

## nm-ТЕСТ – УСОВЕРШЕНСТВОВАННАЯ ВЕРСИЯ АЛЬФА-ТЕСТА ДЛЯ ДРОЖЖЕЙ *Saccharomyces cerevisiae*, ОБЛАДАЮЩАЯ БОЛЕЕ ВЫСОКОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬЮ ПО ОТНОШЕНИЮ К ГЕНОТОКСИЧЕСКИМ ФАКТОРАМ

© 2023 г. Е. И. Степченкова<sup>1, 2, \*</sup>, Ю. В. Андрейчук<sup>1</sup>, Д. В. Афанасова<sup>2</sup>,  
С. П. Задорский<sup>1, 2</sup>, С. Г. Инге-Вечтомов<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup>Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук,  
Санкт-Петербургский филиал, Санкт-Петербург, 199034 Россия

<sup>2</sup>Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, 199034 Россия

\*e-mail: stepchenkova@gmail.com

Поступила в редакцию 11.01.2022 г.

После доработки 10.03.2022 г.

Принята к публикации 04.05.2022 г.

Одной из актуальных проблем генетической токсикологии является разработка новых и совершенствование существующих тест-систем для своевременного выявления и оценки уровня мутагенной и канцерогенной активности различных факторов. Особое место среди тест-систем генетической токсикологии занимает альфа-тест, основанный на использовании особенностей жизненного цикла дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Его главное отличие от существующих тест-систем заключается в возможности выявлять широкий спектр генетических изменений, таких как генные мутации, конверсия, рекомбинация, потеря правого плеча и целой III хромосомы, а также первичные повреждения генетического материала до их устранения системами репарации. В рамках данной работы были намечены и апробированы способы генетической модификации используемых в альфа-тесте штаммов, направленные на повышение чувствительности и эффективности тест-системы. Полученные нами результаты позволили заключить, что предложенная нами модификация тестерного штамма привела к повышению разрешающей способности тест-системы на порядок.

**Ключевые слова:** альфа-тест, nm-тест, генетическая токсикология, генные мутации, первичные повреждения.

**DOI:** 10.31857/S0016675822120128, **EDN:** CLAKAN

Разработка новых методов выявления мутагенов и изучения механизмов их действия не теряет своей актуальности в связи с постоянным расширением спектра потенциальных генотоксических факторов, с которыми человек может столкнуться в повседневной жизни. Уникальное положение среди известных тест-систем занимает альфа-тест, разработанный нами ранее на модельном организме – дрожжах *Saccharomyces cerevisiae* и успешно применявшийся для изучения различных аспектов мутагенеза [1–7]. Отличительной особенностью альфа-теста является то, что с его помощью можно выявлять фенотипическое проявление первичных повреждений генетического материала до их устранения системами репарации, а также отличать первичные повреждения от генных или хромосомных мутаций [8]. Благодаря таким свойствам использование альфа-теста может быть весьма перспективно для первичного

скрининга мутагенных факторов, а возможность выявления разных по своей природе генетических нарушений может стать полезной в фундаментальных исследованиях при изучении молекулярных механизмов мутагенеза.

При разработке альфа-теста были использованы особенности генетического контроля типа спаривания почкующихся дрожжей *S. cerevisiae* [9]. Жизненный цикл *S. cerevisiae* состоит из гаплоидной и диплоидной фаз. Гаплоидные клетки дрожжей противоположных типов спаривания ( $\alpha$  и  $a$ ) могут скрещиваться с образованием диплоидных гибридов, которые в свою очередь способны вступать в мейоз с образованием тетрады гаплоидных спор ( $2a : 2\alpha$ ). Культуры гетероталлических штаммов дрожжей сохраняют гаплоидное состояние в течение длительного времени. Напротив, гомоталлические штаммы быстро диплои-

дизуются, поскольку у них с высокой частотой происходит генетически детерминированное переключение типа спаривания, в результате которого в чистой культуре гомоталличного штамма дрожжей появляются клетки противоположного типа. В результате гибридизации исходных клеток и клеток, переключивших тип спаривания на противоположный, доля диплоидных клеток в культуре гомоталличного штамма быстро нарастает.

Тип спаривания дрожевой клетки определяется локусом *MAT* [9]. Переключение типа спаривания у гомоталличных штаммов происходит в результате конверсии генетической информации из молчащих кассет *HMRa* или *HMLα* в локус *MAT*. У гомоталличных штаммов переключение типа спаривания генетически детерминировано и происходит регулярно при каждом делении благодаря активности эндонуклеазы Но, которая вносит разрыв в определенном сайте локуса *MAT* и таким образом стимулирует конверсию. У гетероталличных штаммов отсутствует эндонуклеаза Но. Поэтому у таких штаммов переключение типа спаривания может происходить в результате более редких событий: конверсии, индуцированной случайными разрывами в локусе *MAT*, и мутаций или повреждений генетического материала в локусе *MATα* [1–3].

Локус *MAT* может быть представлен альтернативными последовательностями – *MATa* или *MATα*. Альтернативные варианты локуса *MAT* имеют разное происхождение, а их нуклеотидные последовательности существенно различаются, поэтому *MATa* и *MATα* называют идиоморфами, в отличие от аллелей, которые обычно имеют большее сходство [10]. Идиоморф *MATα* содержит две открытые рамки считывания – *MATα1* и *MATα2*, экспрессия которых регулируется общим двусторонним промотором [11]. В локусе *MATa* также имеются две открытые рамки считывания – *MATa1* и *MATa2*. Гены, содержащиеся в локусе *MAT*, кодируют транскрипционные факторы, которые регулируют экспрессию специфичных для каждого типа спаривания генов. Так, *Matα1* совместно с белком *Mcm1* активирует альфа-специфичные гены *αsg* (*α-specific genes*), а *Matα2* в комплексе с *Mcm1* является репрессором а-специфичных генов *asg* (*a-specific genes*), экспрессирующихся конститутивно [12–14]. В диплоидных клетках, в которых одновременно присутствуют *MATα* и *MATa*, белки *Matα2* и *Mata1* подавляют экспрессию гаплоид-специфичных генов *hsg* и активируют диплоид-специфичные гены, что необходимо для споруляции, диплоидные клетки не способны к дальнейшему скрещиванию. Нарушение

экспрессии одновременно обоих генов *MATα1* и *MATα2* в результате мутации или повреждения ведет к тому, что клетка, исходно имевшая тип спаривания *α*, переключает его на тип спаривания *a*. Мутанты, у которых отсутствует экспрессия одновременно обоих генов *MATα1* и *MATα2*, способны скрещиваться с клетками *α*-типа спаривания. Гибриды от такого скрещивания имеют тип спаривания *α*, поэтому фенотип двойных мутантов *matα1 matα2* является рецессивным. При появлении мутаций только в одном из двух генов (*MATα1* или *MATα2*) клетки дрожжей теряют способность к спариванию и приобретают фенотип, условно обозначаемый nm (*non-mating*), поскольку при инактивации гена *MATα2* одновременно экспрессируются как *asg*, так и *αsg*, а при инактивации *MATα1* отсутствуют продукты *αsg* и *asg*.

Альфа-тест получил свое название в связи с тем, что показателем генетической активности тестируемого фактора является частота переключения типа спаривания *α* → *a* у гетероталличных штаммов дрожжей. Если какой-либо фактор приводит к статистически-значимому возрастанию частоты переключения типа спаривания *α* → *a*, то такой фактор является мутагеном. Частоту переключения типа спаривания оценивают по частоте образования “незаконных” гибридов двух штаммов *α*-типа спаривания. Для этого клетки двух штаммов высевают совместно на селективную среду для отбора гибридов, а затем определяют соотношение числа выросших “незаконных” гибридов к числу высеянных клеток. Эффективность альфа-теста была подтверждена в целом ряде научных исследований, кроме того были опубликованы работы, в которых альфа-тест был использован в качестве основного метода для изучения различных аспектов мутагенеза [1–7]. Опыт использования альфа-теста, накопленный к настоящему времени, позволяет наметить пути совершенствования тест-системы, которые будут способствовать повышению ее чувствительности и эффективности. Перспективным подходом к повышению чувствительности альфа-теста может стать модификация тестерного штамма путем инактивации одной из двух открытых рамок считывания локуса *MATα*. Мы полагаем, что использование мутанта по одному из двух генов локуса *MATα* в качестве тестерного штамма могло бы существенно повысить чувствительность тест-системы, поскольку в отличие от переключения типа спаривания *α* → *a*, переключение nm → *a* должно происходить чаще. В последнем случае для приобретения клеткой типа спаривания *a* необходимо появление лишь одной мутации (или первичного повреждения) во втором гене локуса

*MAT $\alpha$* , а при скрещивании  $\alpha \times \alpha$  для переключения  $\alpha \rightarrow a$  требуется осуществление двух событий, одновременно инактивирующих *MAT $\alpha$ 1* и *MAT $\alpha$ 2*. В настоящей работе мы проверили эту гипотезу и оценили частоту переключения типа спаривания  $nm \rightarrow a$  в сравнении с  $\alpha \rightarrow a$ .

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

*Штаммы дрожжей Saccharomyces cerevisiae, среды и условия культивирования.* В работе использовали штаммы дрожжей: Д926 (*MAT $\alpha$  // MAT $\alpha$  leu2 $\Delta$  // leu2 $\Delta$  lys2 $\Delta$  // lys2 $\Delta$  ura3 $\Delta$  // ura3 $\Delta$  his4 $\Delta$  // his4 $\Delta$  thr4 $\Delta$  // thr4 $\Delta$ ) и К5-35В-Д924 (*MAT $\alpha$  ura3 $\Delta$  leu2 $\Delta$  lys5::KanMX met15 $\Delta$* ) [15]; А-К5-35В-Д924 (*mat $\alpha$ 2 ura3 $\Delta$  leu2 $\Delta$  lys5::kanMX met15 $\Delta$* ) (получен в данной работе); 78А-П2345 (*MAT $\alpha$  his5*) и 2Г-П2345 (*MATa his5*) (Петергофская генетическая коллекция). Для внесения мутации *mat $\alpha$ 2*, представляющей собой замену глутаминового кодона на преждевременный стоп-кодон ТАА (С37Т), мы использовали метод двухшагового замещения. Для этого штамм К5-35В-Д924 трансформировали интегративной плазмидой rRS306-*MAT $\alpha$ 2-STOP*, несущей полноразмерный локус *MAT $\alpha$*  с мутантным аллелем *mat $\alpha$ 2*. Перед трансформацией плазида была гидролизована рестриктазой *SpeI* по сайту, находящемуся в *MAT $\alpha$* . Трансформантов отбирали на среде без урацила. Затем отобранных трансформантов высевали на среду с 5-фтороротовой кислотой (ФОК) для селекции клонов, у которых произошло высщепление плазмиды из хромосомы. Среди клонов *Ura<sup>-</sup>* отбирали те, которые обладали фенотипом *nm*, что является следствием успешного замещения аллеля *MAT $\alpha$ 2* дикого типа на мутантный *mat $\alpha$ 2*. Полученный таким образом штамм с мутацией *mat $\alpha$ 2* получил название А-К5-35В-Д924. Наличие мутации в гене *MAT $\alpha$ 2* штамма А-К5-35В-Д924 подтверждали секвенированием.*

Дрожжи выращивали на полных средах: жидкой и твердой среде YEPD [16, 17] и минимальной среде MD (минимальная дрожжевая среда по рецепту Yeast Nitrogen Base), содержащей необходимые аминокислоты, азотистые основания, витамины и микроэлементы [17]. Среду для отбора гибридов готовили на основе MD с добавлением урацила, гистидина, лейцина и треонина в стандартных концентрациях. Для отбора штаммов с мутацией по гену *URA3* использовали минимальную среду, которая содержала 1 г/л ФОК, а также все необходимые аминокислоты в стандартной концентрации и урацил (50 мг/л). Дрожжи выращивали при температуре 30°C.

*Альфа-тест.* Для каждого исследуемого штамма (тестерный штамм) выращивали 10 независи-

мых культур в жидкой среде YEPD в течение 16 ч при 30°C на качалке. При тех же условиях растили культуру штамма-партнера для скрещивания. Для проведения теста на “незаконную” гибридизацию аликвоты из каждой культуры тестерного штамма и ночной культуры штамма-партнера для скрещивания высевали совместно на селективную среду для отбора “незаконных” гибридов. Параллельно подходящие разведения клеток тестерного штамма высевали на среду YEPD для оценки выживаемости. В экспериментах с использованием УФ-излучения сначала проводили облучение клеток тестерного штамма ультрафиолетовым светом с длиной волны 264 нм на твердых селективной и полной средах, а затем к тестерному штамму на среду для отбора гибридов подсеивали штамм-партнер для скрещивания Д926. Доза облучения составляла 10 Дж/м<sup>2</sup>. Чашки инкубировали трое суток при 30°C, затем подсчитывали число выросших колоний на каждой чашке. Общую частоту “незаконной” гибридизации в каждой культуре вычисляли как отношение числа колоний, выросших на среде для отбора “незаконных” гибридов, к числу колоний, выросших на полной среде, с учетом соответствующих факторов разведения.

Для каждого варианта экспериментальных условий (тестерный штамм и доза УФ) было отобрано и проверено не менее 500 “незаконных” гибридов с целью анализа их фенотипа. Для определения типа спаривания отобранные “незаконные” гибриды скрещивали с тестерными штаммами 2Г-П2345 и 78А-П2345 а и  $\alpha$  типов спаривания соответственно. По способности “незаконных” гибридов скрещиваться с тестерными штаммами идентифицировали тип спаривания  $\alpha$  или неопулирующий (*nm*). Отобранных “незаконных” гибридов распределяли по классам в соответствии с их фенотипом: типом спаривания и наличием ауксотрофностей по гистидину и треонину, являющихся маркерами левого и правого плеча хромосомы III соответственно (табл. 1). На основе полученных данных определяли частоту гибридов каждого класса.

Для попарного сравнения значений общей частоты “незаконной” гибридизации и частоты отдельных классов “незаконных” гибридов использовали непараметрические статистические методы: определяли медиану по 10 независимым измерениям и 95%-ный доверительный интервал для медианы. Верхнюю и нижнюю границы доверительного интервала определяли стандартным методом, описанным в ГОСТ Р 50779.24-2005 (<https://docs.cntd.ru/document/1200039763>, дата обращения 07.02.2022). Оценку статистической

**Таблица 1.** Генетические события, выявляемые в тесте на “незаконную” гибридизацию, и фенотип соответствующих “незаконных” гибридов при использовании тестерного штамма *MATα HIS4 THR4* и штамма-партнера для скрещивания *MATα his4 thr4*

| Генетическое событие                                                                                                                                                                  | Фенотип<br>“незаконного” гибрида |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|
| Конверсия кассеты <i>HMRa</i> в локус <i>MATα</i>                                                                                                                                     | nm His+ Thr+                     |
| Реципрокная рекомбинация между локусом <i>MATα</i> и кассетой <i>HMRa</i>                                                                                                             | nm His+ Thr–                     |
| Потеря правого плеча хромосомы III                                                                                                                                                    | α His+ Thr–                      |
| Потеря хромосомы III                                                                                                                                                                  | α His– Thr–                      |
| Мутация в локусе <i>MATα</i> (в <i>MATα1</i> или <i>MATα2</i> )                                                                                                                       | α His+ Thr+                      |
| Мутации в <i>MATα</i> (одновременно в <i>MATα1</i> и <i>MATα2</i> или в двустороннем промоторе, делеции <i>MATα</i> )                                                                 |                                  |
| Временные (первичные) повреждения в локусе <i>MATα</i> (одновременно в <i>MATα1</i> и <i>MATα2</i> или в двустороннем промоторе), устранимые репарацией безошибочно после скрещивания |                                  |

Примечание. Маркеры *HIS4* и *THR4* находятся в левом и правом плечах хромосомы III соответственно.

значимости отличий проводили с использованием непараметрического критерия Манна–Уитни.

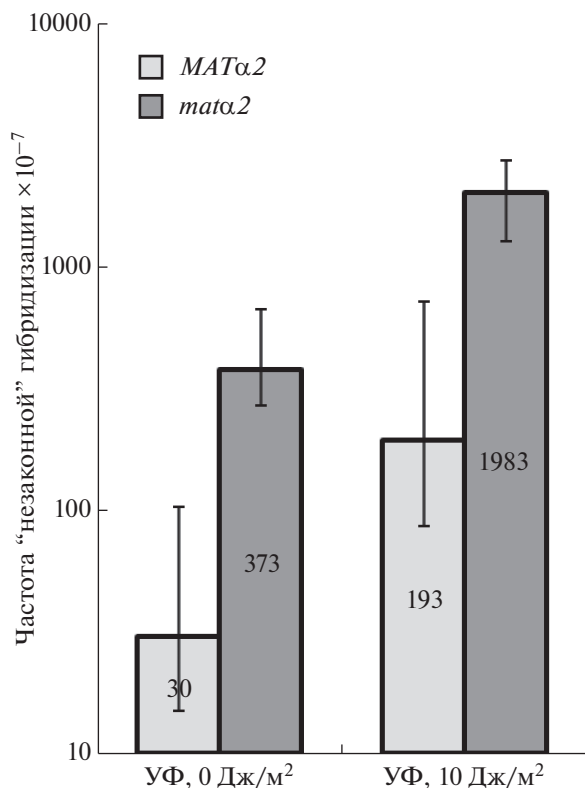
## РЕЗУЛЬТАТЫ

Для того чтобы оценить влияние мутации *mata2* на эффективность теста на “незаконную” гибридизацию мы сравнили частоту и спектр генетических нарушений, выявляемых при использовании тестерного штамма *mata2* и изогенного ему штамма дикого типа. При проведении тестов на “незаконную” гибридизацию мы оценивали частоту как спонтанных нарушений генетического материала, так и нарушений, индуцированных УФ-излучением. Для регистрации событий, приводящих к переключению типа спаривания nm → α и α → α, в качестве штамма-партнера для скрещивания использовали диплоидный штамм Д926, гомозиготный по *MATα* и маркерам хромосомы III (*his4Δ* и *thr4Δ*). Процедура проведения теста описана в разделе “Материалы и методы”.

Согласно полученным нами данным наличие мутации *mata2* в геноме тестерного штамма приводит к 10-кратному увеличению общей частоты “незаконной” гибридизации, как спонтанной, так и индуцированной УФ-излучением, по сравнению со штаммом дикого типа (рис. 1).

Для того чтобы выявить генетические события, за счет которых увеличивается частота “незаконной” гибридизации на фоне мутации *mata2*,

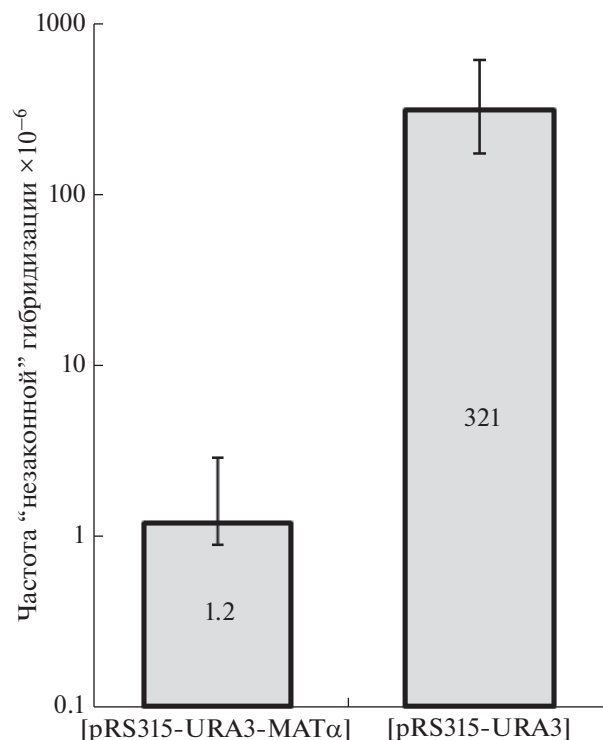
мы проверили фенотип не менее 500 “незаконных” гибридов, возникших в скрещивании штаммов *mata2* или *MATα2* со штаммом-партнером для скрещивания Д926. Затем мы определили частоту всех классов событий, учитываемых в тесте на “незаконную” гибридизацию и перечисленных в табл. 1. Результаты этого анализа представлены в табл. 2. Мы показали, что частота возникновения “незаконных” гибридов фенотипического класса “мутации и первичные повреждения в локусе *MATα*” возрастает приблизительно в 63 раза без воздействия УФ и при облучении УФ приблизительно в 6 раз. Изменения частот остальных учитываемых в альфа-тесте генетических событий у мутанта *mata2* по сравнению с *wt* незначительны, хотя статистически значимы: происходит небольшое (в 1.5 раза) повышение частоты конверсии кассеты *HMRa* в *MATα*, а также небольшое (по сравнению с изменениями в частоте класса “мутации и временные повреждения”) снижение частоты потери правого плеча хромосомы III и частоты рекомбинации *HMRa* и *MATα*. Полученные нами данные о влиянии мутации *mata2* на общую частоту “незаконной” гибридизации и частоту отдельных классов “незаконных” гибридов соответствуют ожидаемым и укладываются в модель, согласно которой за счет временных повреждений и генных мутаций переключение типа спаривания α → α происходит реже, чем переключение типа спаривания nm → α, поскольку в первом случае необходима одновременная инак-



**Рис. 1.** Частота "незаконной" гибридизации в скрещивании штаммов K5-35B-D924 (*MATα2*)  $\times$  D926 и A-K5-35B-D924 (*matα2*)  $\times$  D926. На диаграмме с логарифмической шкалой представлены медиана и доверительный интервал ( $n = 10$ ). Различия между штаммами *MATα2* и *matα2* статистически значимы по критерию Манна–Уитни ( $p$ -значение  $< 0.0001$ ).

тивация обоих генов локуса *MAT*, а во втором случае только одного из двух генов. Частота хромосомных нарушений, учитываемых в альфа-тесте, не зависит от наличия в геноме тестерного штамма мутации в одном из генов *MATα*, что также соответствует ожидаемым результатам.

Для дополнительной проверки нашего предположения о причинах более высокой частоты гибридизации в скрещивании  $\text{pm} \times \alpha$ , чем в скрещивании  $\alpha \times \alpha$ , мы провели дополнительный эксперимент, в котором оценили влияние дополнительной копии локуса *MATα* на эффективность "незаконной" гибридизации. Мы использовали штамм K5-35B-D924, трансформированный центромерной плазмидой pRS315-URA3-*MATα*, несущей полноразмерный локус *MATα*. В качестве контроля использовали трансформанты штамма K5-35B-D924, несущие вектор pRS315-URA3 без *MATα*. Данные, представленные на рис. 2, указывают на то, что введение дополнительной копии локуса *MATα* на плазмиде значительно снижает частоту "незаконной" гибридизации (приблизительно в 155 раз).



**Рис. 2.** Влияние дополнительной копии локуса *MATα* на частоту "незаконной" гибридизации. На диаграмме с логарифмической шкалой представлены медиана и доверительный интервал ( $n = 10$ ). Различия между значениями частоты "незаконной" гибридизации статистически значимы по критерию Манна–Уитни ( $p$ -значение  $< 0.0001$ ).

тельно в 155 раз). Полученные результаты подтверждают нашу гипотезу о том, что подавляющее большинство событий, приводящих к переключению типа спаривания, представляют собой изменения в локусе типа спаривания *MATα*.

## ОБСУЖДЕНИЕ

С целью повышения чувствительности тест-системы мы инактивировали ген *MATα2* у тестерного штамма, который при проведении альфа-теста подвергается обработке мутагенными факторами и переключение типа спаривания которого служит индикатором мутагенной активности исследуемых факторов. Мы показали, что мутация *matα2* в тестерном штамме на порядок повышает частоту "незаконной" гибридизации и таким образом способствует увеличению чувствительности тест-системы. Частота различных генетических событий, учитываемых в альфа-тесте, на фоне мутации *matα2* изменяется неравномерно (табл. 2). Поскольку вероятность инактивации одного гена выше, чем вероятность одновременной инактивации двух генов, переключение типа спаривания

**Таблица 2.** Частота различных генетических событий, учитываемых в альфа-тесте, при скрещивании штаммов K5-35B-D924 (*MAT $\alpha$ 2*)  $\times$  D926 и A-K5-35B-D924 (*mat $\alpha$ 2*)  $\times$  D926

| Штамм         | УФ,<br>Дж/м <sup>2</sup> | Частота генетических событий, учитываемых в альфа-тесте, $\times 10^{-7}$<br>(медиана и доверительный интервал) |                                          |                         |                                                                           |                                                             |
|---------------|--------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------|-------------------------|---------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|
|               |                          | мутации<br>и первичные<br>повреждения<br>в локусе <i>MAT<math>\alpha</math></i>                                 | потеря правого<br>плеча III<br>хромосомы | потеря III<br>хромосомы | конверсия<br>кассеты <i>HMRa</i><br>в локус <i>MAT<math>\alpha</math></i> | рекомбинация<br><i>MAT<math>\alpha</math></i> и <i>HMRa</i> |
| K5-35B-D924   | 0                        | 7.33<br>(5.4–12.0)                                                                                              | 36.2<br>(26.9–59.6)                      | 15.6<br>(11.5–25.6)     | 1.0<br>(0.7–1.7)                                                          | 0.9<br>(0.7–1.5)                                            |
|               | 10                       | 105.8<br>(58.2–137.1)                                                                                           | 91.7<br>(50.4–118.8)                     | 20.2<br>(11.1–26.2)     | 3.2<br>(1.8–4.3)                                                          | 8.9<br>(4.9–11.5)                                           |
| A-K5-35B-D924 | 0                        | 463.6***<br>(281.5–599.9)                                                                                       | 26.3*<br>(15.9–34.1)                     | 18<br>(10.9–23.3)       | 5.2***<br>(3.2–6.8)                                                       | 0                                                           |
|               | 10                       | 676.5***<br>(478.7–955.6)                                                                                       | 55.1*<br>(38.9–77.8)                     | 13.2<br>(9.3–18.6)      | 5.9**<br>(4.2–8.4)                                                        | 2.4***<br>(1.7–3.4)                                         |

Примечание. \*—\*\*\* — значения частоты для штамма с мутацией *mat $\alpha$ 2*, которые статистически значимо отличаются от значения для штамма дикого типа в тех же условиях (\* *p*-значение < 0.05; \*\* *p*-значение = 0.001; \*\*\* *p*-значение  $\leq$  0.0001).

nm  $\rightarrow$  а происходит с большей частотой, чем  $\alpha \rightarrow$  а. Частота хромосомных нарушений, учитываемых в альфа-тесте, не зависит от наличия в геноме тестерного штамма мутации *mat $\alpha$ 2*, что также соответствует ожидаемым результатам. Дополнительное подтверждение данной модели мы получили при изучении влияния дополнительной копии *MAT $\alpha$*  на частоту “незаконной” гибридизации. Так, мы показали, что при внесении дополнительного локуса *MAT $\alpha$*  на центромерной плазмиде частота образования “незаконных” гибридов снижается приблизительно в 155 раз. Этот результат согласуется с данными, опубликованными ранее, о том, что при проведении тестов на “незаконную” гибридизацию и “незаконную” цитодукцию с использованием штаммов-дисомиков по третьей хромосоме и диплоидов, т.е. штаммов, содержащих две копии локуса *MAT $\alpha$* , частота образования “незаконных” гибридов и цитодуктантов снижается настолько, что невозможно отобрать колонии в количестве, достаточном для определения значения частоты [3].

Таким образом, результаты, полученные нами в рамках настоящей работы, позволили выявить такие способы изменения генотипа штаммов, используемых в альфа-тесте, которые повышают чувствительность и эффективность тест-системы. Эти модификации были апробированы, а их эффективность проверена экспериментально. Ис-

пользование полученного нами штамма A-K5-35B-D924, несущего мутацию *mat $\alpha$ 2*, значительно повышает разрешающую способность альфа-теста в отношении генных мутаций и временных повреждений *MAT $\alpha$* . В отличие от классического варианта альфа-теста, когда скрещивают два штамма одинакового альфа-типа спаривания, в предлагаемом нами варианте тест-системы с использованием мутанта *mat $\alpha$ 2* используют скрещивание стерильного штамма nm со штаммом  $\alpha$ -типа спаривания. В последнем варианте, который мы предлагаем назвать nm-тест, учитывают генетические нарушения, приводящие к переключению типа спаривания nm  $\rightarrow$  а.

Для дальнейшего повышения чувствительности тестерного штамма перспективным может стать использование мутантов по генам различных систем репарации или генам, ответственным за биосинтез клеточной стенки, а также использование сверхэкспрессии генов ДНК-полимераз, способных осуществлять синтез на поврежденной матрице. Подобные модификации используются в тесте Эймса, являющемся “золотым стандартом” генетической токсикологии [18, 19]. Использование мутантов по генам, контролирующим структуру клеточной стенки, может увеличить чувствительность к мутагенным агентам за счет повышения ее проницаемости для химических веществ и физических факторов, а внося дефекты систем репа-

рации и устойчивости к повреждениям ДНК, можно повысить чувствительность к факторам, вызывающим повреждения ДНК или генные мутации.

Авторы благодарны ресурсному центру СПбГУ “Развитие молекулярных и клеточных технологий” за содействие в проведении исследования.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 20-04-00663.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием в качестве объекта животных.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием в качестве объекта людей.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Inge-Vechtomov S.G., Pavlov Y.I., Noskov V.N. et al. Tests for genetic activity in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: Study of forward and reverse mutation, mitotic recombination and illegitimate mating induction // Progress in Mutation Research. Evaluation of short-term tests for carcinogens: Report of the International Programme on Chemical Safety's collaborative study on in vitro assays. Amsterdam: The Netherlands Elsevier, 1985. P. 243–255.
2. Инге-Вечтомов С.Г., Репневская М.В., Карпова Т.С. Изучение скрещивания клеток одинакового типа спаривания у дрожжей сахаромисетов // Генетика. 1986. Т. 22. № 11. С. 2625–2636.
3. Репневская М.В. Наследуемые и ненаследуемые изменения типа спаривания у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*: Дис. ... канд. биол. наук., Л.: ЛГУ, 1989. 210 с.
4. Lemoine F.J., Degtyareva N.P., Lobachev K., Petes T.D. Chromosomal translocations in yeast induced by low levels of DNA polymerase: A model for chromosome fragile sites // Cell. 2005. V. 120. P. 587–598. <https://doi.org/10.1134/S000629791101007X>
5. Kochenova O.V., Soshkina Y.V., Stepchenkova E.I. et al. Participation of translesion synthesis DNA polymerases in the maintenance of the chromosome integrity in yeast *Saccharomyces cerevisiae* // Biochemistry (Moscow). 2011. V. 76. № 1. P. 49–60. <https://doi.org/10.1134/S000629791101007X>
6. Novoa C.A., Ang J.S., Stirling P.C. The A-like faker assay for measuring yeast chromosome III stability // Methods Mol. Biol. 2018. V. 1672. P. 1–9. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7306-4\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7306-4_1)
7. Жук А.С., Степченкова Е.И., Инге-Вечтомов С.Г. Выявление модификаций первичной структуры ДНК, возникших под действием аналога азотистых оснований 6-N-гидроксиламинопурина, в альфа-тесте у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* // Экол. генетика. 2020. Т. 18. № 3. С. 357–367. <https://doi.org/10.17816/ecogen34581>
8. Репневская М.В., Кашкин П.К., Инге-Вечтомов С.Г. Модификационные изменения генетического материала у дрожжей сахаромисетов // Генетика. 1989. Т. 25. № 3. С. 425–436.
9. Haber J.E. Mating-type genes and MAT switching in *Saccharomyces cerevisiae* // Genetics. 2012. V. 191. P. 33–64. <https://doi.org/10.1534/genetics.111.134577>
10. Herskowitz I. Life cycle of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* // Microbiol. Reviews. 1989. V. 52. P. 536–553. <https://doi.org/10.1128/MR.52.4.536-553.1988>
11. Siliciano P.G., Tatchell K. Transcription and regulatory signals at the mating-type locus in yeast // Cell. 1984. V. 37. P. 969–978. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(84\)90431-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(84)90431-8)
12. Kassir Y., Simchen G. Regulation of mating and meiosis in yeast by the mating-type region // Genetics. 1976. V. 82. P. 187–206. <https://doi.org/10.1093/genetics/82.2.187>
13. Hagen D.C., Bruhn L., Westby C.A., Sprague G.F. Jr. Transcription of alpha-specific genes in *Saccharomyces cerevisiae*: DNA sequence requirements for activity of the coregulator alpha 1 // Mol. Cell. Biol. 1993. V. 13. P. 6866–6875. <https://doi.org/10.1128/mcb.13.11.6866-6875.1993>
14. Bruhn L., Sprague G.F. Jr. MCM1 point mutants deficient in expression of alpha-specific genes: Residues important for interaction with alpha 1 // Mol. Cell. Biol. 1994. V. 14. P. 2534–2544. <https://doi.org/10.1128/MCB.14.4.2534>
15. Степченкова Е.И., Коченова О.В., Инге-Вечтомов С.Г. “Незаконная” гибридизация и “незаконная” цитодукция у гетероталличных дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* как система для анализа генетической активности экзогенных и эндогенных факторов в “альфа-тесте” // Вестник Санкт-Петербургского ун-та. Сер. 3. 2009. Вып. 4. С. 129–140.
16. Инге-Вечтомов С.Г. Идентификация некоторых групп сцепления у Петергофских генетических линий дрожжей // Генетика. 1971. Т. 7. № 9. С. 113–123.
17. Rose M.D., Winston F., Hieter P. Methods in Yeast Genetics. CSHL Press, 1990. 198 с.
18. Maron D.M., Ames B.N. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test // Mutat. Res. 1983. V. 113. P. 173–215. [https://doi.org/10.1016/0165-1161\(83\)90010-9](https://doi.org/10.1016/0165-1161(83)90010-9)
19. Mortelmans K., Zeiger E. The ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay // Mutat. Res. 2000. V. 455. P. 29–60. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(00\)00064-6](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(00)00064-6)

## **nm-Test – An Improved Version of the Alpha-Test in Yeast *Saccharomyces cerevisiae* with a Higher Sensitivity to Genotoxic Factors**

**E. I. Stepchenkova<sup>a, b, \*</sup>, Yu. V. Andreychuk<sup>a</sup>, D. V. Afanasova<sup>b</sup>,  
S. P. Zadorsky<sup>a, b</sup>, and S. G. Inge-Vechtomov<sup>a, b</sup>**

<sup>a</sup>*Vavilov Institute of General Genetics, Saint-Petersburg Branch, Russian Academy of Sciences,  
Saint-Petersburg, 199034 Russia*

<sup>b</sup>*Saint Petersburg State University, Department of Genetics and Biotechnology, Saint Petersburg, 199034 Russia*

*\*e-mail: stepchenkova@gmail.com*

One of the urgent problems of genetic toxicology is the development of new and improvement of existing test systems for the detection and assessment of the level of mutagenic and carcinogenic activity of various factors. A unique position among the known test systems belongs to the alpha test, that is based on the life cycle of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Its main difference from existing test systems is the ability to detect a wide range of genetic events, such as gene mutations, conversion, recombination, loss of the right arm and the entire III chromosome, as well as primary lesions to the genetic material before they are eliminated by repair systems. Here, we proposed and tested a genetic modification of tester strains that increased the sensitivity and efficiency of the test system. Our results allowed us to conclude that the proposed modification of the tester strain led to the sensitivity increase of the test system by an order of magnitude.

**Keywords:** alpha-test, nm-test, genetic toxicology, gene mutations, primary lesions.