

243-00



ОБЪЕДИНЕННЫЙ
ИНСТИТУТ
ЯДЕРНЫХ
ИССЛЕДОВАНИЙ

Дубна

P19-2000-273

Н.А.Колтовая¹, Е.С.Майорова, А.В.Рзянина,
А.С.Герасимова², А.Б.Девин³

НОВЫЕ МУТАЦИИ ГЕНОВ *SRM*
SACCHAROMYCES CEREVISIAE
И НЕКОТОРЫЕ ОСОБЕННОСТИ
ИХ ФЕНОТИПИЧЕСКОГО ПРОЯВЛЕНИЯ

Направлено в журнал «Генетика»

¹E-mail: kolt@cv.jinr.dubna.su

²Институт молекулярной генетики им. М.Планка, Берлин (Далем), Германия

³Институт молекулярной генетики РАН, Москва

ВВЕДЕНИЕ

Гаплоидные клетки *Saccharomyces cerevisiae* способны поддерживать, наряду с жизненно необходимыми компонентами наследственного аппарата - хромосомами, факультативные генетические структуры (ФГС): избыточные природные хромосомы, геном митохондрий, рекомбинантные плазмиды. Точность митотической трансмиссии (митотическая стабильность) хромосом эуплоидного набора весьма высока (частота спонтанной утраты хромосомы 10^{-7} и ниже). У ФГС, сравнительно с жизненно необходимыми хромосомами, митотическая стабильность вообще существенно ниже, и между различными ФГС могут быть весьма значительные различия по этому параметру.

Ранее нами были получены данные, показывающие, что механизмы, которые определяют уровни митотической стабильности различных ФГС, вероятно, перекрываются или координированно регулируются. В частности, мы обнаружили, что мутация в гене *SRM5/CDC28*, играющем, как хорошо известно, центральную роль в регуляции клеточного цикла, вызывает изменения митотической стабильности как ядерных, так и митохондриальных ФГС [1, 2]. Мы обнаружили также, что та же мутация *srm5 (cdc28-srm)* сопровождается повышением чувствительности дрожжевых клеток к летальному действию ионизирующей радиации [3]. Таким образом, между поддержанием ФГС, регуляцией клеточного цикла и определением радиочувствительности клеток *S. cerevisiae* выявлена связь на уровне наследственной детерминации.

Для исследования этой связи мы сочли целесообразным применить генетический подход. Используя УФ-индуцированный мутагенез, отобрали в дополнение к *cdc28-srm* мутанты по другим ядерным генам, обозначенным *SRM*, у каждого из которых изменена митотическая стабильность не только генома митохондрий, но и избыточных природных хромосом [4]. В настоящей работе охарактеризовано влияние некоторых новых мутаций *srm* на поддержание генетических структур и на чувствительность дрожжевых клеток к ионизирующей радиации.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Штаммы микроорганизмов. Штаммы дрожжей, использованные в работе, перечислены в табл. 1. Линию *E. coli* DH5 использовали для манипулирования с плазмидной ДНК. В качестве реципиента фагмиды использовали штамм XL-1Blue («Stratagene») [5].

Плазмиды и библиотека геномной ДНК дрожжей. Библиотека ДНК *Saccharomyces cerevisiae*, названная 2J351 [6], получена в результате частичного гидролиза геномной ДНК рестриктазой *Sau3A* и лигирования по *BamHI*-сайту плазмиды YEp351 [7], имеющей селективный *LEU2*-маркер и *ori*-репликации из 2 μ плазмиды. В работе применяли также стандартные плазмиды YCp50 [8], YEp13 [9], YRp12 [10]. Для секвенирования фрагмента ДНК использовали фагмиду pTZ19U [5] и фаг-помощник M13K07.

Таблица 1. Штаммы, использованные в работе

Штамм	Генотип
C3x711 (VII) (1,2)	<i>MATα/MATα SRM+/srm8 ade2/ade2 ade6/+ leu1/+ cyh2/+</i>
C3 (VII)(1-3)	<i>MATα/MATα srm8/srm8 ade2/ade2 ade6/+ leu1/+ cyh2/+</i>
C9x711 (VII) <i>cyh2/+</i>	<i>MATα/MATα SRM+/srm12 ade2/ade2 ade6/+ leu1/+</i>
C9 (VII) (1,3,4,5)	<i>MATα/MATα srm12/srm12 ade2/ade2 ade6/+ leu1/+ cyh2/+</i>
C14 (VII) (1,2)	<i>MATα/MATα srm15/srm15 ade2/ade2 ade6/+ leu1/+ cyh2/+</i>
F5 (VII) (3) <i>cyh2/+</i>	<i>MATα/MATα srm17/srm17 ade2/ade2 ade6/+ leu1/+</i>
<i>srm15/srm15</i> (1,2,3)	<i>MATα/MATα srm15/srm15</i>
<i>srm17/srm17</i> (1,3)	<i>MATα/MATα srm17/srm17</i>
3D	<i>MATα SRM+ ade2 trp1 ura3</i>
1B	<i>MATα SRM+ ade2 trp1 ura3</i>
<i>a srm8</i>	<i>MATα srm8 ade2 trp1 ura3</i>
<i>α srm8</i>	<i>MATα srm8 ade2 trp1 ura3</i>
<i>a srm12</i>	<i>MATα srm12 ade2 trp1 ura3</i>
<i>α srm12</i>	<i>MATα srm12 ade2 trp1 ura3</i>
<i>a srm15</i>	<i>MATα srm15 ade2 trp1 ura3</i>
<i>α srm15</i>	<i>MATα srm15 ade2 trp1 ura3</i>
<i>a srm17</i>	<i>MATα srm17 ade2 trp1 ura3</i>
<i>α srm17</i>	<i>MATα srm17 ade2 trp1 ura3</i>
C3 <i>leu-</i>	<i>MATα srm8 ade2 leu2</i>
SRM+	<i>MATα SRM+ ade1 leu2</i>
<i>srm8/srm8</i>	<i>MATα/MATα srm8/srm8 leu2/leu2</i>
71a	<i>MATα ade1</i>
71α	<i>MATα ade1</i>
STX-9-1A	<i>MATα arg3 ade2 gal2</i>
S1780C	<i>MATα ura2 his6 arg4 thr1 met1 gal2</i>

Среды и реактивы. Использовали стандартную полную питательную среду YEPD [11] и среды BC, MM, LCD, описанные ранее [2], эндонуклеазы рестрикции и другие ферменты фирмы «Ферментас» (Вильнюс), бромистый этидий («Sigma») (10 мг/мл), циклогексимид (actidione, «Serva») (1 мг/мл).

Трансформация клеток дрожжей плазмидной ДНК осуществлялась согласно стандартной методике [12].

Секвенирование. *Sta-Xba*-фрагмент ДНК длиной 3 т.п.н. клонировали в фагмиде pTZ19U, которую переводили в однокитевую форму, используя фаг-помощник M13K07. Реципиентом служил штамм XL-1Blue («Stratagene»). Выделение однокитевой ДНК проводили по стандартной методике [5]. При

очистке плазмидной ДНК использовали сорбент Bluesorb («Clonogene», С.-Петербург). Определение нуклеотидной последовательности ДНК проводили на секвенаторе ABI PRISM 3700 с набора цветных флуоресцентных терминаторов (ABI PRISM Dye Terminator Kit (with AmpliTaq), «Perkin Elmer»), используя праймеры M13Up и M13Rev. При анализе нуклеотидной последовательности использовали базы данных GenBank.

Оценка скорости размножения клеток дрожжей. Клетки подращивали в жидкой среде YEPD при 30°C в условиях аэрации в течение ночи, разводили в свежей среде до первоначальной концентрации 10^5 - 10^6 клеток в 1 мл, вновь подращивали, встряхивая при 30°C, до концентрации 10^7 - 10^8 клеток в 1 мл. Через определенные промежутки времени с помощью камеры Горяева устанавливали концентрацию клеток в растущей культуре. Линейный участок полученной кривой роста использовали для расчета величины времени генерации.

Оценка митотической стабильности VII хромосомы. Локус *ade6*, находится в правом плече VII хромосомы *S. cerevisiae*, локусы *cyh2* и *leu1* расположены в ее левом плече. Мутациями упомянутых трех локусов маркировали один из гомологов VII хромосомы диплоидных клеток, тогда как второй гомолог нес их нормальные аллели. Кроме того, клетки были гомозиготны по рецессивной мутации *ade2*, вызывающей накопление красного пигмента. Потеря такими клетками немаркированной VII хромосомы должна приводить к одновременному проявлению мутаций *ade6*, *cyh2* и *leu1* [13]. В частности, клетки *ade2/ade2 ade6/0* не должны накапливать пигмент. Колонии, выращенные на среде БС в течение 5 суток из отдельных диплоидных клеток, у которых один из пары гомологов VII хромосомы маркирован упомянутыми тремя мутациями, суспендировали в воде и рассеивали в соответствующем разведении на среды БС и БС+*cyh*. Отбирали белые (*ade6*) циклогексимид-резистентные (*cyh2*) колонии и проверяли их на ауксотрофность по лейцину (*leu2*) на селективной среде ММ-*leu*. Клетки, имевшие все три мутантных признака, считали утратившими немаркированный гомолог VII хромосомы.

Определение митотической стабильности рекомбинантных плазмид. Культуры гаплоидных трансформантов выращивали на неселективной среде БС [в случае присутствия в клетках центромерной плазмиды YCr50 (ARS1 URA3 CEN1)] или на селективной среде ММ-*ura* [в случае трансформантов, несущих бесцентромерную плазмиду YRp12 (ARS1 URA3)]. Водные суспензии выращенных культур в соответствующем разведении высевали на неселективную среду. В посевах определяли долю колоний *Ura*⁺, служившую мерой митотической стабильности плазмиды.

Определение γ -чувствительности. Водные суспензии (10^3 - 10^5 кл/мл) клеток 7-суточных стационарных культур, выросших на агаризованной среде БС, облучали во льду на установке «Свет» (^{137}Cs), мощность дозы составляла 25 Гр/мин. Контрольные и облученные суспензии рассеивали на чашки со средой БС из расчета 100 жизнеспособных клеток на чашку и инкубировали 5-7 суток при 30°C.

Индукция бромистым этидием ρho° -мутантов. Использовали методику, предложенную Clark-Walker [14], с некоторыми модификациями. На поверхность

среды LCD, поверх впитавшейся в нее капли раствора бромистого этидия (10 мг/мл) петлей наносили клетки дрожжей. Посев инкубировали 24 часа, после чего с краев «мертвой зоны» отбирали клетки и несколько раз последовательно субклонировали на среде LCD. Колонии *petite* на этой среде легко идентифицировать благодаря их малым размерам. По литературным данным мутанты *petite*, полученные таким способом, полностью лишены мтДНК и, следовательно, являются мутантами *rho*⁰.

Индукция мутаций rho⁰ бромистым этидием. В жидкую среду БС с экспоненциально размножающимися клетками (10⁵ - 10⁶ клеток в мл) добавляли БЭ (10 мкг/мл). Спустя определенное время клетки отмывали и рассеивали в подходящем разведении на агаризованную среду БС. Посевы инкубировали 5 суток, затем определяли частоту мутантных *rho*⁻ колоний.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Фенотипические особенности отобранных srm-мутантов

После УФ-облучения культуры клеток штамма-дисомика и значительного количества бэкриссов выделили ряд мутантов *srm*, в половом потомстве которых моногенно наследовалась характерная для этих мутантов сниженная спонтанная *rho*⁻ мутабельность [4]. В настоящей работе описываются свойства четырех неаллельных мутантов из этой коллекции.

Как уже отмечалось [4], из четырех соответствующих неаллельных мутаций *srm* две, а именно *srm8* и *srm12*, вызывают у клеток заметные морфологические изменения. В *srm12*-мутантных культурах значительное количество клеток имеет несколько вытянутую форму, даже при микроскопировании очевидно наличие в таких культурах большого количества нежизнеспособных клеток. Большинство клеток в культурах линий *srm8* имеет отчетливо вытянутую форму. Мутации *srm8* и *srm12* существенно снижают скорость размножения клеток (табл. 2).

Таблица 2. Влияние мутаций *srm* на скорость размножения диплоидных культур

Штаммы	Генотип	Число клонов	Число поколений	Время генерации, мин
C3x711(VII) (2,3)	<i>srm8</i> /+	2	3 - 5	75.9 ± 3.7
C3(VII) (1,2,3)	<i>srm8</i> / <i>srm8</i>	3	2	200.7 ± 9.0
C9(VII) (1,3,4,5)	<i>srm12</i> / <i>srm12</i>	4	3 - 6	126.4 ± 3.2
<i>srm15</i> x <i>srm15</i> (1,2,3)	<i>srm15</i> / <i>srm15</i>	3	7 - 9	113.0 ± 12.0
<i>srm17</i> x <i>srm17</i> (1,3)	<i>srm17</i> / <i>srm17</i>	2	4	78.7 ± 3.3

В старых культурах линий *srm12*, несущих одновременно *ochre*-супрессибельную мутацию *ade2-101*, накапливается большое количество *Ade*⁺-ревертантов (по этой причине для таких линий оказывается непригодным способ музейного хранения, использующий высушивание культур в сгущенном молоке).

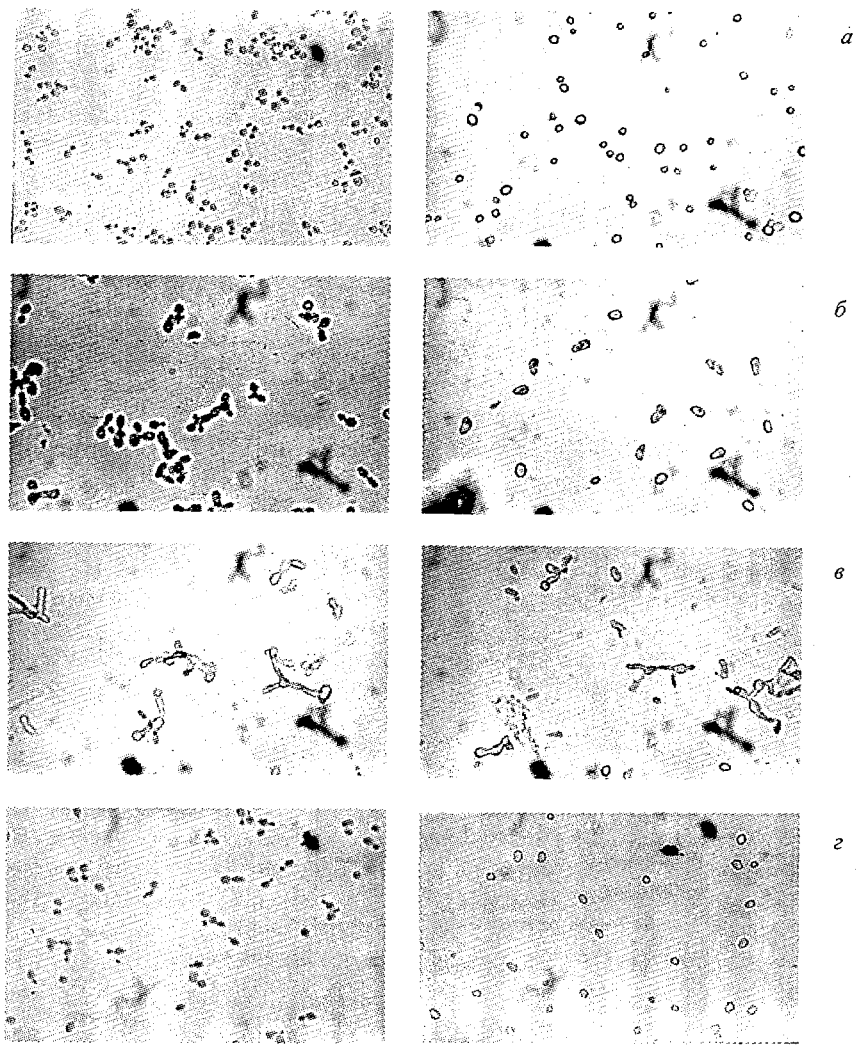


Рис. 1. Покоящиеся (слева) и почкующиеся клетки *SRM+* (а), *srm5* (б), *srm8* (в), *srm12* (г)

У ревертантов практически отсутствуют характерные фенотипические особенности (морфологические изменения и замедленное размножение) исходных мутантов *srm12*. Исчезновение этих особенностей наблюдается и в случае выращивания культур клеток *srm12* при повышенной температуре. При 37°C клетки в этих культурах активно размножаются, их форма становится менее вытянутой. Клетки с мутацией *srm8* при 37°C, напротив, размножаются существенно медленнее, чем при 30°C, их морфологические аномалии при повышенной температуре выражены сильнее. В некотором смысле можно говорить о температурочувствительности соответствующей мутации (забегая вперед, отметим, однако, что ген *SRM8* может быть разрушен без утраты жизнеспособности клетками). Мутации *srm8* и *srm12*, как уже указывалось, практически полностью блокируют споруляцию у гомозиготных мутантных диплоидов [4].

В связи с вытянутостью формы клеток *srm8* и *srm12* анализировали характер почкования мутантных клеток (известно, что для круглых гаплоидных клеток типично аксиальное почкование, т. е. образование новых почек парой, состоящей из материнской и дочерней клетки, вблизи места соединения последних, тогда как более вытянутым диплоидным клеткам свойственно биполярное почкование). Наблюдая за начальным этапом образования колоний (на стадии четырех клеток, рис. 1), мы обнаружили, что для клеток *SRM+* типично образование почек рядом с местом соединения материнской и дочерней клеток. У мутантов *srm12* и *srm8* довольно часто (20%) наблюдается возникновение почки с противоположной стороны от места соединения материнской и дочерней клеток.

Мутации *srm15* и *srm17* не вызывают у клеток значительных морфологических изменений. Мутация *srm15*, подобно *srm8* и *srm12*, вызывает значительное снижение скорости размножения клеток (табл. 2). Влияние мутации *srm17* на скорость размножения относительно невелико.

Индукция мутаций rho⁻ бромистым этидием у клеток различных генотипов

От скрещиваний каждого из мутантов *srm8*, *srm12*, *srm15* и *srm17* с родительскими линиями 711a или 711α отобрали по 2 полных тетрады. Для каждого клона из этих тетрад определили чувствительность к мутагенному действию БЭ. Полученные результаты (рис. 2) свидетельствуют об отчетливом снижении чувствительности к мутагенному действию БЭ у клонов *srm8*. Мутации *srm12*, *srm15*, *srm17* не обнаруживают существенного влияния на *rho⁻*-мутабельность клеток под действием БЭ (данные не приведены).

Влияние мутаций srm на митотическую стабильность хромосом

Проведенная ранее оценка влияния мутаций *srm* на митотическую стабильность избыточных хромосом у дисомиков [4] выявила примерно тридцатикратное повышение темпа спонтанной потери XIV хромосомы у клеток *srm12* сравнительно с дисомиками *SRM+*. Гораздо более слабое, но все-таки статистически значимое повышение величины упомянутого темпа вызывала также мутация *srm15*. Оценку влияния мутаций *srm8* и *srm17* на поддержание

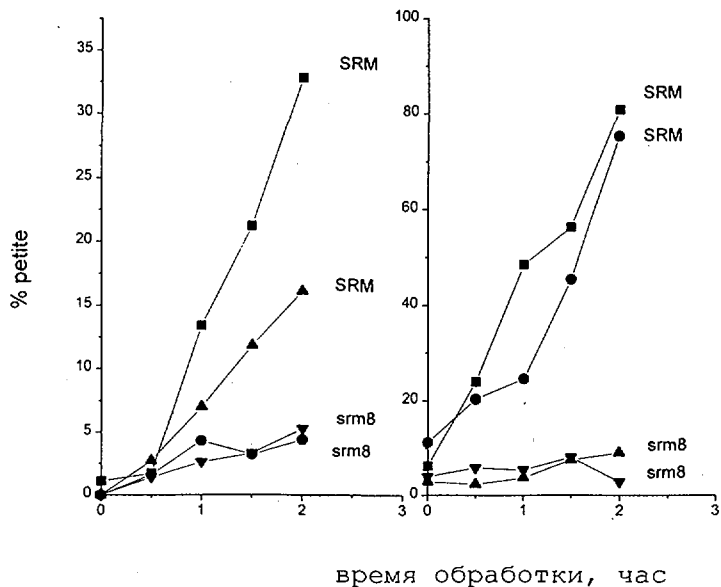


Рис. 2. Зависимость выхода индуцированных мутаций *rho*⁻ от времени обработки культур бромистым этидием (10 мкг/мл). Представлены данные для моноспоровых клонов *SRM*⁺ и *srm8*, происходящих из двух тетрад

избыточных хромосом провести не удалось из-за очень медленного размножения соответствующих мутантных дисомиков.

Была также предпринята попытка оценить влияние мутаций *srm* на точность митотической трансмиссии хромосом у эуплоидных клеток. Для этой цели использовали генетическую систему, которую предложили Пэрри и Циммерманн

Таблица 3. Митотическая стабильность VII хромосомы у диплоидов

Штаммы	Генотип	Число клонов	Частота потери хромосом, %
C3(VII) (1,2,3)	<i>srm8/srm8</i>	3	$(4.2 \pm 2.1) \times 10^{-5}$
C3x711(VII) (2,3)	<i>srm8/+</i>	2	$(1.5 \pm 0.6) \times 10^{-7}$
C9(VII) (1,3,4,5)	<i>srm12/srm12</i>	4	$(6.2 \pm 3.9) \times 10^{-7}$
C9x711(VII) (2)	<i>srm12/+</i>	1	0.9×10^{-7}
C14(VII) (1)	<i>srm15/srm15</i>	1	1.6×10^{-7}
F5(VII) (3)	<i>srm17/srm17</i>	1	2.9×10^{-7}

[13]. Используя специально сконструированные *srm*-мутантные и немутантные цис-гетерозиготы по маркерам VII хромосомы *ade6/+ cyh2/+ leu1/+*, следили за утратой гомолога, несущего нормальные аллели указанных генов. В этих опытах у линий *srm8/srm8* сравнительно с линиями *SRM+/SRM+* выявлено повышение частоты спонтанной утраты VII хромосомы примерно на два порядка (табл. 3) [15], а у линий *srm12/srm12* – на порядок (табл. 3). Полученные данные отчетливо подтверждают участие генов *SRM8* и *SRM12* в поддержании хромосом дрожжевыми клетками.

Влияние мутаций srm на митотическую стабильность рекомбинантных плазмид

Клетки специально сконструированных близкородственных *srm*-мутантных и немутантных урацилзависимых (*ura3*) гаплоидных штаммов-реципиентов типа спаривания α и α трансформировали ДНК кольцевых плазмид YCp50 (CEN4 ARS1) и YRp12 (ARS1). Поскольку нельзя полностью исключить наличие некоторых вариаций генотипического фона реципиентов и влияние этих вариаций на поддержание плазмид, получали трансформанты у двух штаммов (α и α типа спаривания), несущих определенную мутацию *srm*, и двух штаммов *SRM+* и сопоставляли данные о митотической стабильности, усредненные внутри каждой группы трансформантов (по 3-4 независимо полученных трансформанта для каждого штамма).

При размножении клеток в неселективных условиях достоверное снижение митотической стабильности плазмиды YCp50 у мутантных клеток сравнительно с трансформантами *SRM+* отмечено только для клонов *srm12* (табл. 4). У мутантов *srm12*, *srm15*, *srm17* сравнительно с клонами *SRM+* снижена митотическая стабильность бесцентромерной плазмиды YRp12. Мутация *srm8* не оказывает заметного влияния на митотическую стабильность YCp50 и YRp12.

Повреждение митохондриального генома не влияет на стабильность плазмид

Некоторые литературные данные указывают на связь между митотической стабильностью плазмид и функционированием митохондриального генома дрожжевых клеток [16, 17]. Поскольку изучаемые мутации *srm* оказывают влияние на поддержание митохондриального генома и нельзя исключить возможность влияния этих мутаций на его функционирование, мы сочли целесообразным параллельно с анализом поддержания плазмид в клетках *srm* оценить митотическую стабильность этих плазмид в дыхательно-недостаточных клетках *rho⁻* с заведомыми дефектами генома митохондрий и клетках *rho^o*, вообще утративших мтДНК.

Спонтанно возникшие цитоплазматические мутации *petite* в большинстве своем являются мутациями *rho⁻*, т. е. необратимыми дегенеративными перестройками митохондриального генома. В полученных группах трансформантов отбирали и анализировали спонтанно возникшие мутанты *petite*, несущие плазмиды. Как видно из табл. 4, необратимые повреждения митохондриального генома не сказывались сколько-нибудь значительно на митотической стабильности плазмид YCp50 и YRp12.

Таблица 4. Митотическая стабильность плазмид YCr50 (А) и YRp12 (В) у гаплоидных штаммов различных генотипов

А.					
Штамм	Генотип клонов	Количество клонов	Просмотрено колоний	Доля колоний, сохранивших плазмиду, %	
3D, 1B	<i>SRM⁺</i> <i>rho⁺</i>	3	916	35.6±7.0	
	<i>rho⁻</i>	6	1827	47.1±16.2	
	<i>rho^o</i>	13	4407	38.6±20.1	
<i>a, α srm8</i>	<i>srm8</i> <i>rho⁺</i>	4	1240	21.8±9.1	
	<i>rho⁻</i>	5	1414	43.5±19.0	
<i>a, α srm12</i>	<i>srm12</i> <i>rho⁻</i>	7	2586	20.7±3.6	
	<i>rho⁻</i>	4	359	20.1±7.0	
<i>a, α srm15</i>	<i>srm15</i> <i>rho⁺</i>	4	1202	24.5±8.0	
	<i>rho⁻</i>	4	854	18.4±7.0	
<i>a, α srm17</i>	<i>srm17</i> <i>rho⁺</i>	8	1944	28.7±5.6	

В.					
Штамм	Генотип клонов	Количество клонов	Просмотрено колоний	Доля колоний, сохранивших плазмиду, %	
3D, 1B	<i>SRM⁺</i> <i>rho⁺</i>	4	3393	35.9±7.2	
	<i>rho⁻</i>	6	2667	41.2±8.1	
	<i>rho^o</i>	8	1939	28.6±4.7	
<i>a, α srm8</i>	<i>srm8</i> <i>rho⁺</i>	6	1956	29.7±14.0	
	<i>rho⁻</i>	5	2103	50.3±7.4	
<i>a, α srm12</i>	<i>srm12</i> <i>rho⁺</i>	7	3390	7.1±5.8	
<i>a, α srm15</i>	<i>srm15</i> <i>rho⁺</i>	7	2024	10.5±2.6	
	<i>rho⁻</i>	3	957	6.5±2.7	
<i>a, α srm17</i>	<i>srm17</i> <i>rho⁺</i>	8	1938	16.8±2.5	

У исходных штаммов SRM⁺ (3D и 1B) были индуцированы бромистым этидием мутанты *rho^o* (см. «Материалы и методы») - по три независимых мутанта для каждого штамма. Эти клоны, лишённые митохондриального генома, трансформировали плазмидами YCr50 и YRp12. Для каждой линии отобрали по 3 независимо возникших трансформанта. Определение митотической стабильности плазмид у 13 независимых трансформантов, несущих YCr50, и 15 клонов, трансформированных YRp12 (табл. 4), не выявило существенного влияния элиминации митохондриальной ДНК на поддержание рекомбинантных плазмид клетками SRM⁺.

Влияние мутаций *srm* на чувствительность к летальному действию γ -излучения

Для оценки этого влияния использовали упоминавшиеся ранее диплоидные штаммы, цис-гетерозиготные по маркерам VII хромосомы. Типичные кривые выживания для штаммов C3x711, C3(VII)(3), C9(VII)(1), C14-3, F5(3), с генотипом *SRM*⁺/*SRM*⁺, *srm8/srm8*, *srm12/srm12*, *srm15/srm15*, *srm17/srm17*, приведенные на рис. 3, показывают, что мутанты *srm8*, *srm12* и *srm17* более чувствительны к летальному действию γ -излучения, чем немутантный штамм. Мутация *srm15* не обнаруживает заметного влияния на радиочувствительность клеток.

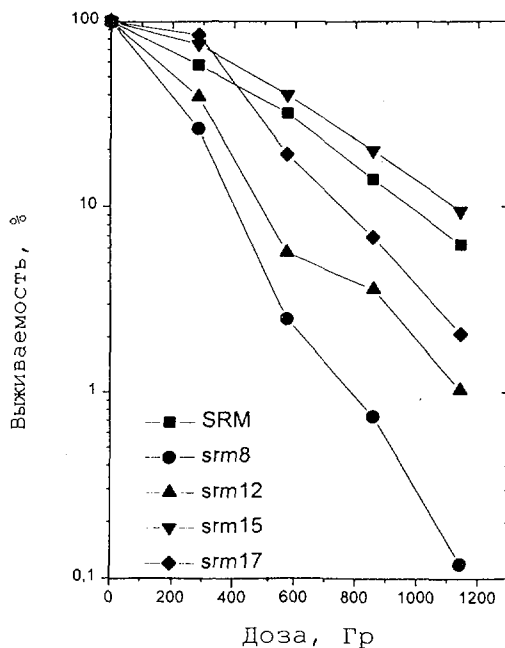


Рис. 3. Типичные кривые выживания для диплоидных штаммов различного генотипа: *srm8/SRM*⁺ [C3x711(1)], *srm8/srm8* [C3(VII)(3)], *srm12/srm12* [C9(VII)(1)], *srm15/srm15* [C14-3], *srm17/srm17* [F5(3)]

Картирование мутации *srm8*

Анализ скрещиваний мутантов *srm8* с дисомиками по хромосомам II, III, IV, VII, VIII, X, XIV показал, что мутация *srm8* локализуется в X хромосоме. Далее анализировали скрещивания мутантов *srm8* с близкородственными им штаммами-анализаторами, несущими генетические маркеры X хромосомы *arg3* и *ura2*. Источниками этих маркеров служили, соответственно, штаммы STX-9-1A (*MAT α arg3 ade2 gal2*), любезно предоставленный проф. У. Винтерсбергер (Венский университет, Австрия) и S1780C (*MAT α ura2 his6 arg4 thr1 met1 gal2*),

полученный из Центра генетических культур дрожжей в Беркли, США. Штаммы-анализаторы получали с помощью не менее 4 последовательных бэкроссов потомков штаммов-источников с линиями 71а и 71α, изогенными друг другу. Результаты тетрадного анализа, приведенные в табл. 5, показывают, что мутация *srm8* находится на расстоянии около 10 сМ от локуса *arg3* по направлению к центромере. В этом же районе хромосомы X картирован ген *SCP160* [18]. Однако плазида с клонированным геном *SCP160*, предоставленная проф. Винтерсбергер, не комплементировала мутацию *srm8*. Очевидно, гены *SCP160* и *SRM8* не аллельны.

Таблица 5. Генетическое картирование мутации *srm8*

Пара маркеров	Проанализировано тетрад	Количество тетрад типа			Генетическое расстояние, сМ
		P	N	T	
<i>ura2-arg3</i>	93	28	0	65	35.0
<i>ura2-srm8</i>	124	33	6	85	48.8
<i>arg3-srm8</i>	209	163	0	46	10.6

Клонирование и идентификация нуклеотидной последовательности гена SRM8

Для клонирования гена *SRM8* воспользовались частичной температурочувствительностью клеток *srm8*. Штамм СЗ (МАТа *srm8 leu2*) трансформировали ДНК геномной библиотеки дрожжей (см. «Материалы и методы»). Клетки, обработанные трансформирующей ДНК, высевали на селективную среду ММ, не содержащую лейцин, и 2 суток подращивали при 30°C, а затем инкубировали при 37°C. Через 4 суток отобрали 127 крупных

Таблица 6. Митотическая стабильность плазмид с *ori*-последовательностью 2μ ДНК

Плазида						
УЕр13			2J-1			
Штамм	Количество клонов	Просмотрено колоний	Доля колоний, содержащих плазмиду, %	Количество клонов	Просмотрено колоний	Доля колоний, содержащих плазмиду, %
SRM+	5	796	58.0±8.1	4	648	10.6±00.0
СЗ	4	970	23.0±5.3	1	243	77.8
СЗ (ретрансформанты)	-	-	-	5	890	82.0±16.1

колоний и субклонировали их на селективной среде. Поскольку мутация *srm8* обуславливает характерную удлиненную форму клеток реципиента СЗ, среди температурорезистентных клонов отбирали варианты с круглыми клетками. Один из таких клонов, обозначенный СЗ-2J-1, был подвергнут дальнейшему анализу. Из культуры клеток СЗ-2J-1 выделили ДНК плазмиду размером около 9 т.п.н., обозначенную 2J-1. Соответственно клонированный фрагмент ДНК должен иметь размер около 3,5 т.п.н.

Плазмидой 2J-1 ретрансформировали клетки штамма СЗ. Митотическая стабильность плазмиды 2J-1 у клеток первичного трансформанта и ретрансформантов (табл. 6) составляет примерно 80%, т. е. достаточно высока. Мы не имели возможности сопоставить митотическую стабильность 2J-1 и исходного вектора YEp351, поскольку не располагаем последним. Однако сходный структурно с YEp351 вектор YEp13, имевшийся в нашем распоряжении, характеризуется относительно высокой митотической стабильностью в клетках *SRM+* и существенно менее стабилен в клетках *srm8*. Можно предполагать наличие в составе плазмиды 2J-1 клонированной последовательности гена *SRM8*.

Отметим здесь, что мутация *srm8* сопровождается снижением митотической стабильности плазмиды YEp13 (*ori* 2ц ДНК), хотя, как отмечено выше, эта мутация не оказывает влияния на стабильность плазмид YCp50 (*ARS1 CEN4*) и YRp12 (*ARS1*). Низкой оказалась также митотическая стабильность плазмиды

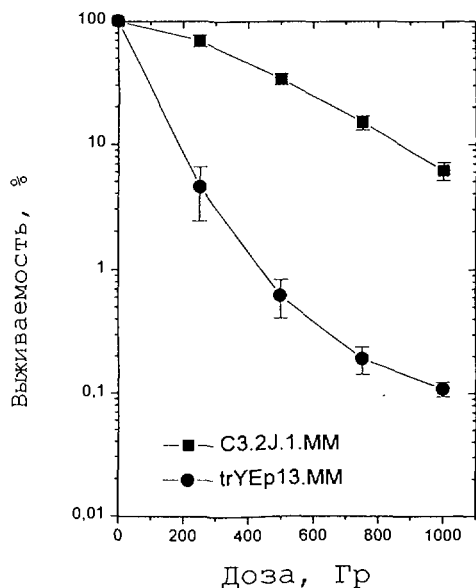


Рис. 4. Кривые выживания трансформантов диплоидного штамма *srm8/srm8*, несущих плазмиду 2J-1 или YEp13. Облученные культуры рассеивали на селективную среду *MM-leu*. Каждая кривая соответствует усредненным данным для 4 независимо полученных трансформантов

2J-1 у трансформантов *SRM8*. Природа этого дестабилизирующего эффекта нуждается в дополнительном исследовании. Возможно, он вызван присутствием в клетках множественных копий последовательности *SRM8*.

Оказалось также (рис. 4), что трансформанты *srm8/srm8*, получившие плазмиду 2J-1, менее радиочувствительны, чем трансформанты того же реципиента, несущие плазмиду YEp13, сходную с YEp351, исходным вектором для 2J-1.

Таким образом, присутствие в *srm8*-мутантных клетках плазмиды 2J-1 сопровождается устранением морфологических изменений клеток и восстановлением их нормальной радиорезистентности. Кроме того, фрагмент ДНК, клонированный в 2J-1, по-видимому, обеспечивает относительно высокую (сравнительно с YEp13) митотическую стабильность этой плазмиды в *srm8*-мутантных клетках. Перечисленные свойства 2J-1 позволяют констатировать функциональную комплементацию мутации *srm8* фрагментом ДНК, клонированным в этой плазмиде.

Для определения нуклеотидной последовательности фрагмента ДНК, комплементирующего мутацию *srm8*, этот фрагмент переклонировали в фагмиде pTZ19U, которую переводили в одонитевую форму с использованием фага-помощника M13K07. Выделение одонитовой ДНК и определение нуклеотидной последовательности по методу Сэнгера производили согласно стандартным протоколам [5].

Нуклеотидные последовательности длиной 760 п. н. с обоих концов клонированного фрагмента приведены на рис. 5. При анализе нуклеотидной последовательности с использованием баз данных SGB (BLAST) на клонированном фрагменте выявлены фрагменты двух рамок считывания, локализованных (как и следовало ожидать на основании генетического картирования) на хромосоме X. Одна из этих рамок, YJL076w, имеет длину 3566 п.н., другая, YJL077c, - 392 п.н. YJL076w и YJL077c транскрибируются в противоположных направлениях (рис. 5). Таким образом, анализируемый клонированный фрагмент ДНК содержит 80% последовательности YJL076w и только 38% последовательности YJL077c.

С помощью ПЦР Н.Н. Карташева на основе данных банка нуклеотидных последовательностей *S. c.* достроила описанный нами клонированный фрагмент рамки YJL076w до ее полноразмерной величины и затем использовала полученную конструкцию для разрушения соответствующего хромосомного гена. Предоставленный нам нулевой мутант по рамке YJL076w фенотипически не отличался от мутантов *srm8* и оказался аллелен этим мутантам: скрещиваясь с ними, он давал диплоиды, характеризовавшиеся, как и диплоиды *srm8 srm8*, существенно сниженной скоростью размножения, специфическими морфологическими изменениями клеток, утратой способности спорулироваться. Таким образом, гену *SRM8* соответствует открытая рамка считывания YJL076w.

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе описаны свойства ядерных генных мутаций *srm*, изолированных благодаря их способности вызывать координированные

a)
>forward DNA fragment Saccharomyces cerevisiae
 AGCTCGGTACCGGGGCTGTCATTTTAACTTTTCTGANATACCTGTTGCTTTGGAGTCTTCTTTTCCTTC
 GANTTATTTTTATCGTTAGCATCCTGTATATGGCAGATGCTTTTTCTGGTTCCTGGACCCCTCGCTTTCTGT
 TCAAGTCTTACCCTCCTATGTTTGGCCTTTCAAATCTGCAACCCCTAGAAGTGTGTTCTTCTGCTGCCTATCAAT
 CTGGCAAACTCATTTCTGGCCTTCGTTTAAACATTTTACGATTTCTTCTTCAATGAAAGANGTANTTCTTTA
 GTAGCAACAGAAAGAGCCCAACCAACAGGAAAAGACGATGCTTGTGTGCTGGCTTAGTTTCCACCTTTGTAG
 CTTCAATTTGGCTTCTGTTTGAATTCGGATAAAAGCTTTTCGCCAATTGTTCACTTATTTGCTAATTTGTTACTGA
 AGATTCACCTCAGGCTGACTTTTTTGGACTATCTTTTTCGTTTCTTCTCATCACTTCTTATTGATTATC
 TTTGANCTTTTCACTGGAACAACACTGCCTTCAAGAATGTAAAGAAATGCTTTGGGCCATTATTANGCAGCG
 ACATATTTTCTTTTAAAAATCATCGTCTGATGAAAAATCTGTTTCAATCCCACTCTCTGACTCATCCGCTGFGG
 GACGCTGCCGAACTAANAATCTTCAGTACTTTTCTGTTGGGANTTCNTTTTCTTGGGACCTGCCAATAATTGGG
 CAGCC

back DNA fragment Saccharomyces cerevisiae
 GAGCTCTAATACGACTCACTATAGGGNAAAGCTTGCATGCCTGCAGTTCGACTCTAGAGTGAAGAGTCAGAAATGAT
 ATAAGCCATTTGATATGTACGTGTACGTATTTCGAAAAAAGATTTGTTTCTCGTAGGGAGCGATATGTGCAATAT
 GTTACCCGTTCCACATGTTTTTGAACITTTTTTCTTTTTCATGGTAAGCGTCAATTAATCAATTTGAATAACTAGTGA
 AGAGTAGCTAGCACGATGAAATAAGTGGCGGAGCTGATCGAATCCCTAGTCTCGGTTCCGCTGAAACAGAGAGAAG
 TCGATTACTGTACACCGTGCCTCCTTCTATGTACAAGCTACAAGTGGCTTTGGTGCCTCCGAGTCTTCAGGCGAGC
 ATGCCAATACAGTTTGGCTACGGACCAACCATCGCCGAATCTTCTCAATTTGTGCCAAACAGAACTAATATGGCGC
 AAAGCCCGGAGATGCTCCTTTGCGATGCTAATCTGAGATCTGCCAATGTGAGTTTACGCCAAGCTATTTCAA
 CCAGTCTAGTTTTAGGAAGTTTTCTTTGTTTACCAAGCCGACAAACACGCTGTGAACCTGANTGATGAAATCATC
 GATAAGTGTGAAAAAATGTCCCGAGTTTGCAGAAGACTTGAATTTGAGTTTGAAGATAACAGCGGGTTGTG
 ANCTGTATHCCGGATTTTTTTGGGTAAAAGGACGTTTTTCCATGTFAATTAATATCGTTAAGAAATTAATTTGAAGA
 ATGAA

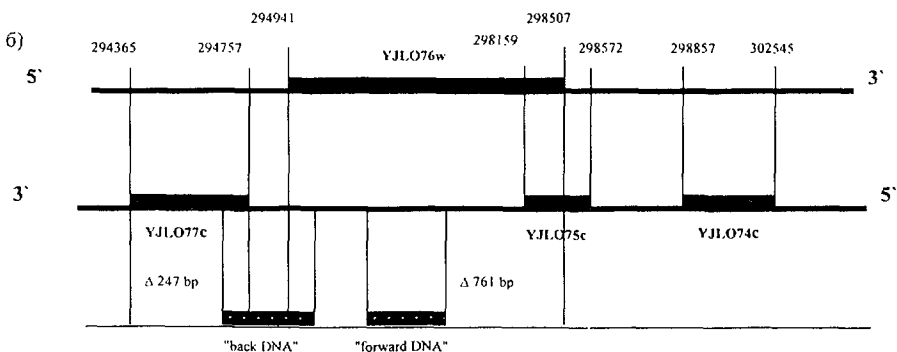


Рис. 5. Локализация клонированного фрагмента с геном *SRM8* на X хромосоме *S. cerevisiae*. а) Последовательности 760 нуклеотидов, прочитанные с обоих концов клонированного фрагмента («forward DNA» и «back DNA»). б) Открытые рамки считывания в области локализации клонированного фрагмента - YJLO77c (392 bp), YJLO76w (3566 bp), YJLO75c (420 bp), YJLO74c (3688 bp)

изменения митотической стабильности различных наследственных структур дрожжей [4].

Проведенный анализ выявил ряд различий, относящихся к фенотипическим эффектам изученных мутаций *srm8*, *srm12*, *srm15*, *srm17*. Наряду с этим обнаружено заметное сходство в проявлении мутаций *srm8*, *srm12* и ранее изученной *srm5* (*cdc28-srm*). Каждая из этих мутаций, не только сопровождается снижением частоты спонтанных *rho*⁻мутаций и падением митотической стабильности природных и/или рекомбинантных ядерных генетических структур, но также вызывает морфологические изменения клеток, снижение скорости их размножения и повышение их чувствительности к летальному действию γ -излучения.

Отметим, что координированные изменения митотической стабильности ядерных и митохондриальных наследственных структур, вызываемые мутацией *srm15*, а также ранее изученной мутацией *srm1* [3, 4, 19] не сопровождаются повышением радиочувствительности клеток. Не исключено, что другие мутантные аллели соответствующих двух генов способны изменять также и радиочувствительность, однако более вероятным представляется предположение об иерархичности генетического контроля поддержания наследственных структур в дрожжевой клетке. В соответствии с этим предположением гены *SRM5*, *SRM8* и *SRM12* находятся на более высоких ступенях иерархической лестницы сравнительно с генами *SRM1* и *SRM15*. Соответственно, у мутаций первых трех генов по сравнению с остальными мутациями *srm* плейотропное действие выражено шире.

Митохондриальный геном дрожжей представляет собой относительно крупную многокопийную внеядерную кольцевую плазмиду, содержащую 8 канонических участков начала репликации [20]. Возникновение цитоплазматических мутантов *petite* [*rho*⁻], у которых одни части митохондриального генома утрачены, тогда как другие амплифицированы, по-видимому, связано с репликативными преимуществами дефектных молекул мтДНК, содержащих, сравнительно с нормальными молекулами, большее количество сайтов начала репликации [21].

На процесс спонтанного возникновения мутаций *rho*⁻ оказывают модулирующее действие мутации весьма многочисленных ядерных генов. В основном такая модуляция направлена в одну сторону: а именно в сторону повышения спонтанной *rho*⁻мутабельности, и, возможно, имеет определенное приспособительное значение. Нами были идентифицированы генотипические факторы, вызывающие модуляцию *rho*⁻мутабельности в противоположном направлении, а именно в сторону снижения.

Помимо мутаций *srm*, таким фактором является дисомия $n+1$ по различным хромосомам [22, 23]. Как показывают результаты настоящей работы и данные, опубликованные ранее [3, 4], мутации *srm* способны вызывать не только снижение спонтанной *rho*⁻мутабельности (т. е., по-видимому, снижение относительной эффективности репликации амплифицирующихся фрагментов мтДНК), но и параллельное снижение митотической стабильности парных природных хромосом у дисомиков, а также различных рекомбинантных

генетических структур, т. е., вероятно, снижение эффективности репликации этих ядерных структур. Таким образом, продукты некоторых генов *SRM* (в частности, *SRM5*, *SRM8*, *SRM12*), возможно участвуют в определении эффективности репликации ядерных и митохондриальных наследственных структур.

Имеются немногочисленные литературные данные, показывающие, что поддержание рекомбинантных плазмид в дрожжевой клетке зависит от функционирования ее митохондриального генома. Митотическая стабильность плазмиды Rcp-CEN3 (ARS рДНК, *CEN3*) оказалась заметно выше у мутантов *rho*⁻, полученных после обработки бромистым этидием, чем у дыхательно-компетентных клеток исходного штамма [16]. В другой работе [17] обнаружено еще более сильное стабилизирующее влияние *rho*^o- и *rho*⁻-мутаций на поддержание в клетках *S. cerevisiae* плазмиды, выделенной из клеток *Zygosaccharomyces rouxii* и содержащей две ARS-последовательности. Эта стабилизация плазмид не связана непосредственно с нарушением дыхания, поскольку она не наблюдается у ядерных *pet*-мутантов, которые имеют дыхательно-недостаточный фенотип, но сохраняют интактный митохондриальный геном. Продемонстрирована невозможность совместного поддержания в клетках *S. cerevisiae* мтДНК и плазмиды-киллера из *Kluveromyces lactis* [24]. Сходная ситуация может иметь место и для плазмиды из *Z. rouxii*. С другой стороны, мутации дыхательной недостаточности могут усиливать экспрессию ядерных генов [25-27], в том числе, возможно, и генов, участвующих в поддержании этой плазмиды.

В наших опытах, однако, ни элиминация митохондриального генома, ни возникновение мутаций *rho*⁻ не сказывались на митотической стабильности плазмид YCr50 и YRp12. Таким образом, нарушение структуры мтДНК и, как следствие, нарушение дыхания не влияли на эффективность поддержания изученных нами рекомбинантных структур в клетках дрожжей - сахаромисетов.

В последнее время интенсивно изучается взаимосвязь регуляции клеточного цикла, репликации и репарации ДНК. Показано, что недорепликация или повреждения ДНК, индуцированные внешними агентами, в частности, ионизирующей радиацией, вызывают замедление или остановку клеточного цикла. В этом контроле с отрицательной обратной связью, получившем название «точка проверки повреждений ДНК (*DNA damage checkpoint*)», участвуют как гены, опосредующие механизмы репарации ДНК и определяющие радиочувствительность клеток, так и гены, регулирующие прохождение клеточного цикла. Нарушение *checkpoint*-контроля приводит к повышению радиочувствительности клеток и снижению точности митотической трансмиссии наследственных структур [28, 29], т. е. именно к тем фенотипическим особенностям, которые характерны для изученных нами мутантов *srn5*, *srn8*, *srn12*. Получены данные, указывающие на участие центрального гена клеточного цикла *CDC28* (*SRM5*) в *checkpoint*-контроле [30]. Ген *SRM8* идентичен гену *CFII/NET1*, который также опосредует прохождение клеточного цикла, являясь негативным регулятором выхода из митоза [31, 32]. Клетки с разрушенным геном *NET1* жизнеспособны, но имеют аномально вытянутую форму, часто образуют цепочки и размножаются медленно как на сбраживаемом, так и на

несбраживаемом субстрате, подобно описанным нами клеткам *srm8*. Кроме того, у клеток *net1* обнаружены изменения регуляции клеточного цикла и митохондриальные аномалии, однако существенных изменений митотической стабильности мини-хромосом, спонтанной мутабельности ядерных генов или УФ-чувствительности у них не выявлено [31, 33, 34]. Данные, публикуемые в настоящей работе, содержат, таким образом, дополнительные сведения о фенотипическом проявлении мутаций гена *SRM8 NET1*.

Мутанты, резистентные к митохондриальному мутагену бромистому этидию [35], описаны у дрожжей *Kluyveromyces lactis* [36] и у *S. cerevisiae* [37-39]. У *K. lactis* мутант по гену *PMA1*, кодирующему H⁺-АТФазу плазматической мембраны, проявлял резистентность к EthBr и дефектность по транспорту ионов K⁺ [40]. Вообще, для значительной доли (10-20%) EthBr-резистентных мутантов у *K. lactis* имеет место дефектность по транспорту EthBr и одновременно по транспорту одновалентных катионов, особенно ионов K⁺. Транспорт в клетку молекул EtBr и катиона K⁺ зависит от мембранного потенциала и, по-видимому, осуществляется с участием одних и тех же носителей [41-43]. У мутанта с разрушенным геном NET1 имеют место изменения формы клеток и снижение митохондриального потенциала [34]. Можно предположить, что резистентность мутанта *srm8* к EthBr связана с пониженной проницаемостью клеток и /или митохондрий для красителя.

В следующей работе будут представлены данные, характеризующие участие генов *SRM5*, *SRM8* и *SRM12* в *checkpoint*-регуляции у дрожжей.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Просви́рова Т.Ю., Девин А.Б.* Генетический анализ митохондриальной *rho*-мутабельности у дрожжей сахаромикетов. Сообщение V. Выделение и картирование ядерной мутации *srm5*, снижающей одновременно *rho*-мутабельность и митотическую стабильность хромосом// Генетика. 1988. Т. 24. № 9. С. 1586-1592.
2. *Devin A.B., Prosvirova T.Yu., Peshekhonov V.T. et al.* The start gene CDC28 and the genetic stability of yeast// Yeast. 1990. V. 6. № 3. P. 231-243.
3. *Koltovaya N.A., Arman I.P., Devin A.B.* Mutation of the CDC28 gene and the radiation sensitivity of *Saccharomyces cerevisiae*// Yeast. 1998. V. 14. № 2. P. 133-146.
4. *Девин А.Б., Колтовая Н.А., Гаврилов Б.В., Арман И.П.* Получение и характеристика новых ядерных генных мутаций *srm*, вызывающих координированные изменения поддержания ядерных и митохондриальных генетических структур у дрожжей-сахаромикетов// Генетика. 1994. Т. 30. № 9. С. 1194-1201.
5. *Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis J.* Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, NY. 1989.
6. *Engelbrecht J., Hirsch J., Roeder G.S.* Meiotic gene conversion and crossing over: their relationship to each other and to chromosome synapsis and segregation// Cell. 1990. V. 62. № 5. P. 927-937.
7. *Hill J.H., Myers A.M., Koerner T.J., Tzagoloff A.* Yeast/E.coli shuttle vectors with multiple unique restriction sites// Yeast. 1986. V. 2. № 3. P. 163-167.
8. *Rose M.D., Novick P., Thomas J.H., Botstein D., Fink G.R.* A *Saccharomyces cerevisiae* genomic plasmid bank based on a centromere containing shuttle vector// Gene. 1987. V. 60. № 283. P. 237-243.
9. *Broach J.R., Strathern J.N., Hicks J.B.* Transformation in yeast: development of a hybrid cloning vector and isolation of the CAN1 gene// Gene. 1979. V. 8. № 1. P. 121-133.
10. *Scherer S., Davis R.W.* Replacement of chromosome segments with altered DNA segments constructed in vitro// Proc.Natl.Acad.Sci. USA. 1979. V. 76. № 10. P. 4951-4955.
11. *Sherman F., Fink G.R., Hicks J.B.* Laboratory Course Manual for Methods in Yeast Genetics//Cold Spring Harbor Laboratory. NY. 1986.
12. *Ito H., Fukuda Y., Murata K., Kimura A.* Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations// J. Bacteriol. 1983. V.153. № 1. P.163-168.
13. *Parry J.M., Zimmermann F.K.* The detection of monosomic colonies produced by mitotic chromosome non-disjunction in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*// Mutat. Res. 1976. V. 36. № 1. P. 49-66.
14. *Clark-Walker G.D.* Isolation of circular DNA from a mitochondrial fraction from yeast// Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1972. V. 69. № 2. P. 388-392.
15. *Арман И.П., Глазкова Д.В., Девин А.Б. и др.* Генетика дрожжей в ИМГ РАН (1958-1998). Некоторые итоги и перспективы// Мол. Биол. 1999. Т. 33, № 1. С. 48-54.

16. Ларионов В.Л., Курпина Н.Ю., Трауготт М.Н. Исследование внехромосомной ДНК у дрожжей-сахаромицетов// Мол. Биол. 1983. Т. 17. № 5. С. 983-991.
17. Kenji I., Hiroyuki A., Yasuji O. Mutations in a *Saccharomyces cerevisiae* host showing increased holding stability of the heterologous plasmid pSR1// Mol. Gen. Genet. 1991. V. 225. P. 257-265.
18. Wintersberger U., Kuhne Ch., Rarwan A. Scp160p, a new yeast protein associated with the nuclear membrane and the endoplasmic reticulum, is necessary for maintenance of exact ploidy// Yeast. 1995. V. 11. № 10. P. 929-944.
19. Devin A.B., Koltovaya N.A. Nuclear mutants of yeast with reduced spontaneous mutability of the mitochondrial genome// Mutation Res. 1981. V. 91. № 6. P. 451-455.
20. de Zamaroczy M., Faugeron-Fonty G., Baldacci G., Goursot R., Bernardi G. The *ori* sequences of the mitochondrial genome of a wild-type yeast strain: number, location, orientation and structure// Gene. 1984. V. 32. № 3. P. 439-457.
21. Rayko E., Goursot R. Amphimeric mitochondrial genomes of petite mutants of yeast. I. Flip-flop amphimers make up the mitochondrial genomes of "palindromic" petite mutants of yeast// Curr. Genet. 1996. V. 30. № 2. P. 126-134.
22. Devin A.B., Koltovaya N.A., Cheryomukhina N.I. The disomy for chromosome IV and the spontaneous *rho*⁻ mutability in *Saccharomyces cerevisiae*// Current Genet. 1987. V. 11. P. 407-410.
23. Смирнова М.Е., Арман И.П., Девин А.Б. Анализ поддержания избыточных генетических структур у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*: дисомия и спонтанная митохондриальная *rho*⁻ мутабельность// Генетика. 1994. Т. 30. № 9. С. 1184-1193.
24. Gunge N., Yamane C. Incompatibility of linear DNA killer plasmids pGKL1 and pGKL2 from *Kluyveromyces lactis* with mitochondrial DNA from *Saccharomyces cerevisiae*// J. Bacteriol. 1984. V. 159. № 2. P. 533-539.
25. Parikh V.S., Morgan M.M., Scott R., Clements L.S., Butow R.A. The mitochondrial genotype can influence nuclear gene expression in yeast// Science. 1987. V. 235. № 4788. P. 576-580.
26. Kaisho Y., Yoshimura K., Nakahama K. Increase in gene expression by respiratory-deficient mutation// Yeast. 1989. V. 5. № 2. P. 91-98.
27. Puglisi P.P., Algeri A. Role of the mitochondrion in the regulation of protein synthesis in the eucaryote *Saccharomyces cerevisiae*// Mol. Gen. Genet. 1971. V. 110. № 2. P. 110-117.
28. Weinert T.A., Hartwell L.H. Characterization of RAD9 of *Saccharomyces cerevisiae* and evidence that its function acts posttranslationally in cell cycle arrest after DNA damage// Mol. Cell Biol. 1990. V. 10. № 12. P. 6554-6564.
29. Weinert T.A., Hartwell L. The RAD9 gene controls the cell cycle response to DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*// Science. 1988. V. 241. № 4863. P. 317-322.
30. Li X., Cai M. Inactivation of the cyclin-dependent kinase Cdc28 abrogates cell cycle arrest induced by DNA damage and disassembly of mitotic spindles in *Saccharomyces cerevisiae*// Mol. Cell Biol. 1997. V. 17. № 5. P. 2723-2734.
31. Visintin R., Hwang E.S., Amon J.P. *Cfil* prevent premature exit from mitosis by

- anchoring *Cdc14* phosphatase in the nucleolus// *Nature*. 1999. V. 398. № 6730. P. 818-823.
32. *Shou W., Seol J.H., Shevchenko A. et al.* Exit from mitosis is triggered by Tem1-dependent release of the protein phosphatase Cdc14 from nuclear RENT complex// *Cell*. 1999. V. 97. № 2. P. 233-244.
33. *Straight A.F., Shou W., Dowd G.J. et al.* Net1, a Sir2-associated nucleolar protein required for rDNA silencing and nucleolar integrity// *Cell*. 1999. V. 97. № 2. P. 245-256.
34. *Entian K.D., et al.* Functional analysis of 150 deletion mutants in *Saccharomyces cerevisiae* by a systematic approach// *Mol. Gen. Genet.* 1999. V. 262. № 4/5. P. 683-702.
35. *Slonimski P., Perrodin G., Croft J.* Ethidium bromide induced mutation of yeast mitochondria: complete transformation of cells into respiratory deficient non-chromosomal "petites"// *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1968. V. 30. № 3. P. 232-239.
36. *Brunner A., Mas J., Celis E., Matton J.R.* Cytoplasmic and nuclear inheritance of resistance to alkylguanidines and ethidium bromide in a petite-negative yeast// *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1973. V. 53. № 2. P. 638-644.
37. *Bech-Hansen N.T., Rank G.H.* Ethidium bromide resistance and petite induction in *Saccharomyces cerevisiae*// *Can. J. Genet. Cytol.* 1972. V. 14. № 3. P. 681-689.
38. *Bech-Hansen N.T., Rank G.H.* Cytoplasmically inherited ethidium bromide resistance in suppressive petites of *Saccharomyces cerevisiae*// *Can. J. Genet. Cytol.* 1973. V. 15. № 3. P. 381-387.
39. *Gouhier M., Mounolou J.C.* Yeast mutants resistant to ethidium bromide// *Mol. Gen. Genet.* 1973. V. 122. № 2. P. 149-164.
40. *Miranda M., Ramirez J., Pena A., Coria R.* Molecular cloning of the plasma membrane H⁺-ATPase from *Kluyveromyces lactis*: a single nucleotide substitution in the gene confers ethidium bromide resistance and deficiency in K⁺ uptake// *J. Bacteriol.* 1999. V. 177. № 9. P. 2360-2367.
41. *Brunner A., Carrasco N., Pena A.* Correlation between resistance to ethidium bromide and changes in monovalent cation uptake in yeast// *Arch. Biochem. Biophys.* 1982. V. 217. № 1. P. 30-36.
42. *Pena A., Ramirez G.* Interaction of ethidium bromide with the transport system for monovalent cations in yeast// *J. Membr. Biol.* 1975. V. 22. № 3-4. P. 369-384.
43. *Pena A., Ramirez J.* An energy-dependent efflux system for potassium ions in yeast// *Biochim. Biophys. Acta.* 1991. V. 1068. № 2. P. 237-244.

Рукопись поступила в издательский отдел
10 ноября 2000 года.