



ВЫЯВЛЕНИЕ МОДИФИКАЦИЙ ПЕРВИЧНОЙ СТРУКТУРЫ ДНК, ВОЗНИКШИХ ПОД ДЕЙСТВИЕМ АНАЛОГА АЗОТИСТЫХ ОСНОВАНИЙ 6-*N*-ГИДРОКСИЛАМИНОПУРИНА, В АЛЬФА-ТЕСТЕ У ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

© А.С. Жук¹, Е.И. Степченкова^{2,3}, С.Г. Инге-Вечтомов^{2,3}

¹Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский университет ИТМО», Санкт-Петербург;

²Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Санкт-Петербургский филиал, Санкт-Петербург;

³Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия

Для цитирования: 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* // Экологическая генетика. — 2020. — Т. 18. — № 3. — С. 357–366. <https://doi.org/10.17816/ecogen34581>.

Поступила: 20.02.2020

Одобрена: 31.07.2020

Принята: 23.09.2020

✿ Альфа-тест позволяет выявлять активность различных генотоксических факторов, вызывающих как наследуемые (мутационные и рекомбинационные), так и ненаследуемые (модификационные) изменения генетического материала. Уникальной особенностью альфа-теста является то, что он позволяет изучать фенотипическое проявление первичных повреждений генетического материала еще до их «безошибочного» устранения системами репарации. Альфа-тест основан на использовании системы генетической регуляции клеточного типа и особенностей переключения типа спаривания у гетероталлических дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. В этой работе с использованием мутагенного аналога оснований 6-*N*-гидроксиламинопурина (ГАП) мы оценили эффективность альфа-теста для выявления таких повреждений генетического материала, как модификации оснований ДНК, а также изучили способность повреждений ДНК, вызванных ГАП, проявляться фенотипически. Альфа-тест проводили в двух взаимодополняющих вариантах: «незаконной» гибридизации и «незаконной» цитодукции, что позволило оценить частоту наследуемых и ненаследуемых изменений, индуцированных ГАП. Мы показали, что обработка клеток ГАП повышает частоту не только точечных мутаций, но и временных повреждений генетического материала, учитываемых в альфа-тесте. Полученные результаты указывают на то, что модификации оснований могут иметь собственное фенотипическое проявление, а альфа-тест обладает достаточной чувствительностью для выявления модификаций оснований ДНК.

✿ **Ключевые слова:** альфа-тест; 6-*N*-гидроксиламинопурин; модификации оснований; первичные повреждения; генетическая токсикология.

DETECTION OF THE DNA PRIMARY STRUCTURE MODIFICATIONS INDUCED BY THE BASE ANALOG 6-*N*-HYDROXYLAMINOPURINE IN THE ALPHA-TEST IN YEAST *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

© A.S. Zhuk¹, E.I. Stepenkova^{2,3}, S.G. Inge-Vechtomov^{2,3}

¹ITMO University, Saint Petersburg, Russia;

²Vavilov Institute of General Genetics Russian Academy of Science, Saint Petersburg branch, Saint Petersburg, Russia;

³St. Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia

Cite this article as: Zhuk AS, Stepenkova EI, Inge-Vechtomov SG. Detection of the DNA primary structure modifications induced by the base analog 6-*N*-hydroxylaminopurine in the alpha-test in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Ecological genetics*. 2020;18(3):357-366. <https://doi.org/10.17816/ecogen34581>.

Received: 20.02.2020

Revised: 31.07.2020

Accepted: 23.09.2020

✿ **Background.** The alpha-test allows to detect inherited genetic changes of different types, as well as phenotypic expression of primary DNA lesions before the lesions are fixed by repair. Here we investigate ability of the alpha-test to detect base modifications induced by 6-*N*-hydroxylaminopurine (HAP) and determine frequency of inherited and non-inherited genetic changes in yeast strains treated with HAP. **Materials and methods.** The alpha-test is based on mating type regulation and detects cell type switch from α to a in heterothallic yeast *Saccharomyces cerevisiae*. The frequency of

mating type switching reflects level of both spontaneous and induced by a mutagen DNA instability. The alpha-test may be performed in two variants: “illegitimate” hybridization and cytoduction. Conducting both complementary tests and analysis of phenotypes of the “illegitimate” hybrids and cytoductants allows to detect the full spectrum of genetic events that lead to mating type switching, such as chromosome III loss and chromosome III arm loss, mutations and temporary lesions, recombination and conversion. **Results.** HAP increases the frequency of illegitimate hybridization by 5-fold, and illegitimate cytoduction by 10-fold. A large proportion of the primary lesions induced by HAP causes temporary mating type switch and the remainder parts are converted into inherited point mutations. **Conclusion.** The alpha-test can detect HAP-induced base modifications and may be used to investigate the ratio between correct and error-prone processing of such primary DNA lesions. Like other genetic toxicology tests the alpha-test has limitations, which are discussed.

✿ **Keywords:** alpha-test; 6-*N*-hydroxylaminopurin; base modifications; primary DNA lesions; genetic toxicology.

ВВЕДЕНИЕ

Альфа-тест — это метод генетической токсикологии, который позволяет выявлять широкий спектр генетических нарушений, таких как генные мутации, потеря целой хромосомы или плеча хромосомы, генная конверсия и рекомбинация, а также первичные (предмутационные) повреждения ДНК [1–3]. Последнее особенно важно, поскольку с использованием альфа-теста можно изучать фенотипическое проявление первичных повреждений, определять их частоту и оценивать долю тех первичных повреждений, которые в ходе репарации были устранены безошибочно или превратились в наследуемые изменения. Альфа-тест основан на особенностях регуляции типа спаривания у гетероталличных дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. В альфа-тесте мутагенную активность различных факторов определяют по способности мутагена индуцировать переключение типа спаривания $\alpha \rightarrow a$ у гаплоидных клеток дрожжей-сахаромицетов. Гаплоидные клетки *S. cerevisiae* могут иметь тип спаривания α или a , определяемый локусом *MAT*, расположенным в правом плече, вблизи центромеры хромосомы III. В локусе *MAT* у штаммов α - и a -типа спаривания находятся альтернативные последовательности *MAT α* и *MAT a* соответственно, которые принято называть идиоморфами [4]. *MAT α* содержит два гена *MAT α 1* и *MAT α 2*, которые находятся под контролем общего двустороннего промотора и кодируют транскрипционные факторы. Продукт *MAT α* активирует транскрипцию α -специфичных генов (*asg*), а белок, кодируемый *MAT α 2*, подавляет экспрессию a -специфичных генов (*asg*). В результате структурных повреждений генетического материала или мутаций *MAT α* , приводящих к одновременной инактивации обоих генов *MAT α 1* и *MAT α 2*, происходит переключение типа спаривания $\alpha \rightarrow a$, поскольку при этом экспрессируются только *asg*.

Вследствие этого клетки, исходно имевшие тип спаривания α , приобретают способность скрещиваться с α -клетками. Генетическая информация о типе спаривания у дрожжей хранится также в молчащих касетах *HMR α* и *HML α* , которые находятся в правом и левом плечах вблизи теломеров хромосомы III соответственно. У гомоталличных штаммов дрожжей, в отличие от гетероталличных штаммов, при прорастании аскоспор регулярно происходит генетически детерминированное переключение типа спаривания за счет замещения последовательности локуса *MAT* альтернативной последовательностью одной из касет. У гетероталличных штаммов спонтанное переключение типа спаривания $\alpha \rightarrow a$ происходит с очень низкой частотой (10^{-7}), которая увеличивается при воздействии на клетку ДНК-повреждающих агентов, за счет повышения как частоты повреждений и мутаций *MAT α* , так и частоты рекомбинации и конверсии между *MAT α* и *HMR α* . Таким образом, в альфа-тесте показателем генотоксической активности исследуемого фактора является частота переключения типа спаривания $\alpha \rightarrow a$, значение которой можно определить по частоте возникновения «незаконных» гибридов двух штаммов одинакового типа спаривания α . К переключению типа спаривания $\alpha \rightarrow a$ приводят следующие генетические события, затрагивающие локус *MAT α* : первичные повреждения и генные мутации, потеря целой хромосомы III или ее правого плеча вместе с локусом *MAT α* , а также конверсия и рекомбинация, в результате которой в локус *MAT α* из молчащей касеты *HMR α* переходит информация о типе спаривания a .

В альфа-тесте для оценки частоты переключения типа спаривания два штамма одинакового типа спаривания α , несущих комплементарные селективные маркеры, высевают для отбора «незаконных» гибридов на селективную среду, на которой не могут расти родительские штаммы. В норме гибридизация

происходит только между клетками противоположных типов спаривания. При скрещивании штаммов одинакового типа спаривания α гибридизация клеток становится возможной, только если клетки тестерного штамма, который подвергается воздействию мутагена, переключают свой тип спаривания $\alpha \rightarrow a$. Штаммы, используемые в альфа-тесте, несут генетические маркеры, позволяющие проводить не только селекцию гибридов, но и идентифицировать все генетические события, которые привели к переключению типа спаривания $\alpha \rightarrow a$.

Для выявления всех событий, приводящих к нарушению экспрессии локуса *MATa*, альфа-тест проводят в двух взаимодополняющих вариантах: «незаконная» гибридизация и «незаконная» цитодукция. В системе «незаконной» гибридизации можно оценить частоту потери целой хромосомы III и ее правого плеча, конверсии и рекомбинации, а также частоту генных мутаций и временных повреждений локуса *MATa*, учитываемых совместно. Для того чтобы определить частоту генных мутаций и частоту временных повреждений в локусе *MATa* в отдельности, необходимо проводить альфа-тест в системе «незаконной» цитодукции. Для того чтобы выяснить, какое из перечисленных генетических событий привело к переключению типа спаривания $\alpha \rightarrow a$, необходимо проанализировать фенотип возникших «незаконных» гибридов и цитодуктантов (рис. 1). Определив частоту всех фенотипических классов гибридов и цитодуктантов, учитываемых в альфа-тесте, можно количественно оценить долю тех первичных повреждений ДНК, которые были устранены безошибочно, но за время своего существования в клетке успели повлиять на ее фенотип (привести к временному переключению типа спаривания $\alpha \rightarrow a$), и долю тех первичных повреждений, которые закрепились в виде мутаций, привели к потере хромосомы III или ее правого плеча, а также индуцировали генную конверсию и рекомбинацию. Подробнее теоретические основы альфа-теста описаны в наших предыдущих работах [2, 5–7].

Ранее с использованием альфа-теста был протестирован целый ряд физических и химических мутагенов: ультрафиолетовое излучение, этилметансульфонат, 2-аминофлуорен, 1,2,7,8-диэпоксиктан, β -пропиолактон, *N*-метил-*N'*-нитро-*N*-нитрозогуанидин, циклофосфамид, диэтилгексилфтолат, акрилонитрил диэтилстильбестрол, а также изучен эффект инактивации генов ДНК-полимераз, уча-

ствующих в синтезе ДНК в обход повреждений, и генов репарации ДНК с двунитевыми разрывами [2, 3, 5, 6, 9]. Таким образом, было показано, что альфа-тест является чувствительной тест-системой для выявления мутагенов, вызывающих как генные мутации, так и хромосомные нарушения, а также может быть использован для изучения фундаментальных механизмов мутагенеза и репарации.

Несмотря на доказанную эффективность альфа-теста для выявления активности мутагенов с различным механизмом действия, практически ничего не известно о чувствительности альфа-теста по отношению к целой группе мутагенов, представляющих собой аналоги азотистых оснований ДНК. В этой работе мы проверили чувствительность альфа-теста с использованием аналога аденина — 6-*N*-гидроксиламинопурина (ГАП). ГАП в форме нуклеотида встраивается в ДНК при репликации напротив тимина или цитозина, а при последующих раундах репликации ошибочное включение ГАП напротив цитозина приводит к появлению транзиции [10, 11] (рис. 2). Именно способность ГАП образовывать пары как с тиминном, так и с цитозином обуславливает его мутагенные свойства и репликативный механизм мутагенного действия. ГАП является универсальным мутагеном для многих про- и эукариотических организмов, включая млекопитающих, и обладает сильным мутагенным эффектом [10–16]. У дрожжей ни одна из систем репарации не способна узнавать и удалять ГАП из ДНК [17]. Поэтому у дрожжей, в отличие от *Escherichia coli* и человека, ГАП не способен индуцировать рекомбинацию и появление одонитевых или двунитевых разрывов ДНК, которые часто возникают в ходе репарации [17, 18]. Будучи встроенным в ДНК, ГАП у дрожжей индуцирует исключительно генные мутации типа транзиций GC \rightarrow AT или AT \rightarrow GC [12, 19–21] (рис. 2). ГАП чаще индуцирует замены GC \rightarrow AT, что было показано в системах индукции реверсий по генам *URA3* и *LYS2* у *S. cerevisiae* [19, 20], а также при секвенировании ДНК гаплоидных и диплоидных штаммов дрожжей, обработанных ГАП [12]. В связи с этими свойствами мы выбрали ГАП в качестве эталонного мутагена для оценки эффективности альфа-теста по отношению к аналогам азотистых оснований. С использованием альфа-теста мы оценили спектр и частоту наследуемых и ненаследуемых изменений генетического материала, индуцированных ГАП.

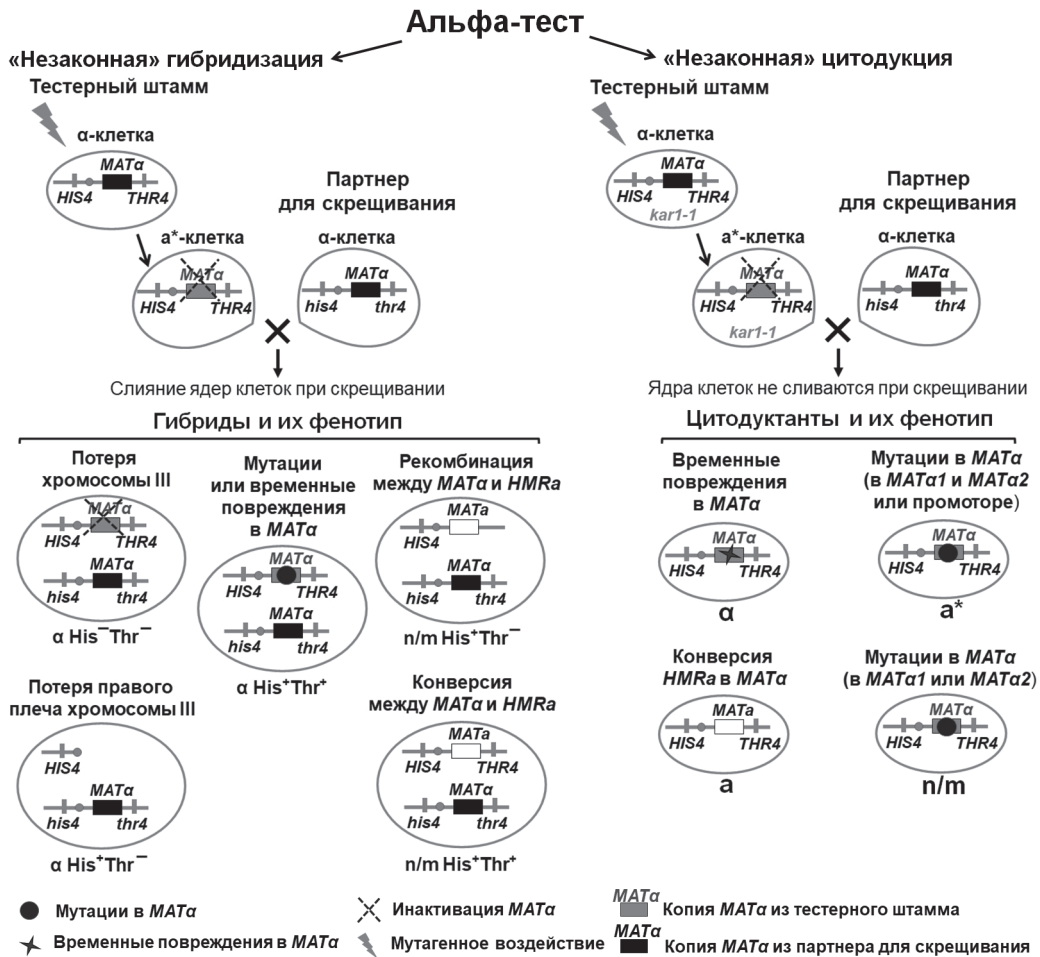


Рис. 1. Генетические события, выявляемые в альфа-тесте в системах «незаконной» гибридизации и цитодукции.
Примечание. В системе «незаконной» гибридизации оценивают частоту образования диплоидных гибридов в скрещиваниях штаммов дрожжей α-типа спаривания. В системе «незаконной» цитодукции используют тестерный штамм, несущий мутацию *kar1-1* [8], которая нарушает карิโอгамию. Кроме того, для отбора цитодуктантов тестерный штамм несет рецессивный маркер устойчивости к антибиотиком циклогексимиду — *cyh^r* и цитоплазматический маркер [ρ⁰] [1]. Эти генетические маркеры позволяют в селективных условиях отбирать гаплоидные клетки со смешанной цитоплазмой обоих штаммов и ядром тестерного штамма, которое несло временное или наследуемое изменение генетического материала, приведшее к переключению типа спаривания. В результате цитодукции появляются гаплоиды с ядром тестерного штамма и митохондриями от штамма-партнера для скрещивания, являющегося донором цитоплазмы. Все учитываемые в альфа-тесте изменения рецессивны, поэтому для снижения вероятности переключения типа спаривания у штамма-партнера для скрещивания в качестве такого штамма используют автодиплоид, гомозиготный по *MATα*. Фенотип n/m — не скрещивающийся, a* — рецессивный a (при полной инактивации локуса *MATα* клетки приобретают способность скрещиваться с α клетками) [1, 2, 6]

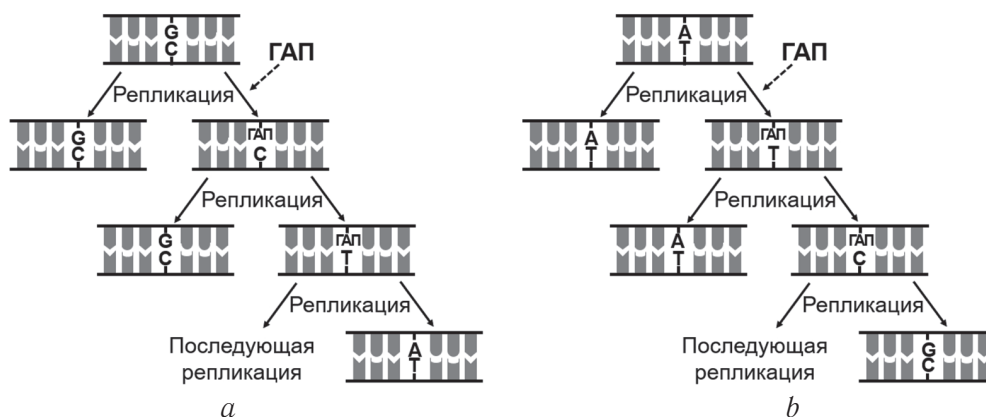


Рис. 2. Включение 6-*N*-гидроксиламинопурина (ГАП) в ДНК при репликации и механизм возникновения генных мутаций (транзиций): а — замен GC → AT; б — замен AT → GC

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Штаммы и условия культивирования

В работе использовали гаплоидные штаммы гетероталлических дрожжей *S. cerevisiae*: тестерный штамм для «незаконной» гибридизации K5-35B-Д924 (*MATα ura3Δ leu2Δ met15Δ lys5:: KanMX cyh^r*), тестерный штамм для «незаконной» цитодукции K5-35B-Д924-*kar1-1* (*MATα ura3Δ leu2Δ met15Δ lys5:: KanMX cyh^r kar1-1 [rho⁻]*), партнер для скрещивания — донор цитоплазмы Д926 (*MATα//MATα ADE1//ade1Δ leu2Δ//leu2Δ lys2Δ//lys2Δ ura3Δ//ura3Δ his4Δ//his4Δ thr4Δ//thr4Δ CYH^r [rho⁺]*), тестеры типа спаривания 78А-П2345 *MATα his5* и 2Г-П2345 *MATα his5* [2]. Дрожжи выращивали на твердой и в жидкой полных средах YEPD, и на минимальной среде MD, содержащей необходимые аминокислоты, азотистые основания, витамины и микроэлементы [22]. Для приготовления твердых сред использовали агар фирм Sigma или Difco в концентрации 20 г/л. Среду для отбора «незаконных» гибридов готовили на основе среды MD с добавлением L-гистидина (20 мг/л), L-треонина (150 мг/л), урацила (20 мг/л), L-лейцина (60 мг/л). Среду для отбора «незаконных» цитодуктантов готовили на основе среды MD без глюкозы с добавлением этилового спирта (20 мл/л), антибиотика циклогексимида (5 мг/л), L-метионина (20 мг/л), L-лейцина (60 мг/л), L-лизина (30 мг/л) и урацила. Дрожжи выращивали при температуре 30 °С. Для обработки клеток ГАП использовали независимые культуры тестерного штамма, находящиеся в стадии экспоненциального роста культуры. Дрожжи выращивали в течение 16 ч в жидкой среде YEPD, содержащей ГАП в концентрации 50 мг/л. Затем клетки, обработанные таким образом, использовали в тестах на «незаконную» гибридизацию и цитодукцию.

Альфа-тест

Для определения частоты «незаконной» гибридизации 50–100 мкл ночной культуры клеток тестерного штамма K5-35B-Д924 и штамма-партнера для скрещивания Д926 высевали совместно на селективную среду для отбора гибридов. В системе «незаконной» цитодукции в качестве тестерного использовали штамм K5-35B-Д924-*kar1-1*. При этом оба штамма (K5-35B-Д924-*kar1-1*

и Д926) сначала высевали на полную среду YEPD и инкубировали совместно 48 ч, а затем перепечатывали на селективную среду для отбора цитодуктантов, перед высевом на чашки ночные культуры обоих штаммов концентрировали в 10 раз до плотности клеток приблизительно 10^9 кл/мл. Параллельно для оценки выживаемости в тестах на «незаконную» гибридизацию и цитодукцию культуру тестерного штамма разводили в 10^4 или 10^5 раз соответственно, и высевали (100 мкл) на твердую среду YEPD. Подсчет числа колоний, образованных выжившими клетками, и колоний «незаконных» гибридов проводили на третий день инкубации, а учет количества выросших цитодуктантов через 10 дней после перепечатывания на селективную среду. В каждом эксперименте использовали по 10–12 независимых культур, проводили не менее трех экспериментов. Для анализа фенотипа «незаконных» гибридов и цитодуктантов с целью их дальнейшего распределения по фенотипическим классам, учитываемым в альфа-тесте, отбирали не менее 500 гибридов и цитодуктантов для каждого типа экспериментальных условий. Затем отобранные гибриды и цитодуктанты проверяли на наличие ауксотрофностей, а также определяли тип спаривания. Частоту каждого фенотипического класса определяли путем умножения доли класса на общую частоту «незаконной» гибридизации или цитодукции в каждой культуре. Статистическую значимость различий между значениями частоты спонтанных и индуцированных ГАП нарушений генетического материала проверяли с помощью критерия Манна–Уитни с уровнем значимости 0,05 [23]. На графиках, иллюстрирующих частоту разных классов генетических нарушений, представляли медиану и ее доверительный интервал, определенный стандартным методом по ГОСТ Р 50779.24-2005. Статистическую значимость различий между сравниваемыми долями классов гибридов или цитодуктантов оценивали с помощью Z-критерия с поправкой на непрерывность [23]. Доверительный интервал для долей рассчитывали с помощью метода Уилсона (Score) [24].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Мы показали, что обработка клеток ГАП повышает общую частоту «незаконной» гибридизации приблизительно в 5 раз. Так, частота спонтанной

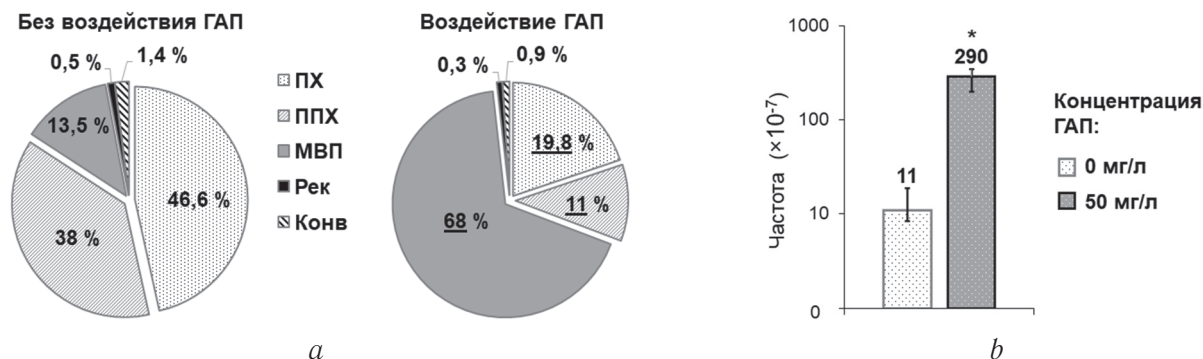


Рис. 3. Распределение классов генетических событий, выявляемых в тесте на «незаконную» гибридизацию, возникших спонтанно и при воздействии ГАП, в процентном соотношении (а) и частота спонтанных и индуцированных ГАП мутаций и временных повреждений в тесте на «незаконную» гибридизацию (b). На графике представлена медиана для частот и ее доверительный интервал. ПХ — потеря хромосомы III; ППХ — потеря правого плеча хромосомы III; МВП — мутации и временные повреждения в локусе *MATa*; Рек — реципрокная рекомбинация между локусом *MATa* и каскадой *HMRa*; Конв. — конверсия каскады *HMRa* в локус *MATa*. * Значения статистически значимо отличаются от частоты тех же событий, возникающих спонтанно, по критерию Манна – Уитни ($p < 0,0001$). Подчеркиванием отмечено статистически значимое изменение доли соответствующего класса генетических событий после обработки ГАП по сравнению со спонтанным уровнем по Z-критерию

«незаконной» гибридизации составила $83 \cdot 10^{-7}$ [63–140], а после обработки клеток ГАП значительные частоты выросло до $425 \cdot 10^{-7}$ [297–510]. Для того чтобы определить тип генетических нарушений, приводящих к повышению частоты переключения типа спаривания $\alpha \rightarrow a$, мы определили долю каждого фенотипического класса «незаконных» гибридов, учитываемых в альфа-тесте (рис. 3, а). Для этого мы отобрали 1322 «незаконных» гибрида, возникших спонтанно, и 892 «незаконных» гибрида, индуцированных ГАП. Отобранные гибриды мы проверили на наличие ауксотрофности по гистидину и треонину, а также на тип спаривания (см. разд. «Материалы и методы»). Результаты этого анализа позволили нам определить процентное соотношение всех фенотипических классов «незаконных» гибридов, учитываемых в альфа-тесте. Так, под действием ГАП значительно (с 13,5 до 68 %) возрастает доля фенотипического класса гибридов $\alpha \text{ His}^+ \text{ Thr}^+$, которые возникают в результате мутаций или временных повреждений в локусе *MATa*. Это возрастание доли класса $\alpha \text{ His}^+ \text{ Thr}^+$ происходит за счет снижения доли всех остальных классов «незаконных» гибридов, учитываемых в альфа-тесте: $\alpha \text{ His}^- \text{ Thr}^-$ (потеря III хромосомы), $\alpha \text{ His}^+ \text{ Thr}^-$ (потеря правого плеча III хромосомы); $p/m \text{ His}^+ \text{ Thr}^-$ (рекомбинация между *MATa* и *HMRa*) и $p/m \text{ His}^+ \text{ Thr}^+$ (конверсия между *MATa* и *HMRa*) (рис. 3, а).

На следующем этапе мы определили значения абсолютной частоты возникновения «незакон-

ных» гибридов с фенотипом $\alpha \text{ His}^+ \text{ Thr}^+$ (мутации и временные повреждения) в культурах, обработанных ГАП, и культурах без обработки мутагеном. Для этого мы определили отношение числа «незаконных» гибридов с фенотипом $\alpha \text{ His}^+ \text{ Thr}^+$ к числу живых клеток в каждой культуре. Этот показатель, в отличие от относительной частоты, измеряемой в процентах, нагляднее демонстрирует влияние ГАП на индукцию «незаконных» гибридов указанного класса. Как следует из данных, представленных на рис. 3, b, под действием ГАП частота возникновения «незаконных» гибридов $\alpha \text{ His}^+ \text{ Thr}^+$ возрастает более чем в 20 раз. Полученные результаты согласуются с литературными данными, что ГАП у дрожжей является сильным мутагеном, вызывая транзиции [10, 12, 15].

Тест на «незаконную» гибридизацию не позволяет отличать гибриды, возникшие в результате мутации в локусе *MATa*, от гибридов, к возникновению которых привели временные (предмутационные) изменения генетического материала, поскольку в обоих случаях гибриды имеют фенотип $\alpha \text{ His}^+ \text{ Thr}^+$. Эту задачу решает тест на «незаконную» цитодукцию, результаты которого представлены на рис. 4. Мы показали, что ГАП повышает общую частоту «незаконной» цитодукции на порядок с 10^{-7} до 10^{-6} . Для того чтобы определить, за счет каких генетических нарушений происходит увеличение частоты «незаконной» цитодукции, мы отобрали 1327 цитодуктантов, возникших спонтанно, и 732 цитодуктанта, возникших после

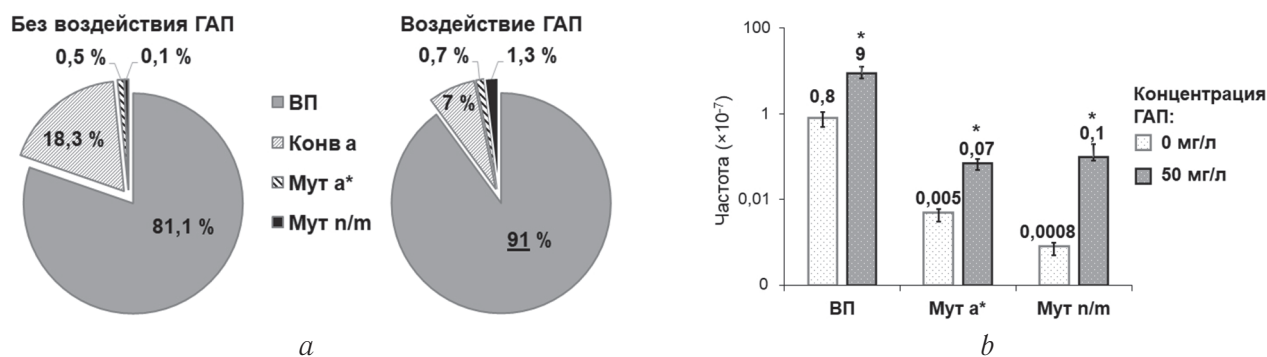


Рис. 4. Распределение классов генетических событий, выявляемых в тесте на «незаконную» цитодукцию, в процентном соотношении, возникших спонтанно и при воздействии ГАП (*a*) и частота спонтанных и индуцированных ГАП наследуемых и ненаследуемых изменений генетического материала в тесте на «незаконную» цитодукцию (*b*). ВП — временные повреждения в локусе *MATa* (одновременно в *MATa1* и *MATa2*, или в двустороннем промоторе); Конв. — конверсия кассеты *HMRa* в локус *MATa*; Мут а* — мутации одновременно в *MATa1* и *MATa2*, или в двустороннем промоторе, делеции *MATa*; Мут. п/м — мутации в *MATa1* или *MATa2*; * — значения статистически значимо отличаются от частоты тех же событий, возникающих спонтанно, по критерию Манна — Уитни ($p < 0,0001$). Подчеркиванием отмечено статистически значимое изменение доли класса генетических событий после обработки ГАП по сравнению с соответствующей долей спонтанных событий по Z-критерию

обработки клеток ГАП. Отобранные цитодуктанты были проверены на тип спаривания и наличие ауксотрофностей. На основе полученных данных мы определили процентное соотношение цитодуктантов различных фенотипических классов, возникших в различных экспериментальных условиях (рис. 4, *a*). Оказалось, что под действием ГАП повышается доля фенотипических классов цитодуктантов, возникающих в результате следующих генетических нарушений: временные повреждения в локусе *MATa* (цитодуктанты имеют тип спаривания α), мутации одновременно в *MATa1* и *MATa2*, или в двустороннем промоторе, делеции *MATa* (цитодуктанты имеют тип спаривания α^* — рецессивный α) и мутации в одном из генов *MATa1* или *MATa2* (цитодуктанты стерильны — п/м). Последний класс мог появляться только в результате первоначального повреждения *MATa1* и *MATa2* одновременно с последующей (после спаривания) репарацией одного из генов. Доля цитодуктантов, возникающих в результате генной конверсии между *MATa* и молчащей кассетой *HMRa* (цитодуктанты имеют тип спаривания α), напротив, снижалась (рис. 4, *a*).

Мы определили значения абсолютной частоты возникновения «незаконных» цитодуктантов различных фенотипических классов. ГАП значительно индуцирует частоту цитодуктантов α^* и п/м, в 14 и 125 раз (рис. 4, *b*) соответственно, по сравнению со спонтанным уровнем. Наряду с ожидаемыми результатами, что ГАП на несколько порядков

повышает частоту генных мутаций в одном или обоих генах *MATa*, оказалось, что под действием ГАП в 11 раз повышается частота учитываемых в альфа-тесте временных повреждений в локусе *MATa* (цитодуктанты типа спаривания α) (рис. 4, *b*). Таким образом, на основе полученных результатов можно заключить, что первичные повреждения ДНК, вызванные ГАП, способны проявляться фенотипически и приводить к временному переключению типа спаривания $\alpha \rightarrow \alpha$.

ОБСУЖДЕНИЕ

В этой работе мы оценили чувствительность альфа-теста по отношению к аналогу пуриновых азотистых оснований ГАП. Мы показали, что ГАП повышает частоту наследуемых и ненаследуемых изменений генетического материала, учитываемых в альфа-тесте. Наши результаты согласуются с литературными данными, что у дрожжей ГАП индуцирует только транзиции и не влияет на рекомбинацию [10, 12, 16, 19, 20]. Выявленный в альфа-тесте мутагенный эффект ГАП в целом соответствует результатам, полученным в других тестах, например в тесте на индукцию прямых мутаций устойчивости к канаванину при той же концентрации ГАП [11, 12, 15]. Впервые нам удалось показать, что первичные повреждения ДНК, индуцированные ГАП, могут влиять на фенотип клетки и приводить к переключению типа спаривания $\alpha \rightarrow \alpha$. Альфа-тест оказался эффективным методом для выявления таких модификаций оснований ДНК.

По сравнению с другими методами оценки генотоксической активности альфа-тест имеет ряд преимуществ. Например, с использованием альфа-теста появляется возможность оценивать не только частоту возникновения первичных повреждений ДНК, но и проследить их дальнейшую судьбу после репарации и количественно определять соотношение и частоту наследуемых изменений генетического материала, таких как генные мутации, конверсия, рекомбинационные события, потери целой хромосомы или ее плеча. Несмотря на высокую чувствительность и специфичность, альфа-тест имеет ряд ограничений, как и любой метод генетической токсикологии. Одно из них связано с неравномерным распределением долей классов учитываемых генетических событий. Одним из наиболее частых генетических событий, учитываемых в альфа-тесте, является потеря целой хромосомы III, а также ее правого плеча, содержащего локус *MATa* [25, 26]. Так, доля гибридов, лишенных хромосомы III, возникающих спонтанно или под действием генотоксических воздействий, составляет от 30 до 50 % общего числа «незаконных» гибридов, [2, 5, 6]. Причиной потери хромосом или фрагментов хромосом, как и рекомбинации, являются нарушения цитоскелета или фрагментация хромосом в результате накопления разрывов ДНК, поэтому частота этих событий в клетках возрастает под действием факторов, влияющих на функционирование микротрубочек или приводящих к одно- и двунитевым разрывам ДНК. У дрожжей, в отличие от *E. coli* и человека, включение ГАП в ДНК при репликации не приводит в дальнейшем к накоплению разрывов и не индуцирует хромосомные нарушения, поскольку у дрожжей отсутствуют ферменты, способные узнавать и удалять ГАП из ДНК. Учитывая эти факты и опыт использования альфа-теста для оценки активности мутагенов с другим механизмом действия, можно заключить, что альфа-тест более чувствителен к мутагенам, которые могут инициировать разрывы ДНК. Для того чтобы повысить чувствительность тест-системы по отношению к факторам, вызывающим генные мутации, рекомбинацию и конверсию, чья относительная частота в общем числе выявляемых в альфа-тесте нарушений ниже, чем частота потери хромосомы III или ее плеча, мы предлагаем использовать ряд модификаций методики проведения альфа-теста.

Для повышения чувствительности оценки частоты возникновения относительно редких нарушений генетического материала мы предлагаем в тесте на «незаконную» гибридизацию использовать селективную среду для отбора «незаконных» гибридов, исключающую рост гибридов, лишенных хромосомы III. Такая среда не должна содержать гистидин при условии использования мутации *his4* в качестве маркера левого плеча хромосомы III. В этом случае высокое значение частоты потери хромосомы III не будет негативным образом влиять на выявляемость остальных более редких событий. При использовании среды без гистидина и треонина (*thr4* — маркер правого плеча хромосомы III) спектр выявляемых событий в тесте на «незаконную» гибридизацию сузится до классов «мутации и временные повреждения» (α His⁺ Thr⁺) и «конверсия между *MATa* и *HMRa*» (n/m His⁺ Thr⁺). Предлагаемые нами модификации методики тестирования могут быть использованы в соответствии с задачами конкретного исследования и специфичностью мутагенного действия изучаемых факторов.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-34-00130 мол_а, и при государственной финансовой поддержке ведущих университетов Российской Федерации в рамках программы ITMO Fellowship and Professorship Program. Работа выполнена с использованием оборудования Научного парка СПбГУ (РЦ «РМиКТ»).

ЛИТЕРАТУРА

1. Repnevskaya MV, Karpova TS, Inge-Vechtomov SG. Hybridization and cytoduction among yeast cells of the same mating type. *Current Genetics*. 1987;12(7): 511-517. <https://doi.org/10.1007/Bf00419560>.
2. Степченкова Е.И., Коченова О.В., Инге-Вечтомов С.Г. «Незаконная» гибридизация и «незаконная» цитодукция у гетероталлических дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* как система для анализа генетической активности экзогенных и эндогенных факторов в «альфа-тесте» // Вестник Санкт-Петербургского государственного университета. Серия 3. Биология. — 2009. — № 4. — С. 129–139. [Stepchenkova EI, Kochenova OV, Inge-Vechtomov SG. “Illegitimate” mating and “illegitimate”

- cytoduction in heterothallic yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a system for analysis of genetic activity of exogenic and endogenic factors in “alfa-test”. *Vestnik of St. Petersburg University. Series 3. Biology*. 2009;(4):129-139. (In Russ.)
3. Inge-Vechtomov SG, Repnevskaya MV. Phenotypic expression of primary lesions of genetic material in *Saccharomyces* yeasts. *Genome*. 1989;31(2): 497-502. <https://doi.org/10.1139/g89-097>.
 4. Lee CS, Haber JE. Mating-type Gene Switching in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Spectr*. 2015;3(2): MDNA3-0013-2014. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MDNA3-0013-2014>.
 5. Степченкова Е.И., Коченова О.В., Жук А.С., и др. Фенотипическое проявление и взаимопревращение первичных повреждений генетического материала, учитываемых в альфа-тесте, у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* // Гигиена и санитария. — 2011. — Т. 6. — С. 64–69. [Stepchenkova EI, Kochenova OV, Zhuk AS, et al. Phenotypic manifestation and transmutations of primary genetic material damages considered in the alpha-test on the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Hygiene & Sanitation*. 2011;(6):64-69. (In Russ.)]
 6. Коченова О.В., Сошкина Ю.В., Степченкова Е.И., и др. Участие ДНК-полимераз репликативного обхода повреждений в поддержании целостности хромосом у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* // Биохимия. — 2011. — Т. 76. — № 1. — С. 62–75. [Kochenova OV, Soshkina JV, Stepchenkova EI, et al. Participation of translesion synthesis DNA polymerases in the maintenance of chromosome integrity in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry (Mosc)*. 2011;76(1):49-60. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.1134/s000629791101007x>.
 7. Жук А.С., Ширяева А.А., Коченова О.В., и др. Альфа-тест — система для оценки генетически активных факторов // Актуальные проблемы гуманитарных и естественных наук. — 2013. — Т. 11. — № 1. — С. 54–60. [Zhuk AS, Shiriaeva AA, Kochenova OV, et al. Alpha-test as a system to assessment of genetic activity factors. *Actual problems of the humanities and the natural sciences*. 2013;11(1):54-60. (In Russ.)]
 8. Жук А.С., Задорский С.П., Ширяева А.А., и др. Идентификация мутации *kar1-1*, приводящей к повышению частоты цитодукции и снижению частоты гибридизации у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* // Генетика. — 2018. — Т. 54. — № 13. — С. 18–21. [Zhuk AS, Zadorsky SP, Shiriaeva AA, et al. Identification of the *kar1-1* mutation, leading to increase of cytoduction frequency and decrease of hybridization frequency in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetika*. 2018;54(13):18-21. (In Russ.)]
 9. Inge-Vechtomov SG, Pavlov YI, Noskov VN, et al. Tests for genetic activity in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: study of forward and reverse mutation, mitotic recombination and illegitimate mating induction. In: Ashby J, de Serres FJ, Draper M, et al. *Progress in Mutation Research*. Vol. 5. Evaluation of Short-Term Tests for Carcinogens. Report of the International Programme on Chemical Safety's Collaborative Study on in vitro assays. Amsterdam, Elsevier Science; 1985. P. 243-255.
 10. Shcherbakova PV, Noskov VN, Pshenichnov MR, et al. Base analog 6-*N*-hydroxylaminopurine mutagenesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is controlled by replicative DNA polymerases. *Mutat Res*. 1996;369(1-2):33-44. [https://doi.org/10.1016/s0165-1218\(96\)90045-2](https://doi.org/10.1016/s0165-1218(96)90045-2).
 11. Shcherbakova PV, Pavlov YI. 3'—>5' exonucleases of DNA polymerases epsilon and delta correct base analog induced DNA replication errors on opposite DNA strands in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 1996;142(3):717-726.
 12. Lada AG, Stepchenkova EI, Waisertreiger IS, et al. Genome-wide mutation avalanches induced in diploid yeast cells by a base analog or an APOBEC deaminase. *PLoS Genet*. 2013; 9(9):e1003736. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003736>.
 13. Barrett JC. Induction of gene mutation in and cell transformation of mammalian cells by modified purines: 2-aminopurine and 6-*N*-hydroxylaminopurine. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1981;78(9):5685-9. <https://doi.org/10.1073/pnas.78.9.5685>.
 14. Pavlov YI, Noskov VN, Lange EK, et al. The genetic activity of *N*⁶-hydroxyadenine and 2-amino-*N*⁶-hydroxyadenine in *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat Res*. 1991;253(1):33-46. [https://doi.org/10.1016/0165-1161\(91\)90343-7](https://doi.org/10.1016/0165-1161(91)90343-7).
 15. Stepchenkova EI, Koz'min SG, Alenin VV, et al. [Genetic control of metabolism of mutagenic

- purine base analogs 6-hydroxylaminopurine and 2-amino-6-hydroxylaminopurine in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. (In Russ.)]. *Genetika*. 2009;45(4):471-477.
16. Williams TM, Fabbri RM, Reeves JW, et al. A new reversion assay for measuring all possible base pair substitutions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 2005;170(3):1423-1426. <https://doi.org/10.1534/genetics.105.042697>.
 17. Kozmin SG, Schaaper RM, Shcherbakova PV, et al. Multiple antimutagenesis mechanisms affect mutagenic activity and specificity of the base analog 6-*N*-hydroxylaminopurine in bacteria and yeast. *Mutat Res*. 1998;402(1-2): 41-50. [https://doi.org/10.1016/s0027-5107\(97\)00280-7](https://doi.org/10.1016/s0027-5107(97)00280-7).
 18. Stepchenkova EI, Kozmin SG, Alenin VV, et al. Genome-wide screening for genes whose deletions confer sensitivity to mutagenic purine base analogs in yeast. *BMC Genet*. 2005;6:31. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-6-31>.
 19. Shcherbakova PV, Pavlov YI. Mutagenic specificity of the base analog 6-*N*-hydroxylaminopurine in the *URA3* gene of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutagenesis*. 1993;8(5):417-421. <https://doi.org/10.1093/mutage/8.5.417>.
 20. Kulikov VV, Derkatch IL, Noskov VN, et al. Mutagenic specificity of the base analog 6-*N*-hydroxylaminopurine in the *LYS2* gene of yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat Res*. 2001;473(2):151-161. [https://doi.org/10.1016/s0027-5107\(00\)00142-1](https://doi.org/10.1016/s0027-5107(00)00142-1).
 21. Pavlov YI, Newlon CS, Kunkel TA. Yeast origins establish a strand bias for replicational mutagenesis. *Mol Cell*. 2002;10(1):207-213. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(02\)00567-1](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(02)00567-1).
 22. Rose MD, Winston F, Hieter P. Methods in yeast genetics, a laboratory course manual. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory; 1990. 198 p.
 23. Гланц С. Медико-биологическая статистика / пер. с англ. под ред. Н.Е. Бузикашвили, Д.В. Самойлова. — М.: Практика, 1999. — 459 с. [Glantz S. Primer of biostatistics. New York: McGraw-Hill Inc.; 1996. Translated from English ed. by N.E. Buzikashvili, D.V. Samoylov. Moscow: Praktika; 1999. 459 p. (In Russ.)]
 24. Vollset SE. Confidence intervals for a binomial proportion. *Stat Med*. 1993;12(9):809-824. <https://doi.org/10.1002/sim.4780120902>.
 25. Warren CD, Eckley DM, Lee MS, et al. S-phase checkpoint genes safeguard high-fidelity sister chromatid cohesion. *Mol Biol Cell*. 2004;15(4):1724-1735. <https://doi.org/10.1091/mbc.E03-09-0637>.
 26. Yuen KW, Warren CD, Chen O, et al. Systematic genome instability screens in yeast and their potential relevance to cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007;104(10):3925-3930. <https://doi.org/10.1073/pnas.0610642104>.

✿ Информация об авторах

Анна Сергеевна Жук — канд. биол. наук, научный сотрудник, научно-образовательный центр геномного разнообразия международного научного центра компьютерных технологий, Университет ИТМО, Санкт-Петербург. SPIN: 2223-5306. E-mail: ania.zhuk@gmail.com.

Елена Игоревна Степченко — канд. биол. наук, заведующая лабораторией мутагенеза и генетической токсикологии, Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Санкт-Петербургский филиал, Санкт-Петербург; ассистент, кафедра генетики и биотехнологии, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург. SPIN: 9121-7483. E-mail: stepchenkova@gmail.com.

Сергей Георгиевич Инге-Вечтомов — д-р биол. наук, директор института, Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Санкт-Петербургский филиал, Санкт-Петербург; профессор, кафедра генетики и биотехнологии, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург. SPIN: 3743-7626. E-mail: ingevechtomov@gmail.com.

✿ Authors and affiliations

Anna S. Zhuk — PhD, Researcher, Laboratory of Genomic Diversity, International Laboratory of Computer Technologies, ITMO University, Saint Petersburg, Russia. SPIN: 2223-5306. E-mail: ania.zhuk@gmail.com.

Elena I. Stepchenkova — PhD, Head of Laboratory of Mutagenesis and Genetic Toxicology, Vavilov Institute of General Genetics Russian Academy of Science, St. Petersburg Branch, Saint Petersburg, Russia; Assistant, Department of Genetics and Biotechnology, Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia. SPIN: 9121-7483. E-mail: stepchenkova@gmail.com.

Sergey G. Inge-Vechtomov — Doctor of Science, Director, Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Science, St. Petersburg Branch, Saint Petersburg, Russia; Professor, Department of Genetics and Biotechnology, Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia. SPIN: 3743-7626. E-mail: ingevechtomov@gmail.com.