Sambuk, E. V. (2020). Selective system based on fragments of the M1 virus for the yeast *Saccharomyces cerevisiae* transformation. *Ecological genetics*, 18(2), 251-263.

- 144 Nagarajan, V. K., Jones, C. I., Newbury, S. F., & Green, P. J. (2013). XRN 5'→3' exoribonucleases: structure, mechanisms and functions. *Biochim. Biophys. Acta*, 1829(6-7), 590–603.
- 145 Nagarkatti, R., Bist, V., Sun, S., Fortes de Araujo, F., Nakhasi, H. L., & Debrabant, A. (2012). Development of an aptamer-based concentration method for the detection of *Trypanosoma cruzi* in blood. *PloS one*, 7(8), p. e43533.
- 146 Ni, J., Tien, A. L., & Fournier, M. J. (1997). Small nucleolar RNAs direct site-specific synthesis of pseudouridine in ribosomal RNA. *Cell*, 89(4), 565–573.
- 147 Niederlender, S., Fontaine, J. J., & Karadjian, G. (2021). Potential applications of aptamers in veterinary science. *Veter. Res.*, 52(1), 79.
- 148 Nielsen J. (2013). Production of biopharmaceutical proteins by yeast: advances through metabolic engineering. *Bioengineered*, 4(4), 207–211.
- 149 Nielsen J. (2019). *Yeast Systems Biology: Model Organism and Cell Factory*. *Biotechnol. J.*, 14(9), e1800421.
- 150 Nilaratanakul, V., Hauer, D. A., & Griffin, D. E. (2020). Development of encoded Broccoli RNA aptamers for live cell imaging of alphavirus genomic and subgenomic RNAs. *Sci. Rep.*, 10(1), 5233.
- 151 Nissen, P., Hansen, J., Ban, N., Moore, P. B., & Steitz, T. A. (2000). The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis. *Science*, 289(5481), 920-930.
- 152 Okuda, M., Fourmy, D., & Yoshizawa, S. (2017). Use of Baby Spinach and Broccoli for imaging of structured cellular RNAs. *Nucl. Acids Res.*, 45(3), 1404–1415.
- 153 Ortolá, B., & Daròs, J. A. (2022). Production of Recombinant RNA in *Escherichia coli* Using Eggplant Latent Viroid as a Scaffold. *Meth. Mol. Biol.*, (Clifton, N.J.), 2316, 315–327.
- 154 Orvieto, R., & Seifer, D. B. (2016). Biosimilar FSH preparations- are they identical twins or just siblings?. *Reprod. Biol. Endocrinol.: RB&E*, 14(1), 32.

- 155 Ouellet J. (2016). RNA Fluorescence with Light-Up Aptamers. *Front. Chem.*, 4, 29.
- 156 Pace, N. R., Reich, C., James, B. D., Olsen, G. J., Pace, B., & Waugh, D. S. (1987). Structure and catalytic function in ribonuclease P. *Cold Spring Harbor symp. on quantitative biol.*, 52, 239–248.
- 157 Paddon, C. J., Westfall, P. J., Pitera, D. J., Benjamin, K., Fisher, K., McPhee, D., Leavell, M. D., Tai, A., Main, A., Eng, D., Polichuk, D. R., Teoh, K. H., Reed, D. W., Treynor, T., Lenihan, J., Fleck, M., Bajad, S., Dang, G., Dengrove, D., Diola, D., ... Newman, J. D. (2013). High-level semi-synthetic production of the potent antimalarial artemisinin. *Nature*, 496(7446), 528–532.
- 158 Paige, J. S., Wu, K. Y., & Jaffrey, S. R. (2011). RNA mimics of green fluorescent protein. *Science (New York, N.Y.)*, 333(6042), 642–646.
- 159 Paniel, N., & Noguera, T. (2019). Detection of Salmonella in Food Matrices, from Conventional Methods to Recent Aptamer-Sensing Technologies. *Foods (Basel, Switzerland)*, 8(9), 371.
- 160 Park, J. Y., Lee, T. S., Song, I. H., Cho, Y. L., Chae, J. R., Yun, M., Kang, H., Lee, J. H., Lim, J. H., Cho, W. G., & Kang, W. J. (2016). Hybridization-based aptamer labeling using complementary oligonucleotide platform for PET and optical imaging. *Biomaterials*, 100, 143–151.
- 161 Pasquinelli A. E. (2012). MicroRNAs and their targets: recognition, regulation and an emerging reciprocal relationship. *Nature reviews. Genetics*, 13(4), 271–282.
- 162 Passarinha L. A. (2021). Enhanced Biosynthesis of Plasmid DNA from *Escherichia coli* Applying Experimental Design. *Meth. Mol. Biol. (Clifton, N.J.)*, 2197, 135–150.
- 163 Peng, L., Stephens, B. J., Bonin, K., Cubicciotti, R., & Guthold, M. (2007). A combined atomic force/fluorescence microscopy technique to select aptamers in a single cycle from a small pool of random oligonucleotides. *Microscopy Res. Technique*, 70(4), 372–381.

- 164 Pérez-Torrado, R., & Querol, A. (2016). Opportunistic Strains of *Saccharomyces cerevisiae*: A Potential Risk Sold in Food Products. *Front. Microbiol.*, 6, 1522.
- 165 Ponchon, L., & Dardel, F. (2007). Recombinant RNA technology: the tRNA scaffold. *Nature methods*, 4(7), 571–576.
- 166 Ponchon, L., Catala, M., Seijo, B., El Khouri, M., Dardel, F., Nonin-Lecomte, S., & Tisné, C. (2013). Co-expression of RNA-protein complexes in *Escherichia coli* and applications to RNA biology. *Nucl. Acids Res.*, 41(15), e150.
- 167 Pontes, A., Hutzler, M., Brito, P. H., & Sampaio, J. P. (2020). Revisiting the Taxonomic Synonyms and Populations of *Saccharomyces cerevisiae*-Phylogeny, Phenotypes, Ecology and Domestication. *Microorganisms*, 8(6), 903.
- 168 Praetorius, F., Kick, B., Behler, K. L., Honemann, M. N., Weuster-Botz, D., & Dietz, H. (2017). Biotechnological mass production of DNA origami. *Nature*, 552(7683), 84–87.
- 169 Pregeljč, D., Skok, J., Vodopivec, T., Mencin, N., Krušič, A., Ličen, J., Nemec, K. Š., Štrancar, A., & Sekirnik, R. (2023). Increasing yield of in vitro transcription reaction with at-line high pressure liquid chromatography monitoring. *Biotechnol. Bioengineering*, 120(3), 737–747.
- 170 Pronk J. T. (2002). Auxotrophic yeast strains in fundamental and applied research. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68(5), 2095–2100.
- 171 Proske, D., Blank, M., Buhmann, R., & Resch, A. (2005). Aptamers—basic research, drug development, and clinical applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 69, 367-374.
- 172 Puig Lombardi, E., & Londoño-Vallejo, A. (2020). A guide to computational methods for G-quadruplex prediction. *Nucl. Acids Res.*, 48(1), 1–15.
- 173 Qiao, L., Lv, B., Feng, X., & Li, C. (2015). A new application of aptamer: One-step purification and immobilization of enzyme from cell lysates for biocatalysis. *J. Biotechnol.*, 203, 68-76.

- 174 Qu, H., Csordas, A. T., Wang, J., Oh, S. S., Eisenstein, M. S., & Soh, H. T. (2016). Rapid and Label-Free Strategy to Isolate Aptamers for Metal Ions. *ACS nano*, 10(8), 7558–7565.
- 175 Ragni, E., Piberger, H., Neupert, C., García-Cantalejo, J., Popolo, L., Arroyo, J., Aebi, M., & Strahl, S. (2011). The genetic interaction network of CCW12, a *Saccharomyces cerevisiae* gene required for cell wall integrity during budding and formation of mating projections. *BMC genomics*, 12, 107.
- 176 Rahimizadeh, K., AlShamaileh, H., Fratini, M., Chakravarthy, M., Stephen, M., Shigdar, S., & Veedu, R. N. (2017). Development of Cell-Specific Aptamers: Recent Advances and Insight into the Selection Procedures. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 22(12), 2070.
- 177 Rajeev, A., Siby, A., Koottungal, M. J., George, J., & John, F. (2021). Knocking Down Barriers: Advances in siRNA Delivery. *ChemistrySelect*, 6(46), 13350-13362.
- 178 Rajesh, K., Rana, K. V., & Suri, C. R. (2013). Characterization of Hapten-Protein Conjugates: Antibody Generation and Immunoassay Development for Pesticides Monitoring. *BioNanoScience*, 3(2), 137–144.
- 179 Rantasalo, A., Kuivanen, J., Penttilä, M., Jäntti, J., & Mojzita, D. (2018). Synthetic Toolkit for Complex Genetic Circuit Engineering in *Saccharomyces cerevisiae*. *ACS Synth. Biol.*, 7(6), 1573–1587.
- 180 Razlansari, M., Jafarinejad, S., Rahdar, A., Shirvaliloo, M., Arshad, R., Fathi-Karkan, S., Mirinejad, S., Sargazi, S., Sheervalilou, R., Ajalli, N., & Pandey, S. (2023). Development and classification of RNA aptamers for therapeutic purposes: an updated review with emphasis on cancer. *Mol. Cell. Biochem.*, 478(7), 1573–1598.
- 181 Riedel, N., Wise, J. A., Swerdlow, H., Mak, A., & Guthrie, C. (1986). Small nuclear RNAs from *Saccharomyces cerevisiae*: unexpected diversity in abundance, size, and molecular complexity. *Proc Natl. Acad. Sci USA*, 83(21), 8097–8101.

- 182 Roxo, C., Kotkowiak, W., & Pasternak, A. (2019). G-Quadruplex-Forming Aptamers-Characteristics, Applications, and Perspectives. *Molecules* (Basel, Switzerland), 24(20), 3781.
- 183 Ruan, M., Seydou, M., Noel, V., Piro, B., Maurel, F., & Barbault, F. (2017). Molecular dynamics simulation of a RNA aptasensor. *J. Phys. Chem. B*, 121(16), 4071-4080.
- 184 Rumyantsev, A., Sidorin, A., Volkov, A., Al Shanaa, O., Sambuk, E., & Padkina, M. (2022). Transcriptome Analysis Unveils the Effects of Proline on Gene Expression in the Yeast *Komagataella phaffii*. *Microorganisms*, 10(1), 67.
- 185 Rupaimoole, R., & Slack, F. J. (2017). MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases. *Nature reviews. Drug discovery*, 16(3), 203–222.
- 186 Ruscito, A., & DeRosa, M. C. (2016). Small-Molecule Binding Aptamers: Selection Strategies, Characterization, and Applications. *Front. Chem.*, 4, 14.
- 187 Sajja, S., Chandler, M., Striplin, C. D., & Afonin, K. A. (2018). Activation of split RNA aptamers: Experiments demonstrating the enzymatic synthesis of short RNAs and their assembly as observed by fluorescent response. *J. Chem. Edu.*, 95(10), 1861-1866.
- 188 Samarsky, D. A., & Fournier, M. J. (1999). A comprehensive database for the small nucleolar RNAs from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucl. Acids Res.*, 27(1), 161–164.
- 189 Sasano, Y., Kariya, T., Usugi, S., Sugiyama, M., & Harashima, S. (2017). Molecular breeding of *Saccharomyces cerevisiae* with high RNA content by harnessing essential ribosomal RNA transcription regulator. *AMB Express*, 7(1), 32.
- 190 Schneider, B., Morávek, Z., & Berman, H. M. (2004). RNA conformational classes. *Nucl. Acids Res.*, 32(5), 1666–1677.

- 191 Shanaa, O. A., Rumyantsev, A., Sambuk, E., & Padkina, M. (2021). In Vivo Production of RNA Aptamers and Nanoparticles: Problems and Prospects. *Molecules* (Basel, Switzerland), 26(5), 1422.
- 192 Shcherbinin, D. S., Gnedenko, O. V., Khmeleva, S. A., Usanov, S. A., Gilep, A. A., Yantsevich, A. V., Shkel, T. V., Yushkevich, I. V., Radko, S. P., Ivanov, A. S., Veselovsky, A. V., & Archakov, A. I. (2015). Computer-aided design of aptamers for cytochrome p450. *J. Struct. Biol.*, 191(2), 112–119.
- 193 Shu, D., Shu, Y., Haque, F., Abdelmawla, S., & Guo, P. (2011). Thermodynamically stable RNA three-way junction for constructing multifunctional nanoparticles for delivery of therapeutics. *Nature nanotechnol.*, 6(10), 658–667.
- 194 Smith, D., Kirschenheuter, G. P., Charlton, J., Guidot, D. M., & Repine, J. E. (1995). In vitro selection of RNA-based irreversible inhibitors of human neutrophil elastase. *Chem. & Biol.*, 2(11), 741–750.
- 195 Smith, M. G., & Snyder, M. (2006). Yeast as a model for human disease. *Curr. Protocols Hum. Gen.*, 48(1), 15-6.
- 196 Song, W., Strack, R. L., & Jaffrey, S. R. (2013). Imaging bacterial protein expression using genetically encoded RNA sensors. *Nature methods*, 10(9), 873–875.
- 197 Soon, S., & Nordin, N. A. (2019). In silico predictions and optimization of aptamers against *Streptococcus agalactiae* surface protein using computational docking. *Mater. Today: Proc.*, 16, 2096-2100.
- 198 Srivastava, S., Abraham, P. R., & Mukhopadhyay, S. (2021). Aptamers: An Emerging Tool for Diagnosis and Therapeutics in Tuberculosis. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 11, 656421.
- 199 Stanek, D., Pridalová-Hnilicová, J., Novotný, I., Huranová, M., Blazíková, M., Wen, X., Sapra, A. K., & Neugebauer, K. M. (2008). Spliceosomal small nuclear ribonucleoprotein particles repeatedly cycle through Cajal bodies. *Mol. Biol. Cell*, 19(6), 2534–2543.

- 200 Stoltenburg, R., Reinemann, C., & Strehlitz, B. (2005). FluMag-SELEX as an advantageous method for DNA aptamer selection. *Anal. Bioanal. Chem.*, 383(1), 83–91.
- 201 Su, Y., & Hammond, M. C. (2020). RNA-based fluorescent biosensors for live cell imaging of small molecules and RNAs. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 63, 157–166.
- 202 Sun, H., & Zu, Y. (2015). Aptamers and their applications in nanomedicine. *Small (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)*, 11(20), 2352–2364.
- 203 Svensen, N., & Jaffrey, S. R. (2016). Fluorescent RNA Aptamers as a Tool to Study RNA-Modifying Enzymes. *Cell Chem. Biol.*, 23(3), 415–425.
- 204 Szczebara, F. M., Chandelier, C., Villeret, C., Masurel, A., Bourot, S., Duport, C., Blanchard, S., Groisillier, A., Testet, E., Costaglioli, P., Cauet, G., Degryse, E., Balbuena, D., Winter, J., Achstetter, T., Spagnoli, R., Pompon, D., & Dumas, B. (2003). Total biosynthesis of hydrocortisone from a simple carbon source in yeast. *Nature biotechnol.*, 21(2), 143–149.
- 205 Terpe K. (2006). Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 72(2), 211–222.
- 206 Thakur, S., Sinhari, A., Jain, P., & Jadhav, H. R. (2022). A perspective on oligonucleotide therapy: Approaches to patient customization. *Front. Pharmacol.*, 13, 1006304.
- 207 Thiviyanathan, V., & Gorenstein, D. G. (2012). Aptamers and the next generation of diagnostic reagents. *Proteomics. Clinical appl.*, 6(11-12), 563–573.
- 208 Tippelt, A., & Nett, M. (2021). *Saccharomyces cerevisiae* as host for the recombinant production of polyketides and nonribosomal peptides. *Microb. Cell Fact.*, 20(1), 161.
- 209 Trachman, R. J., 3rd, Demeshkina, N. A., Lau, M. W. L., Panchapakesan, S. S., Jeng, S. C. Y., Unrau, P. J., & Ferré-D'Amaré, A. R. (2017). Structural basis for

- high-affinity fluorophore binding and activation by RNA Mango. *Nature Chem. Biol.*, 13(7), 807–813.
- 210 Traven, A., Jelicic, B., & Sopta, M. (2006). Yeast Gal4: a transcriptional paradigm revisited. *EMBO reports*, 7(5), 496–499.
- 211 Truong, L., & Ferré-D'Amaré, A. R. (2019). From fluorescent proteins to fluorogenic RNAs: Tools for imaging cellular macromolecules. *Protein science: a publication of the Protein Society*, 28(8), 1374–1386.
- 212 Tuerk, C., & Gold, L. (1990). Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science (New York, N.Y.)*, 249(4968), 505–510.
- 213 Tyagi S. (2009). Imaging intracellular RNA distribution and dynamics in living cells. *Nature meth.*, 6(5), 331–338.
- 214 Tyagi, R. D. *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering : Environmental and Health Impact of Hospital Wastewater*. Ed. R. D. Tyagi. Amsterdam, Netherlands;: Elsevier, 2020. Print.
- 215 Umekage, S., & Kikuchi, Y. (2009). In vitro and in vivo production and purification of circular RNA aptamer. *J. Biotechno.*, 139(4), 265–272.
- 216 van der Vaart, J. M., Caro, L. H., Chapman, J. W., Klis, F. M., & Verrips, C. T. (1995). Identification of three mannoproteins in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.*, 177(11), 3104–3110.
- 217 Verschoor, A., Warner, J. R., Srivastava, S., Grassucci, R. A., & Frank, J. (1998). Three-dimensional structure of the yeast ribosome. *Nucl. Acids Res.*, 26(2), 655–661.
- 218 Walch, B., Breinig, T., Schmitt, M. J., & Breinig, F. (2012). Delivery of functional DNA and messenger RNA to mammalian phagocytic cells by recombinant yeast. *Gene therapy*, 19(3), 237–245.
- 219 Walsh G. (2018). Biopharmaceutical benchmarks 2018. *Nature biotechnol.*, 36(12), 1136–1145.

- 220 Walsh, G. (2010). Biopharmaceutical benchmarks 2010. *Nature biotechnol.*, 28(9), 917-924.
- 221 Wang, G., Huang, M., & Nielsen, J. (2017). Exploring the potential of *Saccharomyces cerevisiae* for biopharmaceutical protein production. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 48, 77–84.
- 222 Wang, H., Zhang, Y., Yang, H., Qin, M., Ding, X., Liu, R., & Jiang, Y. (2018). In Vivo SELEX of an Inhibitory NSCLC-Specific RNA Aptamer from PEGylated RNA Library. *Mol. therapy. Nucleic acids*, 10, 187–198.
- 223 Wang, Y., Li, Z., & Yu, H. (2020). Aptamer-Based Western Blot for Selective Protein Recognition. *Front. Chem.*, 8, 570528.
- 224 White, R., Rusconi, C., Scardino, E., Wolberg, A., Lawson, J., Hoffman, M., & Sullenger, B. (2001). Generation of species cross-reactive aptamers using "toggle" SELEX. *Molecular therapy: J. Amer. Soc. Gene Therapy*, 4(6), 567–573.
- 225 Whitehead, K. A., Langer, R., & Anderson, D. G. (2009). Knocking down barriers: advances in siRNA delivery. *Nature rev. Drug discovery*, 8(2), 129–138.
- 226 Wickner, R. B., Fujimura, T., & Esteban, R. (2013). Viruses and prions of *Saccharomyces cerevisiae*. *Adv. Virus Res.*, 86, 1–36.
- 227 Winge, Ö., & Laustsen, O. (1937). On two types of spore germination, and on genetic segregations in *Saccharomyces*, demonstrated through single-spore cultures. *Comptes Rendus des Travaux du Laboratoire Carlsberg, Série Physiologique*, 22, 99–117.
- 228 Wurster, S. E., Bida, J. P., Her, Y. F., & Maher, L. J., 3rd (2009). Characterization of anti-NF-kappaB RNA aptamer-binding specificity in vitro and in the yeast three-hybrid system. *Nucl. Acids Res.*, 37(18), 6214–6224.
- 229 wwPDB consortium (2019). Protein Data Bank: the single global archive for 3D macromolecular structure data. *Nucl. Acids Res.*, 47(D1), D520–D528.

- 230 Xie, S., Du, Y., Zhang, Y., Wang, Z., Zhang, D., He, L., Qiu, L., Jiang, J., & Tan, W. (2020). Aptamer-based optical manipulation of protein subcellular localization in cells. *Nature commun.*, 11(1), 1347.
- 231 Xu, X., Zhao, P., & Chen, S. J. (2014). Vfold: a web server for RNA structure and folding thermodynamics prediction. *PloS one*, 9(9), e107504.
- 232 Zaug, A. J., & Cech, T. R. (1987). Self-splicing RNA and an RNA enzyme in *Tetrahymena*. *J. Protozool.*, 34(4), 416–417.
- 233 Zavyalova, E., Samoylenkova, N., Revishchin, A., Turashev, A., Gordeychuk, I., Golovin, A., Kopylov, A., & Pavlova, G. (2017). The Evaluation of Pharmacodynamics and Pharmacokinetics of Anti-thrombin DNA Aptamer RA-36. *Front. Pharmacol.*, 8, 922.
- 234 Zemlyanko, O. M., Rogoza, T. M., & Zhouravleva, G. A. (2018). Mechanisms of bacterial multiresistance to antibiotics. *Ecological genetics*, 16(3), 4-17.
- 235 Zhang, C., & Zhang, B. (2023). RNA therapeutics: updates and future potential. *Science China. Life sciences*, 66(1), 12–30.
- 236 Zhang, L., Peng, H., Feng, M., Zhang, W., & Li, Y. (2020). Yeast microcapsule-mediated oral delivery of IL-1 β shRNA for post-traumatic osteoarthritis therapy. *Mol. therapy. Nucleic acids*, 23, 336–346.
- 237 Zhang, X., Potty, A. S., Jackson, G. W., Stepanov, V., Tang, A., Liu, Y., Kourentzi, K., Strych, U., Fox, G. E., & Willson, R. C. (2009). Engineered 5S ribosomal RNAs displaying aptamers recognizing vascular endothelial growth factor and malachite green. *J. Mol. Recognition*, 22(2), 154–161.
- 238 Zhou, J., & Rossi, J. (2017). Aptamers as targeted therapeutics: current potential and challenges. *Nature rev. Drug discovery*, 16(6), 440.
- 239 Zhou, W., Huang, P. J., Ding, J., & Liu, J. (2014). Aptamer-based biosensors for biomedical diagnostics. *The Analyst*, 139(11), 2627–2640.
- 240 Zhou, X., Zhang, X., Han, S., Dou, Y., Liu, M., Zhang, L., Guo, J., Shi, Q., Gong, G., Wang, R., Hu, J., Li, X., & Zhang, J. (2017). Yeast Microcapsule-Mediated

Targeted Delivery of Diverse Nanoparticles for Imaging and Therapy via the Oral Route. *Nano letters*, 17(2), 1056–1064.

- 241 Zhu, H., Zhang, L., Liu, Y., Zhou, Y., Wang, K., Xie, X., Song, L., Wang, D., Han, C., & Chen, Q. (2016). Aptamer-PEG-modified Fe₃O₄@Mn as a novel T1- and T2- dual-model MRI contrast agent targeting hypoxia-induced cancer stem cells. *Scientific reports*, 6, 39245.
- 242 Zhu, Y., Zhu, L., Wang, X., & Jin, H. (2022). RNA-based therapeutics: an overview and prospectus. *Cell death & disease*, 13(7), 644.
- 243 Zhuo, Z., Wan, Y., Guan, D., Ni, S., Wang, L., Zhang, Z., Liu, J., Liang, C., Yu, Y., Lu, A., Zhang, G., & Zhang, B. T. (2020). A Loop-Based and AGO-Incorporated Virtual Screening Model Targeting AGO-Mediated miRNA-mRNA Interactions for Drug Discovery to Rescue Bone Phenotype in Genetically Modified Mice. *Adv. Sci.*, (Weinheim, Baden-Wurttemberg, Germany), 7(13), 1903451.
- 244 Zhuo, Z., Yu, Y., Wang, M., Li, J., Zhang, Z., Liu, J., Wu, X., Lu, A., Zhang, G., & Zhang, B. (2017). Recent Advances in SELEX Technology and Aptamer Applications in Biomedicine. *Int. J. Mol. Sci.*, 18(10), 2142.
- 245 Zinskie, J. A., Roig, M., Janetopoulos, C., Myers, K. A., & Bruist, M. F. (2018). Live-cell imaging of small nucleolar RNA tagged with the broccoli aptamer in yeast. *FEMS yeast research*, 18(8), 10.1093/femsyr/foy093.
- 246 Zou, X., Wu, J., Gu, J., Shen, L., & Mao, L. (2019). Application of Aptamers in Virus Detection and Antiviral Therapy. *Front. Microbiol.*, 10, 1462.
- 247 Zuker M. (2003). Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucl. Acids Res.*, 31(13), 3406–3415.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Таблица П1

<i>Table S1. Results of DEseq2 analysis for genes with differentiated expression in yeast synthesizing RNA aptamer</i>								
<i>Gene - gene names (retrieved from NCBI and SGD)</i>								
<i>baseMean - the average value of the number of normalized reads</i>								
<i>log2FoldChange — logarithm of expression level change</i>								
<i>lfcSE - standard error of log2FoldChange value</i>								
<i>stat - Wald test statistic value</i>								
<i>P value - p-value</i>								
<i>P adj value - adjusted p-value by the Benjamini-Hochberg method</i>								
List of genes with RNA levels decrease in response to reporter construct synthesis in cells								
	Gene		baseMean	log2FoldChan ge	lfcSE	stat	pvalue	padj
1	YLR227 W-B		812.244317 288633	- 1.4865299415 8653	0.06050085 80640956	- 24.570394 3572449	2.6187437223274 8e-133	3.5126082462152 6e-130
2	YOR142 W-B		962.623712 660624	- 0.8644625801 00935	0.05334152 04686144	- 16.206185 5850093	4.5600729603040 9e-59	3.6699467184527 3e-56
3	YLR110 C	CCW1 2	537.298946 492214	- 0.6168187426 62513	0.06591436 66462934	- 9.3578801 4125141	8.1352461967512 2e-21	1.9256606291604 1e-18
4	YDR050 C	TPI1	120.548808 567361	- 1.0491961210 6366	0.13523455 5267138	- 7.7583434 1297689	8.6045896157600 2e-15	1.5054290701660 1e-12
5	YKL152 C	GPM1	154.095584 692314	- 0.7628223880 57912	0.11669478 1309261	- 6.5369023 3187295	6.2806032898771 9e-11	9.0261241565949 3e-09
6	YLR155 C	ASP3- 1	20.4861956 527702	- 2.9424348392 2052	0.47105314 3560022	- 6.2465029 2530229	4.1974416193327 9e-10	5.2782828363109 9e-08

7	YDL148 C	NOP1 4	38.3745901 743603	- 1.6181552116 4528	0.26023665 6574414	- 6.2180141 4506941	5.0348618240061 1e-10	6.1394799938789 7e-08
8	YDR524 W-C		148.927192 287866	0.7075872314 04013	0.11834703 6019897	5.9789180 6335608	2.2462449818684 1e-09	2.5108027241773 5e-07
9	YDR497 C	ITR1	129.579731 903513	0.7505477699 48193	0.12673462 6298966	5.9221997 3235772	3.1766347095484 1e-09	3.3415585062404 9e-07
10	YGR106 C	VOA1	21.0322242 152243	2.0351324436 2539	0.38350942 4400778	5.3066034 7344847	1.1168677214971 3e-07	8.6428379063547 4e-06
11	YOR298 W	MUM3	80.8437950 872365	0.8336842755 72015	0.16088273 2187744	5.1819375 7798155	2.1959271181175 2e-07	1.5779304863044 4e-05
12	YLR075 W	RPL10	39.9253445 068186	1.2550812638 4436	0.24213612 2308335	5.1833706 259083	2.1791140182897 8e-07	1.5779304863044 4e-05
13	YML028 W	TSA1	111.636588 532236	0.6851955085 97545	0.13548904 7434222	5.0572021 9879911	4.2545207273588 7e-07	2.7174906995066 8e-05
14	YDR025 W	RPS1 1A	31.0999265 12011	1.3771219503 2027	0.28021767 1542702	4.9144721 7707116	8.9021965872573 4e-07	5.3466326965856 e-05
15	YHR179 W	OYE2	115.410739 335061	0.6478505355 80594	0.13287422 8578475	4.8756673 322696	1.0844122692204 9e-06	6.4171690755047 7e-05
16	YKL006 W	RPL14 A	48.0285581 5466	1.0407682640 9958	0.21409571 2457326	4.8612288 9689829	1.1665926534536 e-06	6.8034330978221 5e-05
17	YOL120 C	RPL18 A	69.6987029 743728	0.8438143888 60549	0.17371312 2228694	4.8575166 8057446	1.1886712648523 e-06	6.8331616710938 1e-05
18	YNL265 C	IST1	14.7968995 781532	2.4005133163 4107	0.49556708 0777822	4.8439725 1038815	1.2726854830788 6e-06	7.2130794139567 9e-05

19	YLR197 W	NOP5 6	47.2868231 441662	- 2936	1.0346343736 2936	0.21571825 6471281	4.7962300 0182694	1.6167962976035 5e-06	8.9123127418584 5e-05
20	Q0130	OLI1	37.3552045 237033	- 3811	1.1887839619 3811	0.24810419 3985807	4.7914706 4320127	1.6556324824231 5e-06	9.0030609584739 8e-05
21	YKL060 C	FBA1	113.469185 111024	- 92647	0.6389196063 92647	0.13387829 5987406	4.7723912 3549009	1.8205142595901 9e-06	9.6413688278168 4e-05
22	YIR018C -A		25.0102181 802102	- 375	1.5153248859 375	0.32113214 6195054	4.7186957 266405	2.3736152932819 4e-06	0.0001179188634 58846
23	Gene		baseMean	log2FoldChan ge	lfcSE	stat	pvalue	padj	
24	YEL033 W	MTC7	87.3412960 435425	- 72671	0.7206435319 72671	0.15332085 8980777	4.7002315 0641897	2.5986672009891 2e-06	0.0001275248392 29027
25	YLR293 C	GSP1	40.2147277 24967	- 4142	1.1047964500 4142	0.23633451 2677609	4.6747148 2486566	2.9436236464206 8e-06	0.0001413442430 1747
26	YAL037 C-A		33.6791688 529941	- 1246	1.2407176419 1246	0.26543763 3026816	4.6742341 2333969	2.9505259476807 8e-06	0.0001413442430 1747
27	YPL066 W	RGL1	10.9245958 325049	- 7344	3.6909541901 7344	0.79073072 8798399	4.6677763 4376527	3.0447707778898 6e-06	0.0001441430307 08574
28	YDL104 C	QRI7	31.2178889 361233	- 2078	1.2956416136 2078	0.27943810 0303476	4.6365961 2706243	3.5419351326336 4e-06	0.0001643541111 10228
29	YLR264 C-A		18.2685822 884157	- 0075	1.8675094384 0075	0.40283392 8891415	4.6359288 6413533	3.5533816268861 5e-06	0.0001643541111 10228
30	YDR168 W	CDC3 7	33.7423366 590118	- 8068	1.2042685088 8068	0.26220511 2056992	4.5928490 8457057	4.3723526294731 4e-06	0.0001954927442 33332
31	YPL131 W	RPL5	103.602522 800592	- 1853	0.6426354364 1853	0.14006441 8346448	4.5881419 7071078	4.4720847795684 1e-06	0.0001977546060 76739

32	YEL009 C	GCN4	132.848295 961614	- 0.5638711877 33709	0.12339894 2420772	- 4.5694977 3370821	4.8889445273614 5e-06	0.0002115388470 76371
33	YPR132 W	RPS2 3B	98.5879196 812728	- 0.6555216978 55469	0.14361597 1457171	- 4.5644066 6873153	5.0090897841171 9e-06	0.0002121744978 03027
34	YHR021 C	RPS2 7B	19.9915904 206145	- 1.6970718289 0608	0.37168830 7337704	- 4.5658466 9305772	4.9748225330084 e-06	0.0002121744978 03027
35	YDR496 C	PUF6	28.3358517 367788	- 1.3330919796 2788	0.29227568 6624242	- 4.5610772 3165405	5.0891856748480 3e-06	0.0002133216995 3738
36	YOR063 W	RPL3	86.0764876 031592	- 0.7001391243 86091	0.15427695 6059958	- 4.5381963 8568699	5.6737410216286 9e-06	0.0002306175138 48827
37	YGR161 C-D		38.6084763 984554	- 1.0843731425 2019	0.24097124 8416266	- 4.5000104 7696358	6.7950113352082 4e-06	0.0002680698589 49784
38	YPR102 C	RPL11 A	54.8202321 61068	- 0.8858848586 58359	0.19709618 6893681	- 4.4946828 8869651	6.9673699029304 8e-06	0.0002722009367 90216
39	YKL096 W-A	CWP2	48.7469361 630839	- 0.9410826948 78092	0.21062925 2396009	- 4.4679581 9750973	7.8969732432413 5e-06	0.0003026420983 88602
40	YMR116 C	ASC1	62.7889148 729763	- 0.8135060036 23055	0.18273998 5625853	- 4.4517131 8601638	8.5187900862881 1e-06	0.0003219729314 7078
41	YJL052 W	TDH1	125.904449 228004	- 0.5614160212 78743	0.12658309 2932811	- 4.4351580 3154483	9.2004771779738 9e-06	0.0003413906401 68327
42	YOL126 C	MDH2	11.5907767 544796	- 2.6698109726 8571	0.60211406 6218605	- 4.4340617 8741621	9.2474104816967 3e-06	0.0003413906401 68327
43	YHR009 C	TDA3	14.2568960 261727	- 2.0628755455 7827	0.48235039 9090797	- 4.2767157 4329921	1.8967073805299 9e-05	0.0006523376495 08776

44	YBR031 W	RPL4 A	56.0622279 430731	- 0.8251574451 08681	0.19343719 8648011	- 4.2657640 3543863	1.9921925174871 3e-05	0.0006680485575 30685
45	YKL145 W	RPT1	28.7935212 187236	- 1.2213487851 0615	0.28675793 54371	- 4.2591629 8792034	2.0519381468910 3e-05	0.0006783786807 31147
46	YNL143 C		21.9747237 585869	- 1.4500382075 333	0.34257861 8204299	- 4.2327166 1008499	2.3088536101652 2e-05	0.0007501493829 30102
47	YJR105 W	ADO1	59.0695785 277891	- 0.7940701800 53525	0.18808488 6623319	- 4.2218712 7477087	2.4228246994230 5e-05	0.0007799557272 38267
48	YCL011 C	GBP2	15.8512042 764884	- 1.7989840521 1872	0.42916860 906087	- 4.1917885 281856	2.7676391714268 4e-05	0.0008838873036 36634
49	YEL071 W	DLD3	48.9319521 988683	- 0.8726657820 91778	0.20845371 9830821	- 4.1863766 3458357	2.8344287407735 9e-05	0.0008980898624 3094

List of genes with RNA levels increase in response to reporter construct synthesis in cells

	Gene	baseMean	log2FoldChange	lfcSE	stat	pvalue	padj	
1	YGR027 W-B	5177.55666 246038	0.9274029367 77303	0.03505721 18876608	26.453984 4112282	3.2832595163505 7e-154	1.3211836293794 7e-150	
2	21S_R Q0158 RNA	8950.69685 244304	0.9140171214 73512	0.03464483 13152821	26.382495 9387327	2.1761332344838 3e-153	4.3783800677814 7e-150	
3	YLR157 C-B	1891.42369 001149	1.0295667978 9585	0.04214435 71018339	24.429529 0923075	8.3064626234515 e-132	8.3563013991922 e-129	
4	YNCG00 24W	SNR4 6	417.496429 877927	1.1610053834 1531	0.07351377 58146927	15.793031 5855613	3.4747128040598 7e-56	2.3303740539228 2e-53
5	YNCB00 19C	LSR1	1747.67476 098585	0.6324454505 46266	0.04252534 12055643	14.872201 6712123	4.9943489019475 4e-50	2.8710371402052 7e-47

6	YEL021 W	URA3	653.322779 119522	0.8577524462 16019	0.05994433 36601607	14.309149 7368013	1.9184449515811 9e-46	9.6497781064533 9e-44
7	YBR012 W-B		66.0373221 090167	2.5082535124 7505	0.20940054 7241925	11.978256 721446	4.6193517886760 1e-33	2.0653635108480 3e-30
8	YDR070 C	FMP1 6	182.293355 594755	1.2758640019 2918	0.10775227 9820584	11.840714 6842145	2.4039564479714 7e-32	9.6735207466371 9e-30
9	YMR169 C	ALD3	485.263486 010032	0.7881704567 70348	0.06743678 64005978	11.687544 7191143	1.4759187773537 7e-31	5.3991792364287 e-29
10	YAR010 C		362.625542 597384	0.8473776568 32268	0.07654686 16912422	11.070050 9218815	1.7530096896937 3e-28	5.6579639058155 8e-26
11	Q0055 Q0055	AI2 AI2	390.032000 807443	0.8199846516 6818	0.07409743 46877849	11.066302 8365725	1.8278710431312 8e-28	5.6579639058155 8e-26
12	Q0050 Q0050	AI1 AI1	974.742295 080594	0.5652459911 8704	0.05114588 27809911	11.051642 0961478	2.1524129063272 6e-28	6.1866496679006 4e-26
13	YER103 W	SSA4	722.174395 614217	0.5987235665 80126	0.05720122 16102242	10.466971 6786802	1.2249928523936 9e-25	3.0808570237701 4e-23
14	YNCN00 05C	SNR1 9	178.018368 606943	0.9403370535 06954	0.10627587 6381379	8.8480762 0999978	8.9040841579882 4e-19	1.9905574806524 8e-16
15	YIL136W YIL136W	OM45 OM45	248.839850 390842	0.7271572479 75309	0.09008886 83663472	8.0715549 1196002	6.9408493254614 9e-16	1.3299989374122 4e-13
16	YDR074 W	TPS2	93.2168843 54478	1.1610420401 1044	0.14784635 0229111	7.8530314 6348366	4.0609973515962 5e-15	7.4279333376469 6e-13
17	YML054 C	CYB2	74.9216016 727923	1.2750686838 5681	0.16594602 4582844	7.6836350 076001	1.5463683659653 2e-14	2.5927442936018 5e-12
18	YGR243 W	MPC3	264.592767 452754	0.5962403147 53222	0.08725105 25395401	6.8336174 4527976	8.2799648529376 5e-12	1.3327431427288 4e-09
19	YKR009 C	FOX2	37.0239382 875122	1.5693243623 6103	0.24551123 047738	6.3920675 2094224	1.6365759601734 5e-10	2.2708902288751 6e-08
20	YDR508 C	GNP1	136.994121 211802	0.7545524811 37564	0.11931307 0810959	6.3241393 0853466	2.5464791722986 9e-10	3.4156773964433 e-08
21	YOR161 C	PNS1	43.4531779 526771	1.3843046958 8834	0.22148949 8768574	6.2499789 0908926	4.1050811568720 6e-10	5.2782828363109 9e-08
22	YKR072 C	SIS2	73.0422913 75705	1.0005380043 6635	0.16487025 3367172	6.0686387 2610249	1.2899896093044 4e-09	1.5267406434826 7e-07
23	YLL029 W	FRA1	100.046563 525315	0.8414504827 9728	0.13965223 2190122	6.0253278 4189038	1.6876717549573 2e-09	1.9403403262709 3e-07

24	YNCN00 18W	SNR4 9	33.9212653 409708	1.5157558289 8814	0.25526399 5256205	5.9379930 4702882	2.8853227640727 9e-09	3.1379834601699 7e-07
25	YOL081 W	IRA2	223.267415 132445	0.5574606568 6165	0.09418118 74924781	5.9190234 4516704	3.2385880154915 3e-09	3.3415585062404 9e-07
26	YKL217 W	JEN1	41.2193951 481103	1.3240468247 3302	0.22622028 7798073	5.8529092 930643	4.8304760768059 6e-09	4.7409355446505 4e-07
27	YDL214 C	PRR2	46.1941414 928606	1.2320528402 6922	0.21138977 408673	5.8283464 5427894	5.5979269321035 5e-09	5.3633471368535 e-07
28	YOR023 C	AHC1	69.5442328 424506	0.9800831026 64557	0.16847859 9147093	5.8172557 6794997	5.9821573491983 5e-09	5.5981863193428 3e-07
29	YMR045 C		108.022392 338259	0.7723199771 13814	0.13388829 5965138	5.7683905 1947388	8.0032178143594 3e-09	7.3193064738596 3e-07
30	YMR250 W	GAD1	71.5984039 606918	0.9451456050 18283	0.16568062 6849708	5.7046235 458515	1.1660049670566 5e-08	1.0426675527635 4e-06
31	YHR033 W		208.285711 000747	0.5542534792 92256	0.09728303 38766616	5.6973292 9993688	1.2169872890383 7e-08	1.0645993154544 3e-06
32	YPR149 W	NCE1 02	159.432334 463537	0.6135599999 92518	0.11040284 2418478	5.5574656 1005051	2.7371989136893 7e-08	2.3435081763161 7e-06
33	YDR316 W-B		99.9506030 19725	0.7718178442 37044	0.13924300 3094011	5.5429560 3432184	2.9740755689737 9e-08	2.4932666853230 3e-06
	Gene		baseMean	log2FoldChan ge	lfcSE	stat	pvalue	padj
34	YMR303 C	ADH2	51.0597122 629782	1.0668859001 761	0.19851930 757787	5.3742173 1514763	7.6916048105202 9e-08	6.1902035515067 3e-06
35	Q0085	ATP6	25.7886638 379389	1.6128392515 6771	0.30112701 3921632	5.3560098 4635489	8.5079874432816 8e-08	6.7129689160324 5e-06
36	YLR410 W-B		12.9564827 388411	2.6711043796 8392	0.50933987 4493895	5.2442475 3184316	1.5692141337671 3e-07	1.1914184291092 3e-05
37	YKR054 C	DYN1	15.4702461 147937	2.2387222985 7885	0.42994183 2539944	5.2070352 9906189	1.9188160248714 e-07	1.4298732748300 9e-05
38	YBR117 C	TKL2	32.0285171 997431	1.3423207700 2441	0.25940336 0974812	5.1746467 9324162	2.2834252706143 5e-07	1.6120181208688 e-05
39	YPL239 W	YAR1	25.3357441 436006	1.5380801814 5915	0.30042374 5426557	5.1197024 3655441	3.0601812165433 6e-07	2.0523615358950 8e-05
40	YNCN00 01W	SNR4 0	37.4632195 598165	1.2008742776 1346	0.23531655 8167037	5.1032289 7363234	3.3390658925505 5e-07	2.2026887133808 8e-05

41	YGR237 C		39.7988076 278411	1.1597192447 0239	0.22765221 8136466	5.0942584 8865306	3.5010882011444 2e-07	2.2723191808718 e-05
42	YDL174 C	DLD1	104.574863 157588	0.6814175720 78508	0.13563081 535582	5.0240616 0643394	5.0589997190079 8e-07	3.1808460733262 7e-05
43	YJR049 C	UTR1	64.1566006 056302	0.8669711143 97005	0.17454228 3985041	4.9671122 35516	6.7957261192748 2e-07	4.2070772159941 4e-05
44	YFL031 W	HAC1	129.887648 728829	0.5862142852 36129	0.12166056 8719082	4.8184411 0551311	1.4468421955710 2e-06	8.0862402708024 9e-05
45	YLR203 C	MSS5 1	18.9785259 491356	1.7027043577 9475	0.35678569 7830113	4.7723447 6648082	1.8209344704624 3e-06	9.6413688278168 4e-05
46	YIL045W	PIG2	159.181517 464676	0.5231591567 13547	0.11020794 7659532	4.7470184 1222698	2.0643716615818 8e-06	0.0001078835268 33837
47	Q0075	AI5_B ETA	59.3988473 947692	0.8602092136 57867	0.18133427 9396997	4.7437760 6108661	2.0977073948140 8e-06	0.0001082201866 24767
48	YDL215 C	GDH2	15.6116711 099699	1.9302332429 7856	0.40837661 927751	4.7266007 6963633	2.2830951553170 7e-06	0.0001148396863 12449
49	YBR212 W	NGR1	65.2972720 042661	0.8148807277 81591	0.17237504 5289664	4.7273706 3774076	2.2744587474586 4e-06	0.0001148396863 12449
50	YGR019 W	UGA1	56.6780968 339772	0.8582371483 35559	0.18584164 0797232	4.6181100 4602549	3.8725088272205 2e-06	0.0001770792672 81084
51	YPL147 W	PXA1	85.9018790 78928	0.6903358659 70523	0.14964064 2749066	4.6132912 3751595	3.9634233126252 4e-06	0.0001792001731 46112
52	YNCB00 10W	TLC1	156.991441 627593	0.5046533073 83107	0.11085995 7158607	4.5521694 2453892	5.3095549281119 5e-06	0.0002202644229 97139
53	YGR248 W	SOL4	42.4731544 01267	0.9938641073 32938	0.21877110 2187808	4.5429405 3187946	5.5474905107558 e-06	0.0002277867532 17157
54	YOR290 C	SNF2	92.1946506 810138	0.6532233390 24443	0.14415444 8769277	4.5314129 7130514	5.8590473992945 6e-06	0.0002357680673 47613
55	YLR330 W	CHS5	81.3644327 072369	0.6926170333 91802	0.15359751 2350269	4.5092985 0876969	6.5042336033648 4e-06	0.0002591389704 94457
56	YLR182 W	SWI6	13.5089557 979557	1.9978568932 4181	0.44629383 934799	4.4765504 6316697	7.5858743915159 e-06	0.0002935149860 71731
57	YCR010 C	ADY2	58.5505887 292302	0.8135144440 54416	0.18278587 587064	4.4506417 1495478	8.5614074720112 8e-06	0.0003219729314 7078
58	YKL010 C	UFD4	36.7890704 396939	1.0399061717 9865	0.23492720 8470083	4.4265037 6076417	9.5772713462547 2e-06	0.0003503539990 66627

59	YBL075 C	SSA3	100.239427 962574	0.6052785302 51782	0.13811291 3292884	4.3824904 9868509	1.1733028443786 e-05	0.0004253487068 26981
60	YNR047 W	FPK1	51.5747603 903873	0.8515613085 43026	0.19505619 9000313	4.3657228 6811381	1.2670303933356 9e-05	0.0004552259198 91325
61	YKR098 C	UBP1 1	35.2462737 29943	1.0475043354 6319	0.24036948 2560257	4.3578923 7596165	1.3132092784239 3e-05	0.0004635398365 24376
62	YIL057C	RG12	127.607110 016945	0.5306953986 39113	0.12259868 7739737	4.3287200 5747498	1.4997842736663 4e-05	0.0005247940797 59422
63	YPL151 C	PRP4 6	13.1198913 04669	1.9445739716 8111	0.45516107 4242387	4.2722765 2302615	1.9348742727721 3e-05	0.0006567374449 71805
64	YDL085 W	NDE2	31.4032414 855992	1.0967738276 213	0.25676905 8568544	4.2714407 7925777	1.9421410524762 6e-05	0.0006567374449 71805
65	YDR361 C	BCP1	8.53519507 34195	2.7852361286 9578	0.65401960 5077031	4.2586431 7686277	2.0567146881013 9e-05	0.0006783786807 31147
66	YDL074 C	BRE1	14.4322764 48923	1.7858653848 804	0.42194601 2551002	4.2324499 6222007	2.3115935259277 5e-05	0.0007501493829 30102
67	YJL131C	AIM23	11.7299094 593826	2.0362246911 56	0.48778304 7466405	4.1744474 3463792	2.9871017719687 9e-05	0.0009390701195 6269

БЛАГОДАРНОСТИ

Я хотел бы поблагодарить Санкт-Петербургский государственный университет за предоставление мне стипендии для продолжения моей работы над диссертацией на биологическом факультете. Также хочу поблагодарить дружный и высокопрофессиональный коллектив лаборатории биохимической генетики кафедры генетики и биотехнологии. Особая благодарность моему научному руководителю Падкиной Марине Владимировне за все усилия, которые она приложила для завершения этой работы. Я хотел бы поблагодарить Андрея Михайловича Румянцева за то, что он всегда был в лаборатории, чтобы помочь, и за все навыки, которым я научился у него, особенно в области генетики, биохимии и молекулярной биологии. Спасибо Антону Витальевичу Сидорину за помощь в биоинформатической части работы.