

**Ширяева А.А.**

*сотрудник,*

*Санкт-петербургский политехнический университет Петра Великого;*

*аспирант,*

*Сколковский институт науки и технологий*

## **РАЗРАБОТКА СЕЛЕКТИВНОЙ СИСТЕМЫ ОТБОРА КЛЕТОК ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* А ТИПА СПАРИВАНИЯ**

Альфа-тест – это метод генетической токсикологии, позволяющий выявлять генетически активные факторы по увеличению частоты различных типов генетических нарушений у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* [4]. Альфа-тест разработан на основе системы генетического контроля типа спаривания дрожжей *S. cerevisiae* [3, 5, 6]. Гаплоидные штаммы дрожжей принадлежат к одному из двух типов спаривания:  $\alpha$  или *a*. Тип спаривания дрожжевой клетки контролирует локус *MAT*, который находится в правом плече III хромосомы. В клетках *a* типа спаривания содержится локус *MAT<sub>a</sub>*, а в клетках типа спаривания  $\alpha$  – *MAT $\alpha$* . В локусе *MAT* закодированы транскрипционные факторы, определяющие различный уровень экспрессии *a*- и  $\alpha$ -специфичных генов, продукты которых ответственны за выработку собственных феромонов и распознавание феромонов, секретлируемых клетками противоположного типа спаривания. В норме клетки противоположных типов спаривания скрещиваются с образованием стерильных диплоидных гибридов [1]. Нарушения экспрессии локуса *MAT $\alpha$*  приводят к переключению типа спаривания клетки с  $\alpha$  на *a*, в результате становятся возможными «незаконные» скрещивания между двумя клетками исходного  $\alpha$  типа спаривания [2]. Данный принцип заложен в основу альфа-теста: два штамма одинакового  $\alpha$  типа спаривания высевают совместно на селективную среду, на которой могут расти только «незаконные» гибриды, но не родительские штаммы. При этом используют штаммы, маркированные мутациями по обоим плечам III хромосомы. Анализируя фенотип «незаконного» гибрида, можно определить генетическое событие, которое привело к переключению типа спаривания.

Альфа-тест позволяет выявить шесть различных типов генетических нарушений (первичные повреждения ДНК, мутации, генная конверсия, митотическая рекомбинация, потеря целой хромосомы или её плеча) [4]. Недостатком данного метода является его трудоёмкость и длительность процедуры анализа. Поэтому в настоящее время использование альфа-теста для широкомасштабных скринингов не представляется возможным.

В данной работе была предпринята попытка упрощения альфа-теста с помощью разработки системы для прямого отбора гаплоидных клеток, переключивших тип спаривания с  $\alpha$  на *a*, без этапа скрещивания двух штаммов  $\alpha$ . Предполагалось, что в основе селекции будет лежать принцип активации экспрессии селективного маркера, поставленного под контроль промотора *a*-специфичного гена, при переключении типа спаривания клетки  $\alpha$  на *a*. Для проверки данной гипотезы была сконструирована плаزمиды *pRS316-LYS5*,

содержащая рамку считывания гена *LYS5* без промоторной области. На её основе были сконструированы плазмиды pSTE2-*LYS5*, pSTE6-*LYS5* и pMFA2-*LYS5* с геном *LYS5* под контролем промоторов  $\alpha$ -специфичных генов *STE2*, *STE6* или *MFA2* соответственно. Штамм  $\alpha$  типа спаривания A1-K5-35B-D924, содержащий делецию гена *LYS5*, был трансформирован полученными плазмидами и проверен на ауксотрофность/прототрофность по лизину. Было обнаружено, что все сконструированные плазмиды, включая контрольную плазмиду pRS316-*LYS5*, в полной мере обеспечивают роста штамма на среде, не содержащей лизина (Рис. 1). Таким образом, происходит неспецифическая транскрипция с неизвестного промотора, расположенного перед рамкой считывания гена *LYS5*. Непосредственно перед рамкой считывания *LYS5* находится участок длиной 444 пн., содержащий бактериальный *lac* промотор, *lac* оператор и фрагмент гена *lacZ* (66 пн). Эти участки неважны для поддержания плазмиды и, соответственно, могут быть делетированы. Тем не менее, делеция указанного участка (плазмиды pRS316-*LYS5* $\Delta$ , pMFA2-*LYS5* $\Delta$ , pSTE2-*LYS5* $\Delta$ , pSTE6-*LYS5* $\Delta$ ) не привела к уменьшению выживаемости трансформантов на среде, не содержащей лизина (Рис. 1).



**Рис. 1. Рост трансформантов на среде, содержащей все необходимые для роста штамма A1-K5-35B-D924 аминокислоты и азотистые основания, кроме урацила и лизина**

Таким образом, предложенная система не позволяет осуществлять селекцию клеток  $\alpha$  типа спаривания из-за высокого уровня неспецифической экспрессии селективного маркера *LYS5*. Данная работа демонстрирует недостаточную изученность роли транскрипционного шума в экспрессии генетического материала эукариот.

#### Список использованных источников:

1. Haber, J.E. Mating-type genes and MAT switching in *Saccharomyces cerevisiae* / J.E. Haber // *Genetics*. – 2012. – Vol. 191, № 1, – P. 33-64.

2. Hicks J.B., Herskowitz I. Interconversion of yeast mating types. II. Restoration of mating ability to sterile mutants in homothallic and heterothallic strains // *Genetics*. – 1977. – V. 85. – P. 373-393

3. Inge-Vechtomov S.G., Repnevskaya M.V. Phenotypic expression of primary lesions of genetic material in *Saccharomyces* yeast // *Genome*. 1989. V. 31, P. 497-502.

4. Жук А.С., Ширяева А.А., Коченова О.В., Андрейчук Ю.В., Степченкова Е.И., Инге-Вечтомов С.Г. Альфа тест-система для оценки генетически активных факторов // *Актуальные проблемы гуманитарных и естественных наук* – 2013, Т. 11. – С. 54–60.

5. Инге-Вечтомов С.Г., Репневская М.В., Карпова Т.С. Изучение скрещивания клеток одинакового типа спаривания у дрожжей-сахаромицетов // *Генетика*. 1986. – Т. 22, № 11. – С. 2625-2636.

6. 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» // *Вестн. С.-Петерб. ун-та*. – 2009. – Сер. 3, Вып. 4. – С. 129-140.