

К-616

19-83-232

На правах рукописи

УДК 575.1:582.282.23

КОЛТОВАЯ
Наталья Алексеевна

ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ ИЗМЕНЧИВОСТИ
МИТОХОНДРИАЛЬНОГО ГЕНОМА ДРОЖЖЕЙ
Saccharomyces cerevisiae

Специальность: 03.00.15 - генетика

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Работа выполнена в Институте молекулярной генетики АН СССР

Научный руководитель: кандидат биологических наук А.Б.Девин

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор Г.И.Наумов
кандидат биологических наук О.Н.Куренная

Ведущая организация: Ленинградский институт ядерной физики
им. Б.П.Константинова АН СССР

Защита состоится "____" _____ 1983 г. в "____" часов
на заседании специализированного Совета Д002.49.01 при Институте
общей генетики АН СССР по адресу: П17809, г. Москва, ул.Губкина, д.3.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института общей
генетики АН СССР.

Автореферат разослан "____" _____ 1983 г.

Ученый секретарь специализированного Совета
кандидат биологических наук

Г.Н.Полухина

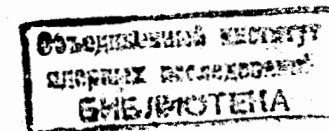
Актуальность проблемы. Современные генетические исследования характеризуются возрастанием интереса к проблемам экотрахромосомальной наследственности. Этот интерес во многом объясняется успехами молекулярной биологии плазмид и геномов клеточных органелл, в первую очередь, митохондрий. У разных организмов митохондриальные (мт) геномы содержат практически один и тот же набор структурных генов. Вместе с тем непосредственный анализ мт ДНК выявил высокую межвидовую изменчивость таких характеристик мт генома, как общая длина, порядок расположения генов, нуклеотидный состав и др. Неоднократно отмечалась и значительная изменчивость мт генома внутри различных видов. Характерная высокая изменчивость мт генома в сочетании с относительно малыми размерами делает его популярной моделью для изучения организации, функционирования и эволюции генетических систем.

Удобным объектом для генетических исследований мт изменчивости служат дрожжи-сахаромицеты - эукариотические одноклеточные факультативные анаэробы с хорошо разработанной хромосомальной и митохондриальной генетикой. Широко известным проявлением высокой изменчивости мт генома дрожжей является высокий темп спонтанных мутаций petite (rho⁻) - массивных перестроек, необратимо нарушающих функциональность мт генома. Накоплен обширный экспериментальный материал, относящийся к закономерностям возникновения и молекулярной природе мутаций petite. В то же время механизмы и биологическое значение мт генетической изменчивости у дрожжей во многом не ясны, и их исследование вполне актуально.

Цель работы - идентификация генов, ответственных за высокую изменчивость мт генома дрожжей, и поиск фенотипических проявлений этой изменчивости. Конкретные задачи исследования: 1) получение и изучение линий с пониженным темпом возникновения спонтанных мутаций petite; 2) анализ влияния изменчивости мт генома на чувствительность дрожжевых клеток к инактивации азотистой кислотой (АК).

Научная новизна. В работе впервые показана необходимость нормальных функций определенных ядерных генов для высокой изменчивости мт генома дрожжей. Продемонстрирована зависимость АК-чувствительности клеток от состояния мт генома. Получены данные в пользу функциональной значимости высокой изменчивости мт генома дрожжевой клетки.

Практическая значимость. Результаты настоящей работы могут использоваться в исследованиях по генетике и молекулярной биологии дрожжей в различных лабораториях. В частности, анализ генетического контроля стабильности внеядерной наследственной информации и обна-



ружение мутаций, повышающих эту стабильность, имеет значение для решения как фундаментальных, так и биотехнологических задач, связанных с клонированием и экспрессией гетерологичных ДНК в дрожжевых клетках.

Апробация работы. Результаты диссертации докладывались на IV Всесоюзном симпозиуме "Молекулярные механизмы генетических процессов" (Москва, 1979), IV съезде Всесоюзного общества генетиков и селекционеров им. Н.И. Вавилова (Киев, 1982), Биофизическом семинаре Объединенного института ядерных исследований (Дубна, 1981), семинарах в Институте молекулярной генетики АН СССР и в Институте общей генетики АН СССР.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения; обзора литературы, в котором рассмотрены данные относительно организации и изменчивости мт генома дрожжей *Saccharomyces*; главы, посвященной описанию использованных материалов и методик; трех глав, содержащих экспериментальные данные и их обсуждение; заключения и выводов.

В работе 110 страниц машинописного текста, 18 таблиц, 11 рисунков, 164 наименования библиографии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Л и н и и. Исходным материалом служили изогенные друг другу прототрофные штаммы X2180-1A и X2180-1B, а также линии DP1-1B/7 (α his1 trp1 07R) и IL458-1C (a ura1 C321R E221R). Линии 7Ia (a ade1 07R C321R E221R) и 7I α (α ade1 07R C321R E221R) получены в результате цитодукции мт генома, маркированного мутациями антибиотикорезистентности E221R, C321R и 07R, в спонтанный ade1-мутант штамма X2180-1A.

С р е д и. В работе применяли стандартные среды, для которых использовали следующие обозначения: БС - полная; ЭПГС - полная без глюкозы, которая заменена глицерином; ММЗ - минимальная.

Г е н е т и ч е с к и й а н а л и з. Гибриды получали скрещиванием "клетка к клетке" с помощью микроманипулятора ММ1. Аскоспоры изолировали на поверхности агаризованной БС с помощью микроманипулятора по стандартной методике (Захаров и др., 1976)*.

О п р е д е л е н и е ч а с т о т ы с п о н т а н н ы х м у т а н т о в p e t i t e. Пятисуточные колонии, выросшие на среде БС при 30°C, суспендировали в воде; суспензию разводили и рассеивали на БС. Посевы просматривали спустя 5 суток инкубации при 30°C. Колонии petite, помимо размеров, отличались от колоний исходных клеток отсутствием красной пигментации.

* Сборник методик по генетике дрожжей-сахаромикетов, Л.: Наука, 1976.

О п р е д е л е н и е ч у в с т в и т е л ь н о с т и к л е т о к к м у т а г е н н о м у д е й с т в и ю б р о м и с т о - г о э т и д и я. Клетки рассеивали на агаризованную среду ЭПГС (10⁵ клеток на чашку Петри диаметром 50 мм). В центр каждой чашки помещали 10 мкг бромистого этидия (БЭ) на круглый бумажный фильтр. Спустя 5 суток инкубации измеряли диаметр зоны отсутствия роста, который и служил показателем чувствительности клеток к мутагенному действию БЭ.

О п р е д е л е н и е ч у в с т в и т е л ь н о с т и к л е т о к к и н а к т и в а ц и и а з о т и с т о й к и с л о т о й. Клетки, выращенные в среде ММЗ при 32°C, тщательно отмывали от среды, суспендировали в воде и помещали в пробирки стандартного диаметра, смешивая с растопленным агаром Difco, содержащим NaNO₂. В начальный момент времени в пробирки с застывшим агаром вносили по 0,1 мл цитратного буфера (pH 3,0), а спустя определенное время (время выдержки) - по 0,2 мл цитратного буфера (pH 7,4) для прекращения действия азотистой кислоты (АК). Через 24 часа после начала обработки добавляли по 0,2 мл жидкой среды БС и инкубировали ещё 5 суток. Показателем АК-чувствительности служила величина "зоны чувствительности", т.е. зоны эффективной инактивации клеток в агаре.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

I. Генетический контроль спонтанной rho⁻ - мутабельности

Литературные данные о структуре мт геномов petite показывают, что образование rho⁻ мутаций, по-видимому, обусловлено ферментативными процессами сайт-специфической рекомбинации и амплификации фрагментов мт ДНК (Bernardi, 1979)*. В настоящей работе для идентификации генов, контролирующих процессы rho⁻ - мутагенеза, выделяли и анализировали линии со сниженным темпом возникновения спонтанных мутаций petite.

Колонии клеток 7Ia и 7I α имеют специфическую "звездчатую" морфологию (фенотип Sta⁺, рис. 1a), обусловленную высокой частотой rho⁻ - мутантов в клонах (40 - 50%). В посевах клеточных суспензий, обработанных АК, встречаются мутантные гладкие колонии с ровными краями (фенотип Sta⁻, рис. 1б). Частота мутантов petite в клонах Sta⁻ не более нескольких процентов.

Для анализа генетической природы Sta⁻ - мутаций скрестили 4 Sta⁻ - мутанта с родительской линией. Расщепления Sta⁺ : Sta⁻ в гаплоидном потомстве этих скрещиваний оказались сложными. Однако, после нескольких последовательных бэкрессов изолировали 4 клона (по одному от каждого исходного Sta⁻ - мутанта), у которых в по-

* Trends Biochem. Sci., 1979, 4, 197-201.

томовте скрещиваний с 7Ia или 7I α наблюдалось моногенное расщепление 2 Sta⁺ : 2 Sta⁻. Таким образом, были изолированы 4 ядерные мутации независимого происхождения, обуславливающие фенотип Sta⁻. Эти мутации были обозначены M1, M2, M3 и M4.

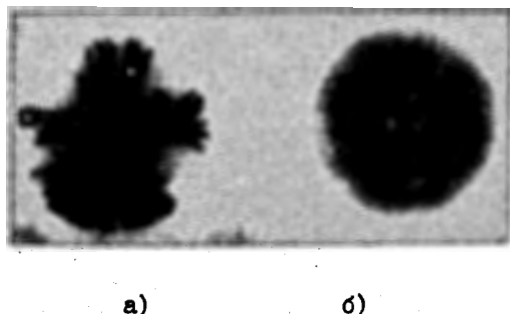


Рис.1. Колонии, образованные клетками Sta⁺(а) и Sta⁻(б).

В культурах диплоидов, гомо- и гетерозиготных по этим мутациям, определили частоту спонтанных мутантов petite. Из табл. I видно, что частота rho⁻ мутантов в культурах гомозиготных мутантных диплоидов существенно ниже, чем в культурах немутантных диплоидов 7Ia x 7I α . В трех случаях из четырех наблюдались различия в 40-60 раз, в четвертом (M4 α x M4 α) - в 5-6 раз.

Таблица I. Частоты спонтанных мутантов petite в диплоидных клонах

Диплоид	Число повторностей [№]	Просмотрено колоний	Частота мутантов petite, %
7I α x 7Ia	3	3334	51,2 \pm 5,6
M1 α x M1a	3	4083	1,1 \pm 0,3
M2 α x M2a	3	4222	0,8 \pm 0,3
M3 α x M3a	2	2530	0,9 \pm 0,3
M4 α x M4a	4	2889	9,3 \pm 1,2
M1 α x 7Ia	5	4203	32,0 \pm 2,9
M2 α x 7Ia	3	3959	5,2 \pm 0,8
M3 α x 7Ia	5	3465	44,8 \pm 7,1
M4 α x 7Ia	2	2396	36,0 \pm 2,0

[№] В разных повторностях использовали клоны, полученные от независимо возникших зигот.

Прямое определение темпа возникновения мутаций petite с помощью методики Джеймса (Lusena, James, 1976)^{*} для диплоидов 7Ia x 7I α дало величину 0,12 \pm 0,01 на почкование, а для диплоида M4 α x M4 α - 0,022 \pm 0,005 в расчете на почкование. У диплоидов M1a x M1 α , M2a x M2 α и M3a x M3 α темп спонтанного мутирования, очевидно, еще ниже, чем у диплоидов M4a x M4 α . По-видимому, у изученных линий гомозиготность по любой из мутаций M1, M2, M3 и M4 вызывает заметное снижение спонтанной мутабельности mt генома.

Из табл. I видно также, что частоты спонтанных rho⁻ мутантов в культурах диплоидов, гетерозиготных по мутациям M1, M3 и M4, близки к частоте rho⁻ мутантов в культурах немутантных диплоидов. Следовательно, мутации M1, M3 и M4 рецессивны. Возможно, эти мутации затрагивают структурные гены ферментов, участвующих в rho⁻ мутагенезе. Частоты спонтанных rho⁻ мутантов в культурах гетерозигот M2 α x 7Ia существенно ниже, чем в культурах 7I α x 7Ia, но заметно выше, чем у гомозигот по M2. Очевидно, мутация M2 является полудоминантной. Можно предположить, что мутация M2 затрагивает локус, играющий регуляторную роль.

Таблица 2. Комплементация мутаций, дающих фенотип Sta⁻

	7Ia	M1a	M2a	M3a	M4a
7I α	+				
M1 α	+	-			
M2 α	-	-	-		
M3 α	+	+	-	-	
M4 α	+	+	-	+	-

Результаты изучения комплементации мутантов Sta⁻ приведены в табл. 2. Как и следовало ожидать, при объединении в диплоидах полудоминантной мутации M2 с любой из рецессивных мутаций комплементация не наблюдается. Рецессивные мутации комплементарны друг другу во всех возможных попарных сочетаниях. Результаты анализа гаплоидного потомства гибридов между мутантами (табл. 3) показывают, что комплементация носит межгенный характер. Мутации M1, M2, M3 и M4 затрагивают различные несцепленные генетические локусы. Для этих локусов ввели обозначение mmg (mutability of mitochondrial genome), соответственно mmg1, mmg2, mmg3 и mmg4.

^{*} Mol.Gen.Genet., 1976, 144, 119-125.

Таблица 3. Тест на аллельность мутаций, понижающих спонтанную мутабельность митохондриального генома

Скрещивание	Общее число тетрад	Число тетрад*				
		4 ⁺ :0 ⁻	3 ⁺ :1 ⁻	2 ⁺ :2 ⁻	1 ⁺ :3 ⁻	0 ⁺ :4 ⁻
7Ia x 7Ia	22	2I	I	0	0	0
M1a x M1a	13	0	0	0	0	I3
M1a x M2a	34	0	0	6	19	9
M1a x M3a	53	0	0	8	35	10
M1a x M4a	30	0	0	4	18	8
M2a x M2a	19	0	0	0	0	I9
M2a x M3a	61	0	0	11	42	8
M2a x M4a	50	0	0	12	31	7
M3a x M3a	18	0	0	0	0	I8
M3a x M4a	61	0	0	12	39	10
M4a x M4a	14	0	0	0	0	I4

* Расщепление Sta⁺(+) : Sta⁻(-) учитывали только в тетрадах с регулярным расщеплением 2a : 2a .

Естественным подходом к установлению функций локусов mmg служит поиск признаков, находящихся под влиянием этих локусов. В настоящей работе проведен анализ влияния мутаций mmg на чувствительность клеток к индукции мутаций rho⁻ под действием бромистого этидия и на стабильность ядерного генетического фактора p⁻.

Влияние мутаций mmg на индуцированную мутабельность митохондриального генома

Чувствительность к индукции rho⁻ - мутаций под действием бромистого этидия определяли у постмейотических потомков диплоидов гетерозиготных по mmg - мутациям (по четыре тетрады для каждой из mmg - мутаций). Усредненные данные для Sta⁺ и Sta⁻ сегрегантов приведены в табл.4. Видно, что мутация mmg1 снижает чувствительность клеток к мутагенному действию БЭ. В то же время мутации mmg2, mmg3 и mmg4 не оказывают заметного влияния на индукцию мутаций petite .

Дифференциальное влияние мутаций mmg на чувствительность клеток к мутагенному действию БЭ, по-видимому, свидетельствует о разветвленности путей rho⁻ - мутагенеза: гены MMG2, MMG3 и MMG4, необходимые для эффективного спонтанного rho⁻ - мутагенеза, не являются таковыми применительно к мутагенезу под действием бромистого этидия.

Таблица 4. Чувствительность к мутагенному действию бромистого этидия у Sta⁺ и Sta⁻ сегрегантов

сегрегант гибрид	величина диаметра "зоны отсутствия роста", мм	
	Sta ⁺	Sta ⁻
+ / +	36,8 ± 0,7	-
+ / mmg1	39,0 ± 0,5	31,9 ± 0,4
+ / mmg2	35,9 ± 0,3	37,3 ± 0,4
+ / mmg3	37,6 ± 1,1	39,1 ± 1,0
+ / mmg4	35,3 ± 0,5	35,8 ± 0,4

Влияние мутаций mmg на стабильность ядерного генетического фактора p⁻

Мутация mmg1 повышает нестабильность обнаруженного нами менделирующего генетического фактора p⁻. Этот фактор имеет плеiotропное проявление; он ослабляет пигментацию клеток ade1, снижает частоту спонтанных мутаций petite и в гомозиготном состоянии блокирует споруляцию. Спонтанная утрата фактора p⁻ (p⁻ → p⁺) клетками MMG⁺ характеризуется темпом порядка 10⁻⁴ - 10⁻³. Как видно из табл.5, у мутантов mmg1 этот темп увеличен на 2 порядка в первых поколениях после посева. Мутации mmg2-mmg4, в отличие от мутации mmg1, не влияют на частоту спонтанных превращений p⁻ в p⁺.

Таблица 5. Темп спонтанных превращений p⁻ в p⁺ у гаплоидных линий дрожжей

Линии и их генотип	Число повторностей	Число просмотренных колоний	темп переходов p ⁻ → p ⁺
H4, H5, H6 (MMG ⁺ p ⁻)	9	12 593	0,007 ± 0,03
H8 (mmg1p ⁻)	3	3 587	9,7 ± 3,2
H9 (mmg1p ⁻)	3	1 923	13,3 ± 1,5
H10, H11, H12 (mmg1p ⁻)	3	3 607	4,5 ± 0,4
H13, H14, H15 (mmg1p ⁻)	3	2 800	20,0 ± 1,7
H16, H17, H18 (mmg2p ⁻)	3	3 368	0,00
H19 - H24 (mmg3p ⁻)	6	2 885	0,14 ± 0,05
H25, H26 (mmg4p ⁻)	2	2 796	0,07 ± 0,01

Хотя точная природа фактора p^- не установлена (наиболее вероятной представляется дисомия по одной из хромосом), его ядерная локализация не вызывает сомнений. Таким образом, некоторые из генов, необходимых для высокой изменчивости мт генома, имеют существенное значение и для генетических процессов, протекающих в ядрах дрожжевых клеток.

Можно предположить, что продукты хотя бы некоторых генов мтг непосредственно взаимодействуют с мт ДНК, вызывая мутации *petite*. Хорошо известно, что мутации *petite* снижают скорость размножения клеток, их жизнеспособность, нарушают регуляцию метаболизма, блокируют спорообразование. Иными словами, эти мутации едва ли полезны для клеток. Поэтому rho^- - мутагенез, скорее всего, не является единственной целью взаимодействия продуктов генов мтг с мт ДНК. Вполне возможно, что, помимо мутаций *petite*, указанные взаимодействия вызывают какие-то изменения мт генома, имеющие определенный функциональный смысл. Мы приходим таким образом к предположению о функциональной значимости высокой изменчивости мт генома. Данные, согласующиеся с таким предположением, получены при анализе влияния изменчивости мт генома на чувствительность дрожжевых клеток к инактивации азотистой кислотой.

2. Митохондриальный геном и АК-чувствительность.

Влияние митохондриальных мутаций на АК-чувствительность

АК-чувствительность линии X2180-1A находится под контролем нестабильных генетических детерминантов, возможно, митохондриальной природы (Devin, 1979)^{*}. В настоящей работе исследовали влияние митохондриальных мутаций на чувствительность дрожжевых клеток к ингибирующему действию АК.

Линия IXC, несущая мутацию *mmgI*, была использована для получения точковых митохондриальных мутантов. Один из них, IXC-1, оказался нестабильным и с большой частотой выделял rho^+ - ревертантов и rho^- - мутантов. У четырех субклонов линии IXC-1 отобрали по одному rho^+ - ревертанту и одному rho^- - мутанту. Кроме того, у исходной линии IXC и четырех субклонов линии IXC-1 индуцировали бромистым этидием rho^0 - мутантов.

Как видно из рис. 2, rho^- - мутанты значительно более чувствительны к АК, чем rho^+ - линии. rho^+ - ревертанты сходны в отношении АК-чувствительности с исходной линией IXC. Сходство наблюдается и между группами более чувствительных к АК линий - спонтанных rho^- - мутантов и индуцированных бромистым этидием rho^0 - мутантов. По-видимому, именно элиминация мт генома или возникновение

в нем сильно выраженных дефектов вызывает повышение АК-чувствительности у этих линий.

Хотя количественные изменения АК-чувствительности при изменениях мт генома могут быть весьма заметными, вероятно, следует говорить скорее о митохондриальной модуляции, чем о жестком митохондриальном контроле АК-чувствительности. Известны литературные данные о контроле АК-чувствительности со стороны ядерного генома (Praka sh, 1976).

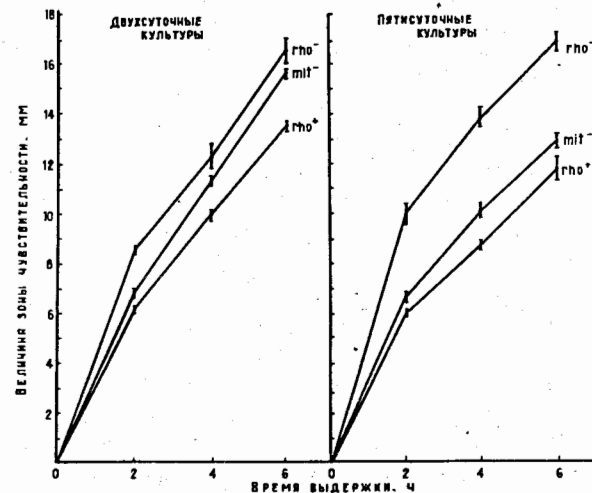


Рис.2. Чувствительность к инактивации азотистой кислотой у линий, несущих различные мутационные изменения митохондриального генома. Использовали культуры в возрасте 2 и 5 суток.

Следует отметить, что клетки mit^- менее АК-чувствительны, чем rho^- , причем при увеличении возраста культур АК-чувствительность линий mit^- несколько уменьшается, в то время как у rho^- и rho^0 практически не изменяется. Обнаруженные различия в АК-чувствительности mit^- и rho^- - линий, а также отсутствие повышения АК-чувствительности при ингибировании митохондриальной трансляции эритромицином и хлорамфениколом (данные приведены в диссертации) показывают, что влияние мт генома на чувствительность к АК, возможно, не связано с митохондриальными активностями, существенными для клеточного дыхания. Сходные выводы были сделаны другими авторами в от-

^{*} Mol.Gen.Genet., 1979, 173, 95-100.

ношении участия мт генома в опоруляции диплоидов (Harting, Breitenbach, 1980; Pratzje et al., 1979), катаболической репрессии (Haussmann, Zimmermann, 1976; Rouslin, 1976), поддержании killer-плазмиды (Wickner, 1977).

В задачи настоящей работы не входило исследование механизма влияния мт генома на АК-чувствительность дрожжевых клеток. Для нас существенно выявление относительно легко тестируемого признака (АК-чувствительность), количественные характеристики которого зависят от состояния мт генома.

Изменчивость мт генома и нестабильность АК-чувствительности

Изучали действие мутации $mmgI$ на уровень и вариабельность АК-чувствительности.

Усредненные данные для клонов $mmgI$ и MMG^+ из тетрад, полученных при споруляции диплоидов MMG^+/MMG^+ и $mmgI/MMG^+$ приведены в табл. 6. Видно, что АК-чувствительность клонов MMG^+ , происходящих от гомо- и гетерозигот по аллели MMG^+ , одна и та же, и они более чувствительны, чем клоны $mmgI$. Эта разница достоверна для всех времен выдержки ($P < 0.001, 0.002, 0.002$ для 4, 6 и 8 ч., соответственно).

Удаление мт ДНК бромистым этидием из клонов MMG^+ и $mmgI$ приводит к повышению АК-чувствительности, причем различия в АК-чувствительности между этими группами клонов практически полностью устраняются (табл. 6). Таким образом, мутация $mmgI$ понижает АК-чувствительность клеток rho^+ , но не вызывает изменений АК-чувствительности у клеток, лишенных мт генома. По-видимому, локус $mmgI$ взаимодействует с мт геномом и это ядерно-цитоплазматическое взаимодействие оказывает заметное влияние на АК-чувствительность клеток.

Вариабельность АК-чувствительности внутри групп генетически идентичных клонов оценивали по дисперсии соответствующих величин зон чувствительности. Данные для каждого клона получены в нескольких повторностях и усреднены. В табл. 7 даны оценки вариабельности уже усредненных значений, отражающие реальные наследуемые различия между клонами внутри группы, а не случайные флуктуации результатов от опыта к опыту.

Как видно из табл. 7, при близких средних значениях АК-чувствительности ее клональная вариабельность в группе $MMG^+ [rho^+]$ значимо выше, чем в группе $MMG^+ [rho^0]$. Таким образом, спонтанные генетические изменения, обуславливающие клональную вариабельность АК-чувствительности, происходят в клетках $MMG^+ [rho^0]$ гораздо реже, чем в клетках $MMG^+ [rho^+]$. Скорее всего, это различие указывает на митохондриальную локализацию рассматриваемых изменений,

Таблица 6. Влияние мутации $mmgI$ на АК-чувствительность пятилучочных культур

Генотип гибридов сегрегантов	Число тетрад	Время выдержки, ч			Величина зоны чувствительности, мм
		2	4	6	
MMG^+/MMG^+					
$MMG^+ [rho^+]$	2	-	10.1±0.4	14.2±0.6	17.9±0.4
$MMG^+ [rho^0]$	5	-	10.6±0.4	14.0±0.6	17.9±0.7
$mmgI [rho^+]$					
$mmgI [rho^0]$	4	-	7.6±0.2	10.4±0.2	13.6±0.3
$MMG^+/mmgI^*$					
$MMG^+ [rho^0]$		8.2±0.2	13.5±0.2	18.3±0.5	-
$mmgI [rho^0]$		9.0±0.3	14.1±0.4	17.8±0.4	-

* 16 из 20 изолированных гаплоидных потомков анализировались в rho^+ и rho^0 состоянии

Таблица 7. Вариабельность АК-чувствительности в разных группах гаплоидных клонов

Генотип клонов	Время вы- держки, ч	Среднее значение величины зоны чув- ствительности, мм	Число степеней свободы f^*	Дисперсия s^2	Критерий F $F = s^2 / s^2_{P_{max}}$
MMG ⁺ [rho ⁺]	4	10.4	16	1.28	-
MMG ⁺ [rho ⁰]	4	13.5	7	0.22	5.82 < 0.025
mmg1 [rho ⁺]	6	10.4	8	0.32	4.00 0.025
MMG ⁺ [rho ⁺]***	6	14.1	16	2.29	-
[rho ⁰]****	4	13.8	14	0.63	3.63 < 0.01
mmg1 [rho ⁺]	8	13.6	7	0.86	2.66 < 0.1

* $f = n-1$, где n - число испытанных клонов; данные для каждого клона определены в 2-4 повторностях и усреднены

** вероятность отсутствия различий между сравниваемыми дисперсиями

*** объединены данные для клонов, происходящих от диплоидов mmg1/MMG⁺ и MMG⁺/MMG⁺

**** объединены данные для клонов mmg1 и MMG⁺

далее именуемых RS - изменениями. В отличие от rho⁻ - мутаций, RS - изменения не нарушают митохондриальных функций, необходимых для дыхания. Вместе с тем, спонтанное возникновение этих двух типов генетических изменений находится под контролем локуса mmgI, поскольку введение в ядерный геном мутации mmgI приводит к значительному снижению клональной вариабельности АК-чувствительности (табл. 7). RS - изменения у клеток MMG⁺, по-видимому, являются одной из причин нестабильности их АК-чувствительности.

Результаты настоящей работы согласуются с представлением о высокой изменчивости мт генома дрожжей как атрибуте его нормального функционирования. Конкретный характер возникающих изменений и функциональная значимость этой изменчивости нуждаются в дальнейшем исследовании.

ВЫВОДЫ

1. Митохондриальный геном оказывает существенное влияние на чувствительность дрожжевых клеток к ингибирующему действию азотистой кислоты (АК). Спонтанные и индуцированные мутации митохондриального генома заметно модифицируют АК-чувствительность.

2. Различия в АК-чувствительности между изогенными по ядерным генам линиями как с нормальным, так и с нарушенным дыханием и характер действия ингибиторов митохондриальной трансляции на АК-чувствительность позволяют заключить, что механизм влияния митохондриального генома на чувствительность дрожжевых клеток к АК не сводится к обеспечению дыхания.

3. В клетках штамма X2180-1A и его производных спонтанно возникают с высокой частотой генетические изменения двух типов: rho⁻ мутации и RS - изменения, по всей вероятности, локализованные в мт геноме. RS - изменения, в отличие от rho⁻ - мутаций, не нарушают дыхания. Они обнаружимы благодаря влиянию на АК-чувствительность клеток. Высокая частота спонтанных RS - изменений определяет нестабильность АК-чувствительности у изученных линий.

4. Изменчивость мт генома у изученных линий находится под контролем ядерных генов mmg (mutability of mitochondrial genome). Идентифицированные неаллельные мутации mmg1 - mmg4 снижают темп образования спонтанных цитоплазматических мутаций petite. У клеток mmg1 снижена также частота RS - изменений. Мутация mmg1, в отличие от мутаций mmg2-mmg4, изменяет чувствительность клеток к индукции мутаций petite под действием бромистого этидия.

5. АК-чувствительность дрожжевых клеток зависит от взаимодействия мт генома с локусом mmgI. В то время как клетки mmg1 [rho⁰] и

MMGI [rho⁰] проявляют одинаковую АК-чувствительность, у клеток
mmgI [rho⁺] АК-чувствительность существенно ниже, чем у клеток
MMGI [rho⁺]

6. Мутация *mmgI*, в отличие от мутаций *mmg2* - *mmg4*, существенно усиливает нестабильность ядерного генетического фактора r^- . По-видимому, некоторые из генов, необходимых для высокой изменчивости мт генома, имеют существенное значение и для генетических процессов, протекающих в ядрах дрожжевых клеток.

По теме диссертации опубликованы следующие работы:

1. Девин А.Б., Колтовая Н.А. Влияние мутаций мт генома на чувствительность дрожжевых клеток к летальному действию азотистой кислоты. - IV Всесоюз. симпозиум: тез. докл., с. 33-34. Изд. Ин-та общей генетики АН СССР, М., 1979.
2. Девин А.Б., Колтовая Н.А. Нестабильность мт генома дрожжей *Sacch. cerevisiae*: генетический контроль и фенотипическое проявление. - IV съезд ВОГиС: тез. докл., ч. I, с. 306, Штиинца, Кишинев, 1981.
3. Девин А.Б., Колтовая Н.А. О генетическом контроле спонтанной мутабельности мт генома дрожжей. - Докл. АН СССР, 1981, т. 256, №2, с. 466-469.
4. Девин А.Б., Колтовая Н.А. Нестабильный генетический фактор у дрожжей-сахаромцетов. - Докл. АН СССР, 1981, т. 261, №4, с. 989-992.
5. Девин А.Б., Колтовая Н.А. Генетическое изучение чувствительности дрожжей-сахаромцетов к летальному и мутагенному действию азотистой кислотой. Сообщение II. Чувствительность к инактивирующему действию азотистой кислоты у линий, обработанных бромистым этидием. - Генетика, 1981, т. 17, №1, с. 66-76.
6. Devin A.B., Koltovaya N.A. Nuclear mutants of yeast with reduced spontaneous mutability of the mitochondrial genome. *Mutation Res.*, 1981, v. 9, N^o6, p. 451-455.
7. Koltovaya N.A., Devin A.B. Effect of mitochondrial mutations on the sensitivity of yeast cells to inactivation by nitrous acid. *Mutation Res.*, 1982, v. 105, N^o5, p. 397-402.

Рукопись поступила в издательский отдел
II апреля 1983 года.