

ВСЕСОЮЗНЫЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ РАДИОЛОГИИ
ГОСАГРОПРОМА СССР

4-446

УДК 577.391
На правах рукописи
19-88-762

ЧЕПУРНОЙ
Александр Иванович

ЗАВИСИМОСТЬ СПОНТАННОГО
И ИНДУЦИРОВАННОГО ОБЛУЧЕНИЕМ МУТАГЕНЕЗА
у *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*
ОТ ФАЗЫ РОСТА И ФАЗЫ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА

Специальность: 03.00.01 – радиобиология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Обнинск 1988

Работа выполнена в Объединенном институте ядерных исследований.

Научный руководитель:
доктор биологических наук, профессор В.И.Корогодин

Официальные оппоненты:
доктор биологических наук, профессор И.А.Захаров
кандидат биологических наук Б.И.Сарапульцев

Ведущая организация - Ленинградский государственный университет.

Защита диссертации состоится "___" _____ 198_ года
на заседании специализированного Совета по радиобиологии Д I20.8I.0I
при Всесоюзном научно-исследовательском институте сельскохозяйственной радиологии Госагропрома СССР (Москва-Центр, ул. Белинского, д.4, комн.300).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Всесоюзного научно-исследовательского института сельскохозяйственной радиологии.
Отзывы на автореферат просим направлять по адресу: 249020, Калужская обл., г.Обнинск, ВНИИСХР, специализированный Совет.

Автореферат разослан "___" _____ 198_ г.

Ученый секретарь
специализированного Совета
кандидат биологических наук

Н.И.Санжарова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы

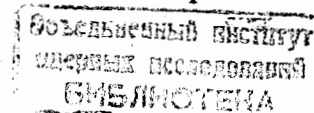
Изучение механизмов мутационного процесса является одной из важнейших задач современной биологии, решение которой имеет огромное значение для биологии вообще и для эволюционного учения в частности. Не менее важна эта проблема и для практики - особенно для сельского хозяйства, микробиологической промышленности и медицины.

В связи с развитием методов исследования ДНК на молекулярном уровне после поразительных успехов молекулярного анализа мутационных изменений ДНК казалось, что мутационным исследованиям грозит опасность быть низведенными до небольшого раздела химии нуклеиновых кислот. Однако проблема мутагенеза, охватывающая во всей своей взаимосвязи такие фундаментальные внутриклеточные процессы, как репарация, репликация и рекомбинация ДНК, чрезвычайно сложна, чтобы быть решенной только с помощью молекулярных методов исследований. Мутагенез, сложный многокомпонентный клеточный процесс, необходимо изучать прежде всего на организменном и особенно клеточном уровнях, что обеспечит успешное исследование мутационного процесса и на уровне молекулярном /1/.

Исследования, проведенные на дрожжах, наряду с работами на бактериях внесли значительный вклад в разработку проблем спонтанного и индуцированного мутационных процессов.

В вопросах мутагенеза у дрожжей к настоящему времени установилось представление, что основным процессом, ответственным за возникновение мутаций, является репарация ДНК /2/. Однако в последние годы появились публикации, в которых описываются случаи зависимости числа мутантов от количества повреждений в ДНК, оставшихся неотрепарированными к моменту репликации /3/, а также отсутствие мутирования при блокировании репликации ДНК в температурочувствительном штамме *Saccharomyces cerevisiae* /4/. Эти работы указывают на важную роль репликации в процессах образования мутаций. Однако исследований, посвященных оценке роли и вклада процессов репликации, репарации и рекомбинации в становление мутаций в клетке на дрожжах не проводилось. Результаты, полученные при изучении мутагенеза у дрожжей, еще недостаточны для того, чтобы представить полную картину процессов, происходящих в клетке при образовании мутаций.

- /1/ Ш.Ауэрбах. Проблемы мутагенеза. М.: Мир, 1978.
- /2/ И.А.Захаров и др. Мутационный процесс у грибов. Л.:Наука, 1980.
- /3/ R.Barale et al. - *Mutat.Res.*, 1982, V.92, P.39.
- /4/ H.Baranowska et al. - *Mutagenesis*, 1987, V.2, N.1, P.1.



Цель и задачи исследования

Цель настоящей работы состоит в разработке подходов к изучению роли и оценке вклада репликации в мутагенез у *Saccharomyces cerevisiae*. Для выполнения работы были поставлены следующие основные задачи:

- Разработать адекватный метод количественной оценки содержания мутантов в культуре в любой требуемый момент при культивировании клеток дрожжей на средах самого разного состава.

- Исследовать образование спонтанных и индуцированных мутантов в разных фазах роста культуры.

- Исследовать образование спонтанных и индуцированных мутантов в разных фазах клеточного цикла дрожжей.

Результаты и выводы работы позволяют приблизиться к пониманию процессов становления мутаций в клетках низших эукариот.

Научная новизна и практическая ценность работы

- Разработана новая методика, позволяющая более корректно, чем традиционные методы, оценивать количественно содержание мутантов в культуре в любой требуемый момент при культивировании клеток на средах самого разного состава.

- Показано, что образование спонтанных и гамма-индуцированных мутантов происходит в S-фазе клеточного цикла. В отсутствие репликации ДНК (в лаг-периоде, в стационарной фазе роста, в G₁- и G₂-фазах клеточного цикла) мутанты не возникают.

- Обнаружено, что образование гамма-индуцированных мутантов зависит от числа пострадиационных делений облученных клеток. Количество генераций, необходимое для полной реализации полученных при облучении премутационных повреждений, зависит от того, в какой фазе клеточного цикла находились клетки в момент облучения.

- Экспериментально показано, что в G₁-фазе клеточного цикла отсутствует накопление спонтанных первичных повреждений, являющихся субстратом для образования спонтанных мутаций. Все события, связанные со спонтанным мутированием, разигрываются в S-фазе клеточного цикла дрожжей.

- Установлено, что частота образования спонтанных реверсов по гену *leu2* у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* зависит от содержания в среде лейцина. При уменьшении содержания лейцина частота образования реверсов увеличивается.

- Обращается внимание на то, что у *Saccharomyces cerevisiae* репарационные процессы, протекающие в G₁- и G₂-фазах клеточного цикла, в образовании спонтанных и гамма-индуцированных мутантов участия не принимают.

Результаты проведенной работы имеют важное значение для дальнейшего развития исследований по проблемам мутагенеза.

Объем работы

Диссертация состоит из введения, 5 глав, заключения и выводов; изложена на 90 страницах машинописного текста, иллюстрируется 18 рисунками и 4 таблицами. Список литературы содержит 82 наименования, из них 23 работы на русском языке.

Апробация

Материалы диссертации доложены на Биофизическом семинаре ОИЯИ (Дубна, 1987, 1988); семинаре лаборатории физиологической генетики Биологического НИИ Лен.гос.университета (1988); семинаре сектора радиационной генетики ЛИЯФ АН СССР (Гатчина, 1988); Всесоюзных совещаниях "Молекулярная генетика дрожжей" (Петергоф, 1987), "Механизмы радиационного мутагенеза" (Пушино, 1988), "Молекулярные механизмы мутагенеза" (Новосибирск, 1988); Международном совещании "Генетическое действие корпускулярных излучений" (Дубна, 1988).

Диссертационная работа апробирована на межлабораторной научной конференции ВНИИСХР, состоявшейся 10 октября 1988 г.

На защиту выносятся:

- Результаты опытов по разработке новой методики количественной оценки содержания мутантов в культуре.

- Результаты исследований спонтанного мутирования клеток дрожжей на средах разного состава, в разных фазах роста культуры и в разных фазах клеточного цикла.

- Результаты исследований гамма-индуцированного мутирования клеток дрожжей на средах разного состава, в разных фазах роста культуры и в разных фазах клеточного цикла.

Источники ионизирующих излучений

Облучение клеток производили на гамма-установке "Свет" при мощности дозы $R \sim 35$ Гр/мин. Клетки облучали как в суспензии, из которой они потом рассевались в чашки Петри, так и прямо в чашках Петри, на твердой питательной среде. Различий в результатах при этих двух способах облучения не наблюдалось.

Штаммы дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*

В работе использованы следующие штаммы дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*: NA3-24 (a leu2-1 lys1-1 RAD), NA3-36 (a ade2-1) и S288C (a) (предоставлен П.Н.Лобачевским, ОИЯИ, Дубна).

Штаммы NA3-24 и NA3-36 были получены нами путем скрещивания штаммов П125-2В (a his1) и X2104-4С (a gal1 mal his5-2 ade2-1 leu2-1 lys1-1 tyr) из коллекции Yeast Genetic Stock Center, Беркли, США (предоставлены Н.А.Колтовой, ОИЯИ, Дубна) и отбора гаплоидных сегрегантов.

Среды

Ростовая среда. Культивирование дрожжей производили на питательной среде M_3 /5/ с добавками необходимых аминокислот: лейцина (30 мг/л); лизина (30 мг/л); аденина (20 мг/л).

Селективная среда. Для выявления мутантов использовали соответствующие селективные среды. Реверсы по гену leu2 (штамм NA3-24) выявляли на среде M_3 с лизином. Реверсы по гену lys1 (штамм NA3-24) - на среде M_3 с лейцином. Клетки штамма NA3-36 - на среде M_3 с аденином. Мутанты по гену LYS2 (штамм S288C) - на среде с альфа-аминоадипиновой кислотой в качестве источника азота /6/. Мутанты по гену CAN1 (штамм S288C) - на среде M_3 с канаванином (60 мг/л). Мутанты, устойчивые к нистатину (штамм S288C), - на среде M_3 с нистатином (150 мг/л).

Полная среда. Полная среда П /5/ использовалась для определения числа жизнеспособных клеток путем посева на нее разведенной суспензии клеток.

/5/ И.А.Захаров и др. Сборник методик по генетике дрожжей-сахаромицетов. Л.: Наука, 1984.

/6/ В.В.Chattoo et al. - Genetics, 1979, V.93, P.51.

Методики

Суспензию дрожжей методом упорядоченного посева /7/ высевали на агаризованную ростовую питательную среду, покрытую лавсановыми ядерными фильтрами (диаметр пор 0,2 мкм, пористость 8-10%) /8/. На одну чашку наносилось 220 инокулюмов. Варьируя концентрацию клеток в суспензии, из которой производили рассев дрожжей, изменяли количество клеток в инокулятах в зависимости от задачи опыта от I до $\sim 10^6$.

Инокулированные клетки в течение опытов выращивали при 30°C. В требуемое время несколько десятков колоний ресуспендировали в воде для определения общего количества клеток в одной колонии (путем микроскопирования суспензии в камере Горяева) и числа жизнеспособных клеток (по количеству выросших колоний при посеве соответствующего разведения суспензии на богатую агаризованную среду П). В то же время необходимое для дальнейшей статистической обработки количество колоний вместе с фильтрами переносили для выявления мутантов на селективную среду. На селективной среде ежедневно производили учет мутантов, образующих видимые глазом колонии вторичного роста. Оценку количества мутантов в момент переноса клеток на селективную среду производили по их числу в "первой волне" выявления /9,10/.

Синхронизацию клеток производили по методу Вильямсона и Скоупса /11/. Продолжительность клеточного цикла у клеток штамма NA3-24 составляет (2,0±0,2) часа. Облучение в G_1 -фазе клеточного цикла производили через 30 мин после посева синхронизированных клеток на чашки, а в G_2 - спустя 30 мин с момента появления почек у 50% клеток (середина S-фазы).

Особенности других приемов, использованных в работе, приведены в соответствующих главах диссертации.

Методы статистической обработки данных

Частоту мутирования рассчитывали по стандартной формуле $R = 1/n \cdot \ln(N/N_0)$, где n - число клеток в одной колонии, N - число колоний, использованных для оценки количества мутантов в культуре, N_0 - число колоний без мутантов из выборки N .

Ошибка рассчитывалась как $\Delta R = \Delta n/n^2 \cdot \ln(N/N_0) + 1/n \cdot \Delta N_0/N_0$.

/7/ Н.Н.Хромов-Борисов. - Тезисы докл. конф. по генетике промышленных микроорганизмов. Цахкадзор. 1973, с.35.

/8/ Г.Н.Флеров. - Вестник АН СССР, 1984, № 4, с.35.

/9/ В.Л.Ильина, В.И.Корогодин. - Генетика, 1987, т.23, № 4, с.630.

/10/ А.И.Чепурной, Н.Михова-Ценова. - PI9-87-563, Дубна, ОИЯИ, 1987.

/11/ D.H.Williamson and A.W.Scores. - Nature, 1962, V.193, p.256.

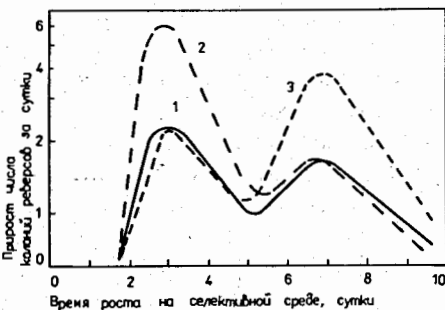
Результаты повторных опытов не различались в пределах ошибки каждого опыта, поэтому объединялись путем расчета средневзвешенной оценки среднего и ее дисперсии /12/.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

I. Разработка метода количественной оценки содержания мутантов в культуре, основанного на использовании ядерных фильтров

На рис. I схематически представлена кинетика выявления реверсов по гену *leu2* после переноса колоний клеток штамма NA3-24 на селективную среду.

Рис. I. Схема выявления реверсов при инкубировании дрожжей на селективной среде. 1 - выявление спонтанных реверсов; 2 - возрастание первой волны кривой в результате облучения исходной культуры за 24 часа до переноса на селективную среду; 3 - возрастание второй волны кривой выявления в результате обогащения селективной среды лимитирующим метаболитом.



Выявление реверсов происходит в виде двух хорошо выделенных волн. Облучение колоний клеток за сутки до переноса их на селективную среду приводит к образованию большого количества индуцированных реверсов. Кривая выявления реверсов в этом случае имеет большую, по сравнению с необлученными колониями, первую волну. Вторые волны практически совпадают. На основании этих данных и материалов, изложенных в диссертации, был сделан вывод, что существующие в колониях на момент переноса реверсы выявляются на селективной среде в виде первой волны.

Если колонии необлученных клеток перенести на полуселективную среду, содержащую небольшое количество лейцина, кривая выявления в этом случае имеет большую вторую волну. Первые волны выявления спонтанных реверсов на селективной и полуселективной средах совпадают.

/12/ Дж.Тейлор. Введение в теорию ошибок. М.: Мир, 1985.

Эти данные свидетельствуют о том, что реверсы из второй волны образовались в результате мутирования клеток при остаточном росте на селективной среде.

В специальных экспериментах было показано, что остаточный рост и мутирование на селективной среде продолжают в течение нескольких первых суток после переноса колоний, причем количество образующихся при этом реверсов совпадает с таковым во второй волне выявления мутантов.

Знание кинетики выявления мутантов на селективных средах позволяет определять количество не только обратных, но и прямых мутантов в культуре, если есть возможность использовать соответствующие селективные среды. Так нами было произведено количественное определение содержания среди клеток штамма S288C прямых мутантов, устойчивых к канаваину, к нистатину, а также мутантов по гену *LYS2*. Результаты, получаемые таким способом, характеризуются удивительным постоянством при повторении опытов.

В экспериментах со смешанной культурой клеток штаммов NA3-24 и NA3-36 показано, что в первой волне происходит практически полное выявление мутантов, существовавших в колониях до их переноса на селективную среду, даже если такие мутанты находятся в колониях в единственном числе среди или под толщей в $2 \cdot 10^6$ исходных клеток.

Использование кинетики выявления для количественной оценки содержания мутантов в культуре при работе с колониями может иметь одно ограничение, а именно: неполное выявление предсуществующих мутантов в первой волне при больших размерах колоний. Это связано с тем, что из-за больших размеров колоний увеличивается время выявления предсуществовавших мутантов. Выявление вторичных мутантов, образовавшихся уже на селективной среде ("вторая волна"), начинается раньше, чем успевают выявиться предсуществовавшие мутанты, это и приводит к неполноте выявления в первой волне существовавших до переноса мутантов. Однако данное ограничение не имеет всеобщего характера. Так, при определении частот прямых мутаций к канаваинуустойчивости и мутаций в гене *LYS2* у клеток штамма S288C мы также наблюдали зависимость выявления от n , в то же время полнота выявления нистатинуустойчивых мутантов не зависела от размеров колоний.

В экспериментах с колониями клеток штаммов NA3-24 и S288C продемонстрировано, что выявление мутантов в первой волне достаточно полное, если используются колонии с $n \leq 8 \cdot 10^6$ при выявлении реверсов по гену *leu2* в колониях клеток штамма NA3-24 и $n \leq 4 \cdot 10^6$ при выявлении мутантов по гену *LYS2* в колониях клеток штамма S288C.

Проведенные исследования позволяют заключить, что в выявлении мутантов на селективных средах есть закономерности, которые необходимо учитывать при количественной оценке содержания мутантов в культуре.

Предложенный способ оценки содержания мутантов в культуре в любой требуемый момент при культивировании клеток на средах любого состава наряду с его эстетическими достоинствами является весьма корректным и может быть рекомендован для широкого применения при проведении исследований по мутагенезу.

2. Изучение спонтанного мутирования *Saccharomyces cerevisiae*

Изучение спонтанного мутирования *Saccharomyces cerevisiae* на средах разного состава, в разных фазах роста культуры и в разных фазах клеточного цикла производилось на примере образования реверсов по гену *leu2* среди клеток штамма NA3-24.

Для определения спектра мутаций все проявившиеся реверсы проверяли на способность расти на среде M_3 . Аллели *leu2-1* и *lys1-1* являются *ochre*-супрессибельными, поэтому если реверс проявил способность расти на среде без лейцина и лизина, его относили к группе супрессорных (S), если же реверс был неспособен расти на M_3 , то его относили к группе локусных (L) реверсий.

Данные, полученные при культивировании дрожжей на средах с разным содержанием лейцина, свидетельствуют о существовании сильной зависимости частоты возникновения спонтанных реверсов по гену *leu2* от содержания в среде лейцина. При уменьшении концентрации лейцина от 30 до 0,3 мг/л частота ревертирования возрастает более чем в 20 раз. В большей степени эта зависимость выражена для реверсов L-типа, в меньшей — для S. При этом частота образования спонтанных реверсов L-типа по гену *lys1* оставалась постоянной в исследованном диапазоне концентраций лейцина. Наличие этих зависимостей находится в соответствии с гипотезой о повышенном мутагенезе на участках ДНК, работающих более активно ^{/13/}, поскольку при уменьшении в среде лейцина действительно происходит активация гена на уровне транскрипции ^{/14/}. Мутация же в локусе *leu2-1* на регуляции гена не сказывается. В рамках этой гипотезы постоянство частоты образования реверсов L-типа по гену *lys1* может быть объяснено независимостью активности *lys1* гена от содержания в среде лейцина.

Даже если дальнейшие исследования покажут, что гипотеза повышенного мутагенеза активно работающих генов неверна, наличие зависимос-

ти частоты ревертирования гена *leu2* от содержания в среде лейцина свидетельствует о том, что дисбаланс предшественников ДНК, который в нашем случае не создается, не является единственным и достаточным объяснением повышенного спонтанного мутирования генов у микроорганизмов, возможно, даже в случаях тиминового или аденинового голодания. Возможно наличие и других механизмов, поиск и проверка которых может открыть путь к решению проблемы спонтанного мутирования генов.

Эксперименты по спонтанному мутированию в разных фазах роста культуры показали, что в отсутствие деления клеток в лаг-фазе и стационарной фазе роста спонтанные мутанты не образуются. В условиях, благоприятных для роста клеток, спонтанные реверсы по гену *leu2* возникают с постоянной, не зависящей от фазы роста частотой $\mu = (2,2 \pm \pm 0,6) \cdot 10^{-8}$ реверсов на клетку на деление.

В опытах с синхронизированной культурой показано, что образование спонтанных реверсов происходит в S-фазе клеточного цикла, то есть во время репликации ДНК.

Широко распространенное мнение об участии процессов репарации в образовании спонтанных мутаций ^{/15/} основано на экспериментальном факте повышения частот спонтанного мутирования генов у дефектных по репарации штаммов и на двух гипотезах: гипотезе существования первичных спонтанных повреждений в ДНК и гипотезе каналирования премутационных повреждений в случае блокирования одного из путей репарации в другие.

С целью проверки предположения о накоплении спонтанных премутационных повреждений во время G_1 -фазы были поставлены следующие эксперименты. Рост клеток на среде с пониженным до 3 мг/л содержанием лейцина характеризовался удлинением клеточного цикла до 10 часов на генерацию. Такое удлинение происходит за счет изменения длительности G_1 -фазы. Естественно предположить, что возрастание частоты мутирования на среде с пониженным содержанием лейцина происходит за счет накопления в удлиненной G_1 -фазе большего количества премутационных или "первичных спонтанных повреждений в ДНК" с последующей реализацией их в мутации во время репликации ДНК.

Часть колоний синхронизированных клеток со среды с 3 мг/л лейцина в разные моменты времени G_1 -фазы переносили на среду с нормальным содержанием лейцина, 30 мг/л, где клетки делились через 2-3 часа после переноса. Соответственно, до и после деления определяли количество мутантов и рассчитывали частоту мутирования на клетку на генерацию. Если премутационные повреждения накапливаются в клетке, то в

^{/13/} В.И.Корогодин и др. - РИ9-88-351, ОИЯИ, Дубна, 1988.

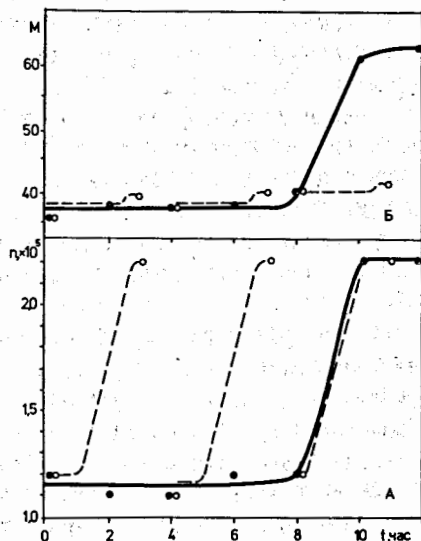
^{/14/} A.Andreadis et al. - J.Biol.Chem., 1984, V.259, N.13, P.8059.

^{/15/} T.Brychcy and R.C. von Borstel. - Mutat.Res., 1977, V.45, P.185.

культурах, перенесенных на среду с 30 мг/л лейцина позже, после деления клеток мы вправе ожидать большего количества реверсов. Результаты представлены на рис.2.

Полученные данные свидетельствуют об отсутствии накопления спонтанных премутационных повреждений. Очень показателен последний перенос — клетки на среде с 3 мг/л лейцина уже практически достигли S-фазы: перенесенные на среду с 30 мг/л лейцина клетки и неперенесенные поделались одновременно, однако количество мутантов в них существенно различалось. Если бы в G₁ происходило накопление премутационных повреждений, а в S-фазе они закреплялись в мутациях, тогда количество мутантов в обеих группах совпадали бы. Однако этого не наблюдается.

Рис.2. Проверка гипотезы о накоплении спонтанных премутационных повреждений ДНК во время G₁-фазы клеточного цикла, А — количество клеток с почками в одной колонии на средах с пониженным (●) и после переноса их на среду с нормальным (○) содержанием лейцина. Б — количество колоний со спонтанными реверсами в выборках из N = 1100.



Полученные данные позволяют полагать, что нарушение нормального протекания репликации из-за плейотропного действия мутаций по репарации может приводить к повышению частоты образования спонтанных мутаций вследствие возрастания ошибок репликации. Основанием для такого предположения является отсутствие накопления первичных спонтанных повреждений ДНК в клетках в G₁-фазе, связанное, скорее всего, с отсутствием их вообще.

Таким образом, если наш штамм не является исключением, следует заключить, что у дрожжей отсутствует накопление первичных спонтанных повреждений ДНК; все события, связанные со спонтанным мутированием,

разыгрываются в S-фазе клеточного цикла. Возникновение мутантов в S-фазе является, скорее всего, следствием ошибок репликации ДНК. В отсутствие репликации ДНК спонтанные мутанты не образуются.

3. Изучение индуцированного мутирования *Saccharomyces cerevisiae*

Изучение индуцированного мутирования *Saccharomyces cerevisiae* на разных средах, в разных фазах роста культуры и в разных фазах клеточного цикла производилось на примере образования реверсов по гену *leu2* среди клеток штамма NA3-24 при облучении гамма-лучами в диапазоне доз от 7 до 2000 Гр.

Эксперименты с индуцированным мутагенезом в разных фазах роста культуры показали, что в отсутствие деления клеток с момента их облучения до переноса на селективную среду в культуре отсутствует образование индуцированных реверсов. Появление индуцированных реверсов регистрировалось только тогда, когда клетки после облучения имели возможность размножиться. Причем количество индуцированных мутантов зависело от числа пострадиационных делений клеток.

Опыты с синхронизированными клетками полностью подтвердили эти наблюдения. Так, если после облучения клеток в экспоненциальной фазе роста образование индуцированных реверсов наблюдалось в течение 12–15 часов пострадиационного инкубирования (после чего частота мутирования падала до спонтанного уровня), то эксперименты с синхронной культурой показали, что после облучения клеток в G₁-фазе клеточного цикла образование индуцированных реверсов продолжалось в течение 6 часов, а после облучения в G₂-фазе — основное количество индуцированных мутантов образовывалось на 10–15 ч пострадиационного инкубирования (рис.3). Такое растянутое пострадиационное мутагенное действие наблюдалось при всех дозах в диапазоне от 35 до 2000 Гр. Задержка начала образования индуцированных мутантов при облучении клеток в G₂-фазе до 10-го часа пострадиационного инкубирования, по нашему мнению, вызвана задержкой получивших повреждения клеток на G₂-м стадии клеточного цикла. Задержка деления клеток после облучения наблюдается всегда, и максимальна она как раз при облучении клеток в G₂-фазе клеточного цикла /16/.

По количеству индуцированных мутантов после длительного периода их образования были рассчитаны частоты мутирования при облучении клеток в G₁, G₂-фазах клеточного цикла и в период экспоненциального роста культуры в разных дозах. В исследованном диапазоне доз от 7 до 2000 Гр наблюдался линейный характер зависимости частоты мутирования

/16/ S.Lucke-Nuhle et al. — Radiat.Res., 1979, V.79, P.79.

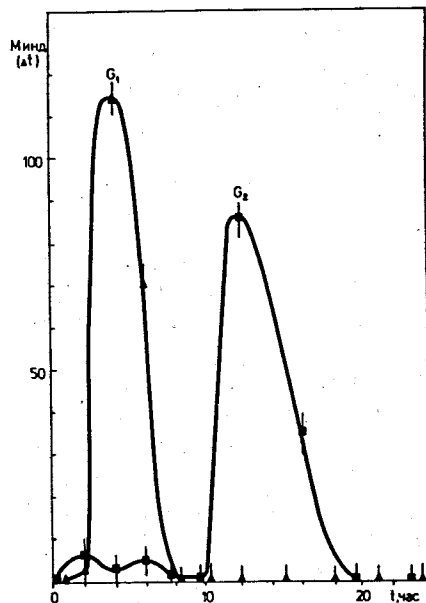


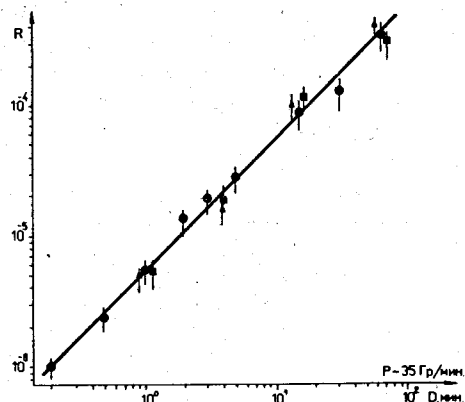
Рис.4. Зависимость частоты образования индуцированных реверсов по гену *leu2* от доз гамма-излучения при облучении клеток штамма NA3-24, находящихся в G_1 (\blacktriangle), G_2 (\blacksquare) фазах клеточного цикла и экспоненциальной фазе роста (\bullet).

от дозы гамма-излучения. Частоты образования индуцированных реверсов не зависели от физиологического состояния клеток и определялись лишь дозой облучения (рис.4).

Если в случае спонтанного мутагенеза существование премутационных повреждений ДНК находится под сомнением, то в случае индуцированного — существование премутационных повреждений сомнения не вызывает. Когда в этом случае происходит их реализация в мутации?

На рис.5 приведены результаты опытов по определению фазы клеточного цикла, в которой происходит возникновение гамма-индуцированных мутантов. Синхронизированные клетки высевали методом упорядоченного посева на чашки и помещали в термостат. Через каждые 30 мин инкубирования несколько чашек с колониями дрожжей облучали в дозе 35 Гр. По-

Рис.3. Накопление колоний с гамма-индуцированными реверсами по гену *leu2* в выборках из $N=660$ колоний клеток штамма NA3-24 после облучения их в дозе 35 Гр в G_1 (\blacktriangle) и G_2 (\blacksquare) фазах клеточного цикла. При облучении в G_1 , $n \sim 2,1 \cdot 10^5$, выживаемость $45 \pm 10\%$; в G_2 — $n \sim 5,5 \cdot 10^4$, выживаемость $74 \pm 10\%$.



ловину из этих колоний сразу после облучения переносили на селективную среду для выявления реверсов по гену *leu2*, другую половину переносили на селективную среду через 30 мин пострадиационного инкубирования в термостате.

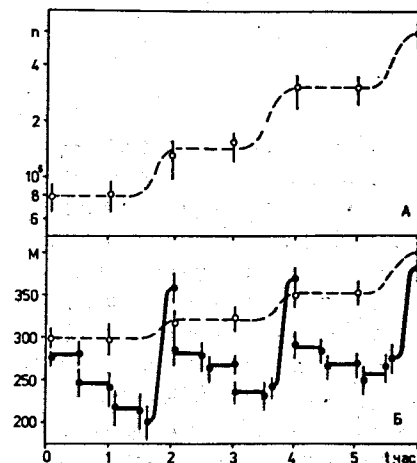


Рис.5. Определение фазы клеточного цикла, в которой происходит образование гамма-индуцированных мутантов. А — количество клеток в одной колонии синхронизированной культуры клеток штамма NA3-24. Б — количество колоний с реверсами в необлученной (\circ) и облученных (\bullet) культурах сразу после облучения и через 30 минут пострадиационного инкубирования в выборках из $N=1100$.

Данные, полученные в этих опытах, однозначно указывают, что возникновение гамма-индуцированных мутантов происходит в S-фазе клеточного цикла независимо от того, когда клетки были облучены. Пострадиационное инкубирование приводило к образованию индуцированных реверсов в случае, если в течение этого инкубирования в культуре имела место репликация ДНК. До и после репликации мутанты не образовывались.

На рис.6 приведены данные о содержании индуцированных мутантов в облученной сразу после посева (в G_1 -фазе) синхронизированной культуре клеток штамма NA3-24 в течение клеточных циклов первых четырех генераций после облучения.

Как уже говорилось выше, образование индуцированных реверсов при облучении в G_1 -фазе не ограничивается первой пострадиационной репликацией, а наблюдается в течение 6 часов пострадиационного инкубирования или в течение первых трех генераций облученных клеток. В данном случае (рис.6B) мы имеем "тонкую структуру" пика, представленного ранее на рис.3 при облучении клеток в G_1 -фазе и переносе облученных клеток на селективную среду через каждые два часа. Как видно на рис.6, образование индуцированных мутантов не является монотонным в течение 6-часового инкубирования, что можно было бы ожидать из-за дисперсии

задержки клеточного деления у получивших повреждения клеток, а привязано к трем последовательным фазам репликации ДНК.

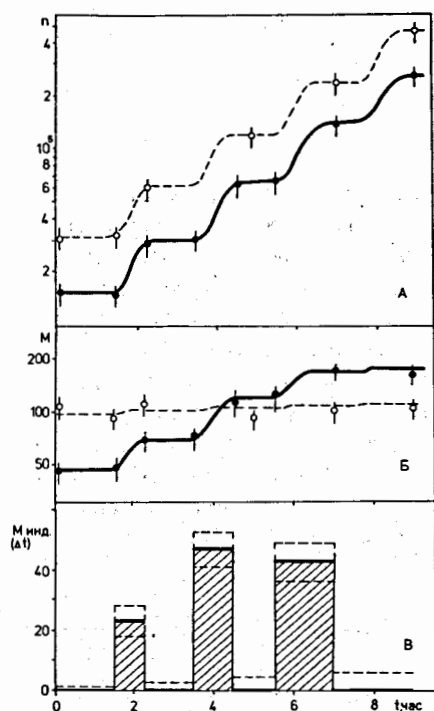


Рис.6. Спонтанный и индуцированный мутагенез в клетках штамма NA3-24 в течение первых четырех генераций после облучения в дозе 35 Гр. А - число жизнеспособных клеток в одной колонии в необлученной (○) и облученной (●) культурах. Б - количество колоний с реверсами по гену leu2 в выборках из N=880. В - прирост числа колоний с индуцированными реверсами за промежутки времени.

Образование индуцированных реверсов во второй и третьей после облучения фазах репликации, на наш взгляд, является следствием возможности сохранения в клетках премутационных повреждений без реализации их в мутации в течение нескольких делений. При этом не исключено, что премутационные повреждения могут наследоваться дочерними клетками.

Приведенные данные, а также материалы, изложенные в диссертации, позволяют заключить, что в G₁- и G₂-фазах клеточного цикла образования гамма-индуцированных мутантов не происходит. Данное обстоятельство свидетельствует о том, что в образовании гамма-индуцированных мутантов репарационные процессы, протекающие в G₁- и G₂-фазах клеточного цикла, участия не принимают.

Как было показано, спонтанные и гамма-индуцированные мутанты образуются в S-фазе клеточного цикла. Однако это еще не означает, что механизмы спонтанного и индуцированного мутагенеза у дрожжей одинаковы. Представленные на рис.7 данные позволяют полагать, что они различаются.

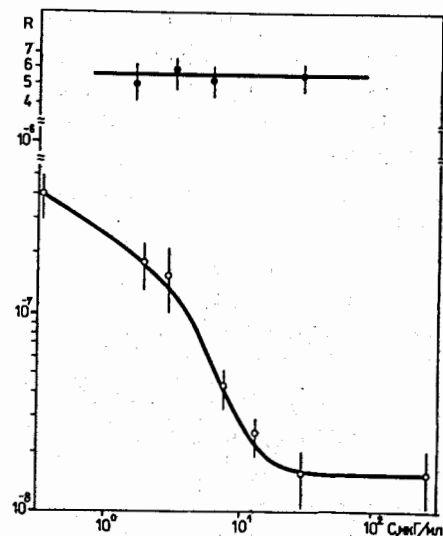


Рис.7. Частоты спонтанного (○) и гамма-индуцированного (●) при облучении клеток в дозе 35 Гр/ревертирования гена leu2 в клетках штамма NA3-24 на средах с разным содержанием лейцина.

Ранее уже была описана зависимость частоты спонтанного ревертирования гена leu2 от содержания в среде лейцина. При уменьшении содержания лейцина частота спонтанного ревертирования гена leu2 резко возрастает. В случае одинаковых механизмов спонтанного и индуцированного мутагенеза мы вправе при уменьшении содержания в среде лейцина ожидать аналогичной зависимости и для частоты индуцированного ревертирования. Однако частота гамма-индуцированного мутирования гена leu2 после облучения в дозе 35 Гр, рассчитанная с учетом зависимости образования индуцированных реверсов от числа последующих после облучения генераций и вычета спонтанных реверсов, оказалась одинаковой и не зависящей от содержания в среде лейцина.

В Н В О Д Н

1. Разработанная новая методика количественной оценки содержания мутантов в культуре, основанная на использовании ядерных фильтров и знании кинетики выявления мутантов на селективных средах, позволяет корректно оценивать число мутантов в культуре в любой требуемый момент при культивировании клеток на средах самого разного состава.
2. Частота образования спонтанных реверсов по гену leu2 у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* зависит от содержания в среде лейцина. При уменьшении содержания лейцина частота образования реверсов увеличивается.
3. Частота образования спонтанных мутантов (на примере образования реверсов по гену leu2) не зависит от фазы роста культуры и являет-

ся величиной постоянной в расчете на исходную клетку на деление.

4. Спонтанные мутации у дрожжей образуются в S-фазе клеточного цикла, по-видимому, в результате ошибок репликации. В отсутствие репликации ДНК (в лаг-периоде, стационарной фазе роста, G₁-фазе клеточного цикла) спонтанные мутанты не возникают.
5. В G₁-фазе клеточного цикла у дрожжей отсутствует накопление спонтанных премутационных повреждений ДНК.
6. Гамма-индуцированные мутанты образуются в S- фазе клеточного цикла, независимо от того, в какой фазе цикла клетки подвергались облучению. В G₁- и G₂-фазах клеточного цикла образования мутантов не происходит.
7. Репарационные процессы, протекающие в G₁-и G₂-фазах клеточного цикла, в образовании спонтанных и гамма-индуцированных мутантов участия не принимают.
8. Образование гамма-индуцированных мутантов у дрожжей (на примере образования реверсов по гену *leu2*) не является одномоментным, а растянуто во времени. Количество генераций, необходимое для полной реализации полученных при облучении премутационных повреждений, зависит от того, в какой фазе цикла клетки подвергались облучению. Реализация премутационных повреждений в индуцированные мутации происходит в течение нескольких пострадиационных репликаций.

По теме диссертации опубликованы следующие работы:

- Чепурной А.И., Михова-Ценова Н. Закономерности выявления мутантов на селективных средах. - Р19-87-563, ОИЯИ, Дубна, 1987.
- Чепурной А.И., Михова-Ценова Н. Влияние содержания лейцина в питательной среде на частоту возникновения реверсов у гаплоидных дрожжей. Р19-88-333, ОИЯИ, Дубна, 1988.
- Чепурной А.И., Михова-Ценова Н., Брунцова Х. Зависимость спонтанного мутирования гена *leu2* у *Saccharomyces cerevisiae* от фазы роста и фазы клеточного цикла. Р19-88-339, ОИЯИ, Дубна, 1988.
- Чепурной А.И., Михова-Ценова Н., Брунцова Х. Закономерности образования гамма-индуцированных мутантов *Saccharomyces cerevisiae*. Р19-88-340, ОИЯИ, Дубна, 1988.
- В.И.Корогодина, Н.О.Абетян, Х.Брунцова, Н.Л.Джанполадян, В.Л.Корогодина, Н.Михова-Ценова, Н.В.Симонян, Ч.Файси, А.И.Чепурной. Спонтанный мутагенез и условия культивирования клеток. Р19-88-351, ОИЯИ, Дубна, 1988.

Рукопись поступила в издательский отдел
21 октября 1988 года.