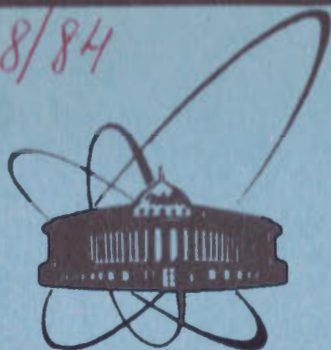


2828/84



Объединенный
институт
ядерных
исследований
Дубна

P19-84-171

В.Л.Ильина, В.И.Корогодин, Ч.Файси

ВЛИЯНИЕ СОДЕРЖАНИЯ АДЕНИНА
В ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЕ
НА ЧАСТОТУ ВОЗНИКНОВЕНИЯ РЕВЕРСОВ
У ГАПЛОИДНЫХ ДРОЖЖЕЙ

Направлено в журнал "Генетика"

1984

При определении у микроорганизмов частоты ревертирования обычно используют методику лимитированных сред: клетки, ауксотрофные по тому или иному метаболиту, высевают на твердую питательную среду, содержащую этот метаболит в низкой концентрации; по соотношению числа вырастающих ауксотрофных колоний, не имеющих и имеющих вторичные прототрофные колонии/"бородавки"/, судят о частоте возникновения реверсов^{/1/}. При этом неявно допускают, что концентрация метаболита, лимитирующего рост культуры, не влияет на частоту ревертирования. Но так ли это? Судя по результатам опытов с бактериями, частота мутирования генов может зависеть от условий культивирования, в частности, от соотношения разных компонентов среды^{/2-4/}. Так, в условиях "тиминового голодания" у бактерий наблюдается резкое повышение частоты мутирования большого числа генов^{/5/}. В нашей работе приводятся данные, показывающие, что у дрожжей уменьшение содержания в среде аденина сопровождается существенным увеличением частоты ревертирования.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

В работе использовали гаплоидные штаммы дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* /петергофская линия/, любезно предоставленные проф. И.А. Захаровым^{/6/}: Р-192 (а *ade2-192*), ЗПГ-153 (а *ade-192 rad54*), 8ПГ-59 (а *ade2-192 rad2*), X-1 (а *ade2-192, rad2 rad54*). Дрожжи этих штаммов различаются по частотам спонтанного ревертирования. Ауксотрофные по аденину дрожжи, как известно, образуют колонии красного цвета, не растут в среде без аденина; реверсы формируют белые или бледно-розовые колонии и могут расти в отсутствие аденина. При выращивании на лимитированной среде /с низким содержанием аденина/ ауксотрофные клетки образуют мелкие красные колонии, на поверхности которых вырастают вторичные крупные белые колонии реверсов* - "бородавки".

Использовали среды, а также методы культивирования, описанные в^{/6/}. Культуры дрожжей вели на полной питательной среде, а при проведении опытов дрожжи рассеивали в чашки Петри на

* Фенотипические реверсы, регистрировавшиеся в наших опытах, представляли собой смешанную группу: они могли возникать как за счет "обратных" мутаций в гене *ade2*, так и в результате прямых мутаций в генах-супрессорах.

агаризованные минимальные среды, содержащие 10; 1,0 или 0,1 мг/л аденина. Густота посева - 100-200 клеток на чашку. В каждом варианте опытов использовали по 10-20 чашек Петри. Опыты ставили в нескольких повторностях.

Спустя 7, 10, 14 или 17 суток инкубации при 30°C определяли число вырастающих в чашках Петри колоний N и среднее содержание в колониях ауксотрофных клеток n ; чтобы найти значение n , 10-20 случайно выбранных колоний, не содержащих бородавок, суспендировали в определенном объеме воды и с помощью камеры Горяева подсчитывали концентрацию клеток.

В эти же сроки оценивали число не содержащих реверсов колоний. По стандартной методике число таких колоний N_0 определяют на 14-17-е сутки инкубации, относя к этому классу первичные колонии, не имеющие бородавок. Однако это еще не означает, что в колониях класса N_0 не содержится клеток-реверсов: такие клетки могут просто не успеть сформировать бородавки к моменту наблюдения, особенно при не очень низких концентрациях в среде лимитирующего фактора. Чтобы уменьшить эту погрешность, несколько десятков колоний из класса N_0 наносили /каждую в отдельности/ в виде мазков на поверхность агаризованной минимальной среды, не содержащей аденина; если какая-либо из этих колоний содержала клетки-реверсы, в области мазка в течение трех-четырех суток выростали одна или несколько крупных белых колоний. К классу N'_0 мы относили только те первичные колонии, у которых наличие реверсов не удавалось обнаружить даже этим методом; очевидно, что уточненное значение $N'_0 = qN_0$, где q - доля колоний из класса N_0 , не содержащих "скрытых" реверсов.

Частоту возникновения реверсов F в расчете на одну клетку определяли по стандартной формуле $F = \frac{1}{n} \ln \frac{N}{N_0}$ /или $F' = \frac{1}{n} \ln \frac{N}{N'_0}$ /. Для стационарной фазы роста культуры среднюю частоту ревертирования F_t на клетку на единицу времени рассчитывали по формуле: $F'_t = \frac{1}{n} \frac{m_2 - m_1}{t}$, где t - продолжительность интервала времени /в ч./, а m_1 и m_2 - средние значения мутаций на колонию в начале и в конце этого интервала времени ($m = \ln \frac{N}{N'_0}$).

РЕЗУЛЬТАТЫ

В предварительных опытах было обнаружено, что дрожжи разных использованных штаммов на средах с одинаковым содержанием аденина образуют колонии разных размеров. При подборе таких концентраций аденина в среде, которые обеспечивали бы одинаковые размеры колоний дрожжей разных штаммов, было замечено, что частоты ревертирования F , определявшиеся по стандартной методике, у каждого из этих штаммов тем выше, чем меньше содержится в среде аденина /табл.1/.

Частота ревертирования F у дрожжей разных штаммов. Учет проводился после 17 суток инкубации на средах с разным содержанием аденина /стандартная методика; 10^{-8} на клетку/

Штаммы	Содержание аденина, мг/л		
	10	1,0	0,1
P-192	0,1	2,4	-
ЗПГ-153	-	3,0	92,0
8ПГ-59	-	42,0	1300,0
X-1	9,7	120,0	-

Для последующих опытов был избран штамм 8ПГ-59, мало отличающийся по фенотипу колоний от штамма P-192, но имеющий более высокую мутабельность. Клетки этого штамма рассеивали на среды, содержащие 10; 1,0 и 0,1 мг/л аденина, и спустя 7, 10 и 14 суток инкубации определяли характеристики ревертирования. Результаты одного из таких опытов приведены в табл.2.

Опыты показали, что уже на 7-е сутки инкубации, когда колонии ревертантов еще не видны невооруженным глазом, значительная доля первичных колоний содержит скрытые реверсы. С течением времени, по мере увеличения числа колоний с бородавками, относительное количество колоний со скрытыми реверсами также увеличивается. Поэтому частоты ревертирования F , определяемые по стандартной методике, оказываются заниженными по сравнению с частотами ревертирования F' , определяемыми по модифицированной методике; это особенно ярко выражено на 7-е и 10-е сутки инкубации. Абсолютные значения F' возрастают как с увеличением времени инкубации, так и с уменьшением содержания аденина в среде, так что максимальные различия в частотах ревертирования могут превышать $10^{3/4}$, $7 \cdot 10^{-9}$ на 7-е сутки при 10 мг/л аденина и $1,8 \cdot 10^{-5}$ на 14-е сутки при 0,1 мг/л аденина/.

Определение числа клеток n в ауксотрофных колониях дрожжей, растущих на средах с разным содержанием аденина, показало, что во всех случаях на 7-е сутки это число приближается к максимальному /для данной среды/ значению и в последующем колеблется в пределах погрешностей измерения; при этом значения n варьируют от опыта к опыту сильнее, чем произведения $n\bar{N}$, где \bar{N} - среднее число колоний на чашку Петри. В табл.3 приведены значения $n\bar{N}$, усредненные для трех сроков инкубации /7, 10 и 14 сут./ и двух независимых опытов, которые характеризуют

Таблица 2

Характеристики ревертирования ауксотрофных по аденину дрожжей штамма 8ПГ-59 на средах с разным содержанием аденина

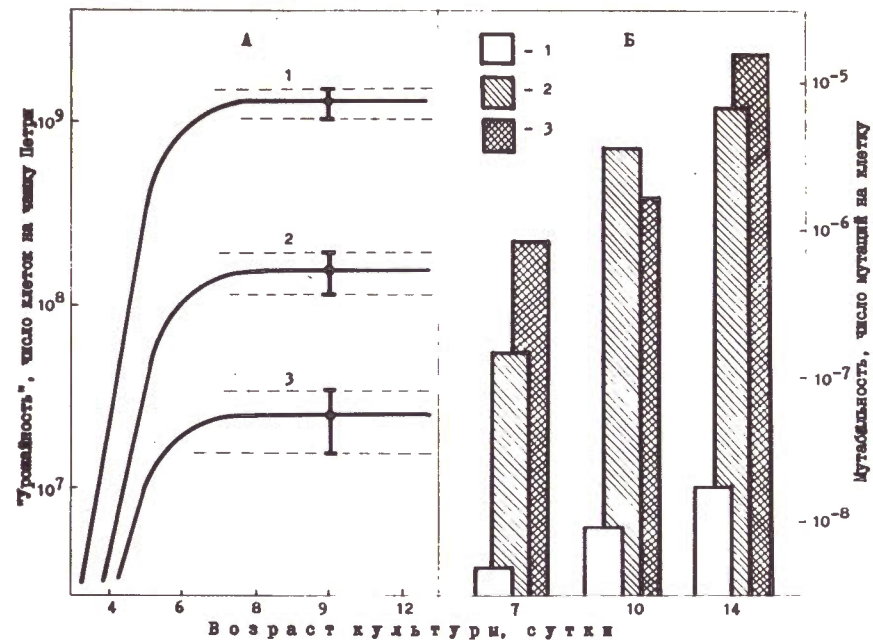
Содержание аденина, мг/л	Возраст культуры, сутки	Характеристики ревертирования*				
		n	N_r / N	M_r / M	F	F'
10	7	8,7	0/821	3/75	0	0,47
	10	14,7	5/782	9/76	0,044	0,90
	14	14,0	30/628	13/74	0,35	1,73
1,0	7	1,0	0/608	6/48	0	13,9
	10	1,3	58/510	55/56	9,4	321,0
	14	1,7	367/419	50/50	123,0	360,0
0,1	7	0,11	0/660	7/74	0	91,2
	10	0,32	96/562	23/71	58,5	181,0
	14	0,23	233/324	35/37	552,0	1821,0

* n - среднее число ауксотрофных клеток в колонии; 10^6 ; N - общее число колоний; N_r - общее число колоний с бородавками; M - число колоний без бородавок, посеянных для выявления скрытых реверсов; M_r - число выявленных колоний со скрытыми реверсами; F - оценка частоты ревертирования по стандартной методике, 10^{-8} ; F' - оценка частоты ревертирования по модифицированной методике, 10^{-8} .

Таблица 3

Урожайность /nN, 10^8 клеток на чашку Петри/ и частота ревертирования /F', 10^{-10} на клетку в час/ в стационарной фазе роста культуры у дрожжей штамма 8ПГ-59 на средах с разным содержанием аденина

Содержание аденина, мг/л	nN	F' для разных интервалов времени	
		7±10 сут.	10±14 сут.
10	12,7±0,10	1,0	0,9
		1,1	1,4
1,0	1,54±0,16	363,0	-
		151,0	446,0
0,1	0,24±0,04	273,0	1554,0
		253,0	365,0



Зависимость урожайности /А/ и мутабельности /Б/ ауксотрофных по аденину дрожжей от исходного содержания аденина в питательной среде: 1 - 10 мг/л, 2 - 1,0 мг/л, 3 - 0,1 мг/л.

"урожайность" дрожжей на средах с разным содержанием аденина. Динамика процесса показана на рисунке /А/. Видно, что различия в урожайности на разных средах примерно соответствуют различиям в исходном содержании аденина, чего и следовало ожидать, если аденин является лимитирующим рост фактором.

Частоты ревертирования F', соответствующие 7, 10 и 14-м суткам инкубации, приведены на рисунке /Б/. То обстоятельство, что ауксотрофные по аденину дрожжи уже на 7-е сутки в разных средах практически достигают стационарной фазы роста, означает, что увеличение частот ревертирования, зарегистрированное на 10-е и 14-е сутки /табл.2/, обусловлено появлением реверсов главным образом в стационарной фазе роста. Это затрудняет нормировку частот ревертирования в интервалах 7±10 и 10±14 сут. на клетку на деление, так как определить число клеток, делящихся во время стационарной фазы, очень трудно. Поэтому мутагенез в эти интервалы времени более адекватно характеризует нормировка на клетку на единицу времени. Значения F' для t = 7±10 и 10±14 сут., полученные в двух независимых опытах, приведены в табл.3. Видно, что и при такой нормировке частота ревертирования дрожжей

с уменьшением содержания аденина от 10 до 1,0 и 0,1 мг/л, увеличивается очень сильно, почти в 300 раз; при этом на средах с 1,0 и 0,1 мг/л аденина частота ревертирования в поздней стационарной фазе /10±14 сут./ систематически превышает значения частоты ревертирования в ранней стационарной фазе /7±10 сут./. Интересно, что частота ревертирования F'_i у дрожжей в стационарной фазе роста оказалась примерно такой же, как и частота мутирования в стационарной фазе у бактерий /7/.

ОБСУЖДЕНИЕ

Несмотря на значительный разброс от опыта к опыту абсолютных значений частоты ревертирования /см. табл.1-3/, во всех опытах ярко выраженными были два феномена: увеличение частоты ревертирования с уменьшением содержания в среде аденина и увеличение частоты ревертирования с возрастом культуры /особенно заметное на средах с низким содержанием аденина/. Не являются ли, однако, эти феномены артефактами?

Допустим, что частота ревертирования дрожжей не зависит от содержания аденина в среде и является величиной постоянной. Тогда регистрируемое увеличение частоты ревертирования при уменьшении содержания аденина в среде может быть или следствием "недопроявления" части реверсов при относительно высоких концентрациях аденина /что может приводить к завышениям значений N_0 и, следовательно, к занижениям значений F' /, или следствием отмирания и лизиса части ауксотрофных клеток на средах с низким содержанием аденина /что может приводить к занижениям значений n и, следовательно, завышениям значений F' /. В первом случае истинными значениями F' будем считать величины порядка 10^{-5} , а более низкие относить к артефактам. Во втором случае истинными значениями F' будем считать величины порядка 10^{-8} , а к артефактам относить более высокие.

Если считать, что истинное значение $F' \approx 10^{-5}$, то легко вычислить, что к 7-14-м суткам инкубации на среде с 10 мг/л аденина, когда $n \approx 10^7$ клеток, практически все первичные колонии, лишенные бородавок, должны содержать скрытые реверсы ($M_r/M > 0,999$). В действительности, однако, как следует из табл.2, на 7-е, 10-е и 14-е сутки инкубации отношение M_r/M равно соответственно 0,04; 0,12 и 0,18, что несоизмеримо меньше ожидаемого значения. Это позволяет отвергнуть возможное недопроявление реверсов как причину серьезной погрешности в оценке F' на среде с 10 мг/л аденина.

Предположим теперь, что истинные значения $F' = 10^{-8}$. Легко вычислить, что в этом случае к 7-14-м суткам инкубации на среде с 0,1 мг/л аденина должно погибнуть и бесследно исчезнуть до 99,9% ауксотрофных клеток. А так как к этим срокам на такой среде $n \approx 10^5$, столь массовая гибель клеток может происходить

лишь в том случае, если скорость размножения ауксотрофных дрожжей на среде с 0,1 мг/л аденина в несколько раз превышает скорость их размножения на среде с 10 мг/л аденина, чего, конечно, не может быть. Поэтому гибель и лизис ауксотрофных клеток не может являться причиной существенной погрешности в оценке F' на среде с 0,1 мг/л аденина.

Таким образом, мы приходим к выводу, что зарегистрированное в наших опытах увеличение частоты ревертирования ауксотрофных по аденину дрожжей от 10^{-8} до 10^{-5} при уменьшении содержания в среде аденина от 10 до 0,1 мг/л не является артефактом, а отражает, скорее всего, реальную закономерность.

Увеличение частоты ревертирования с возрастом культуры также, по-видимому, не является артефактом. Если бы частота ревертирования оставалась постоянной во времени, то возрастание регистрируемых значений F' от 7-х к 14-м суткам инкубации могло бы быть следствием только дополнительного проявления ранее возникших, но не успевших выявиться, реверсов. В таком случае с течением времени и с увеличением класса N_0 отношение M_r/M должно бы уменьшаться, притом так, чтобы произведение nN_0 оставалось примерно постоянной величиной. В действительности же, как следует из табл.2, отношение M_r/M с течением времени не уменьшается, а увеличивается, что особенно ярко выражено при низких содержаниях аденина. Увеличение отношения M_r/M с течением времени свидетельствует, скорее всего, о новообразовании реверсов, продолжающемся даже во время стационарной фазы роста культур. Увеличение частоты ревертирования с возрастом культур хорошо согласуется с данными об увеличении частоты ревертирования с уменьшением содержания в среде аденина.

Свидетельствуют ли приведенные в табл.1-3 результаты об антимутагенном эффекте повышенных концентраций аденина или о мутагенном действии лимита по этому метаболиту? Шуллер и фон Борстель /8/ исследовали влияние разных концентраций аденина /от 2,5 до 500 мг/л/ на частоту ревертирования по потребности в лизине у гаплоидных дрожжей, ауксотрофных как по лизину, так и по аденину. Лимитирующим фактором в этих опытах служил лизин /1 мг/л/, о чем свидетельствовала независимость количества клеток в колониях ауксотрофных дрожжей от содержания в среде аденина. Никаких различий в частотах ревертирования в этих опытах обнаружено не было; это может означать, что сам по себе аденин не является ни мутагеном, ни антимутагеном. Вероятнее всего, что увеличение мутабельности у дрожжей при "адениновом голодании", описанное в нашей работе, имеет такую же природу, как и мутагенное действие "тиминового голодания" на бактерии, т.е. обусловливается увеличением вероятности ошибок при репликации и репарации ДНК /5,9/. В пользу этого объяснения свидетельствует и работа /10/, в которой описано увеличение в 10^3 раз частоты мутирования фаговой ДНК, реплицирующейся *in vitro* при недостаточном содержании в среде одного из нуклеотидов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ryan F.J., Schwartz M., Fried Ph. J.Bacteriol., 1955, vol.69, p.552.
2. Novick A., Szilard L. Proc.Nat.Acad.USA, 1950, vol.36, p.708.
3. Fox M.S. J.Gen.Physiol., 1955, vol.39, p.267.
4. Kubischek H.E., Bendigkeit H.E. Mutation Res., 1964, vol.1, p.113.
5. Bresler S.E., Mosevitsky M.I., Vyacheslavov L.G. Mutation Res., 1973, vol.19, p.281.
6. Захаров И.А. и др. Сборник методик по генетике дрожжей-сахаромицетов. "Наука", Л., 1976.
7. Ryan F.J. J.Gen.Microbiol., 1959, vol.21, p.530.
8. Schuller R.C., Von Borstel R.C. Mutation Res., 1974, vol.24, p.17.
9. Фрадкин Г.Е. Жизнеспособность, радиочувствительность, мутабельность клеток и метаболическая нестабильность ДНК. Энергоатомиздат, М., 1983.
10. Kunkel T.A., Silber J.R., Loeb L.A. Mutation Res., 1982, vol.94, p.413.

Рукопись поступила в издательский отдел
21 марта 1984 года.

Ильина В.Л., Корогодин В.И., Файси Ч.

P19-84-171

Влияние содержания аденина в питательной среде
на частоту возникновения реверсов у гаплоидных дрожжей

Частота возникновения реверсов у ауксотрофных по аденину дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* увеличивается с уменьшением содержания аденина в среде. Так, у штамма 8ПГ-59 при исходном содержании в среде аденина 10, 1 и 0,1 мг/л частота ревертирования равнялась $1,7 \cdot 10^{-8}$, $3,2 \cdot 10^{-6}$ и $1,8 \cdot 10^{-5}$ на клетку на деление. Уточнение методики обнаружения реверсов позволило установить возрастание частоты ревертирования с увеличением возраста культуры в стационарной фазе роста. Так, при исходном содержании в среде 0,1 мг/л аденина частота ревертирования на 7-е сутки равнялась $9,1 \cdot 10^{-7}$, на 10-е - $1,8 \cdot 10^{-6}$ и на 14-е - $1,8 \cdot 10^{-6}$. Полученные результаты объясняются дисбалансом синтеза ДНК у ауксотрофных по аденину дрожжей при недостатке аденина в среде.

Работа выполнена в Лаборатории ядерных проблем ОИЯИ.

Препринт Объединенного института ядерных исследований. Дубна 1984

Перевод О.С.Виноградовой

Ilyina V.L., Korogodin V.I., Fajsi Cz.

P19-84-171

Effect of Adenine Concentration in the Medium
on the Frequency of Reversion in Haploid Yeasts

The frequency of reversion from adenine auxotrophy in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* increases with the decrease of adenine concentration in the medium: for the strain 8ПГ-59 (a ade2-192 rad2), with initial adenine concentrations 10, 1 and 0.1 mg/l, the reversion frequency is $1.7 \cdot 10^{-8}$, $3.2 \cdot 10^{-6}$ and $1.8 \cdot 10^{-5}$ per cell per division, respectively. By an improved method of registration of revertants an increase of the reversion frequency with the age of culture in the stationary phase of growth is demonstrated: for all initial concentration of 0.1 mg/l adenine in the medium, the reversion frequency was $9.1 \cdot 10^{-7}$ on the 7th day, $1.8 \cdot 10^{-6}$ on the 10th, and $1.8 \cdot 10^{-5}$ on the 14th.

The investigation has been performed at the Laboratory of Nuclear Problems, JINR.

Preprint of the Joint Institute for Nuclear Research. Dubna 1984