

СОЗДАНИЕ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ХИМИЧЕСКИХ АГЕНТОВ В ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЕ НА ОСНОВЕ ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Курбанов Габдулла Фаритович^{1,3}, Алексеева Елена Анатольевна^{1,2}, Евстюхина Татьяна Анатольевна^{1,2}, Пешехонов Вячеслав Тимофеевич^{1,2}, Королёв Владимир Геннадиевич^{1,2}.

¹НИЦ «Курчатовский институт – ПИЯФ», Россия, Гатчина

²Курчатовский геномный центр – ПИЯФ, Россия, Гатчина

³Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики, Россия, Санкт-Петербург
tatanka.sn@gmail.com

С ростом мировой промышленности увеличивается количество отходов, которые могут аккумулироваться в почве, в воде, а в дальнейшем попадать в организмы, в том числе растения. Некоторые из веществ, находящихся в отходах способны приводить к мутациям и канцерогенезу, что вредит как урожайности, так и генофонду культурных растений.

Первым этапом борьбы с генотоксикантами является их детекция. С этой целью были созданы разного рода генетические тест-системы на основе живых организмов. Наибольшую известность получили тест Эймса на основе бактерий *Salmonella typhimurium* и тест Лоприено на основе дрожжей *Schizosaccharomyces pombe*.

В ПИЯФ были предприняты попытки создать тест-системы, но на основе дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Самым успешным из полученных штаммов является 3С-СКВ-173, в котором ключевыми мутациями генома были выбраны делеции по генам H1M1 и RAD2. В рамках проведенной работы мы нашли другие возможные ключевые гены, что привело к созданию более чувствительного штамма rad2Δ hsm3Δ arn1Δ. Мы рассматриваем полученный штамм как основу перспективной тест-системы для анализа генотоксичности различных химических соединений. Делеция гена RAD2 вызывает повышение чувствительности клеток к мутагенному и летальному действию веществ, значительно изменяющих вторичную структуру ДНК, так как она блокирует эксцизионную репарацию нуклеотидов. Мутация arn1Δ приводит к инактивации пути эксцизионной репарации оснований, субстратом для которой становятся повреждения оснований ДНК, такие как алкилирование, окисление или другие модификации оснований, влияющие на эффективность и точность репликации.

Наиболее интересным в предложенном нами штамме является делеция гена HSM3. Он вовлечен в репарационный механизм, обеспечивающий толерантность клетки к повреждениям её ДНК. В норме данный механизм позволяет репликативному комплексу безошибочно миновать повреждения ДНК и таким образом спасти клетку от гибели. Мутация приводит к увеличению числа ошибок полимеразы в процессе репарационного синтеза ДНК в области повреждения, но не приводит к нарушению обхода повреждения. В свою очередь это приводит к увеличению вероятности обнаружения повреждения ДНК тест-системой.

Делеция HSM3 практически не снижает выживаемость клеток, однако значительно увеличивает частоту как спонтанных, так и индуцированных мутаций. При этом мутации в генах RAD2 и HSM3 имеют синергию в отношении индуцированного мутагенеза, что в свою очередь увеличивает чувствительность системы. Полученный штамм rad2Δ hsm3Δ arn1Δ можно рассматривать как полезный инструмент в качестве тест-системы для детекции генетически активных соединений.

Работа выполнена при финансовой поддержке Курчатовского геномного центра – ПИЯФ в рамках программы развития центров геномных исследований мирового уровня по соглашению № 075-15-2019-1663.

CREATION OF A TEST SYSTEM FOR THE DETERMINATION OF CHEMICAL AGENTS IN THE ENVIRONMENT BASED ON YEAST *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Kurbanov Gabdulla Faritovich^{1,3}, Alekseeva Elena Anatolievna^{1,2}, Evstyukhina Tatyana Anatolievna^{1,2}, Peshekhonov Vyacheslav Timofeevich^{1,2}, Korolev Vladimir Gennadievich^{1,2}.

¹*Research Center "Kurchatov Institute – PNPI, Russia, Gatchina*

²*Kurchatov Genomic Center – PNPI, Russia, Gatchina*

³*St. Petersburg National Research University of Information Technologies, Mechanics and Optics, Russia, St. Petersburg*
tatanka.sn@gmail.com

As global industry grows, so does the amount of waste that can accumulate in soil, in water, and then into organisms, including plants. Some of the substances in the waste can lead to mutations and carcinogenesis, which harms both the yield and the gene pool of cultivated plants. In addition, genetic events that are caused by these kinds of substances can affect the balance between populations of organisms inhabiting the contaminated area.

The first stage in the fight against genotoxicants is their detection. For this purpose, various kinds of genetic test systems based on living organisms have been created. The most famous are the Ames test based on *Salmonella typhimurium* bacteria and the Loprieno test based on the yeast *Schizosaccharomyces pombe*.

The PNPI attempted to create test systems, but based on the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. The most successful of the resulting strains is 3C-SLE-173, in which the key mutations of the genome were selected deletions from the HIM1 and RAD2 genes. As part of the work, we found other possible key genes, which led to the creation of a more sensitive strain *rad2 Δ hsm3Δ apn1Δ*. We consider the resulting strain as the basis of promising test systems for the analysis of genotoxicity of various chemical compounds.

Deletion of the RAD2 gene causes an increase in the sensitivity of cells to the mutagenic and lethal effects of substances that significantly alter the secondary structure of DNA, since it blocks the excisional repair of nucleotides.

The *apn1Δ* mutation inactivates the base excision repair pathway, the substrate for which is DNA base damage, such as alkylation, oxidation, or other base modifications that affect replication efficiency and accuracy.

The most interesting in the proposed strain is the deletion of the HSM3 gene. It is involved in the repair mechanism that ensures the cell's tolerance to damage to its genetic material. Normally, this mechanism allows the replicative complex to accurately bypass DNA damage and thus save the cell from death. The mutation leads to an increase in the number of polymerase errors in the process of repair dna synthesis in the area of damage, but does not lead to a violation of the circumvention of damage. In turn, this leads to an increase in the likelihood of detecting DNA damage by the test system.

Deletion of HSM3 practically does not reduce cell survival, but significantly increases the frequency of both spontaneous and induced mutations. At the same time, mutations in both the RAD2 and HSM3 genes have synergies with respect to induced mutagenesis, which in turn increases the sensitivity of the system.

The resulting strain of *rad2Δ hsm3Δ apn1Δ* can be considered as a useful tool as a test system for the detection of genetically active compounds.

The work was carried out with the financial support of the Kurchatov Genomic Center – PNPI within the framework of the program for the development of world-class genomic research centers under the agreement № 075-15-2019-1663.