

ОБЪЕДИНЕННЫЙ
ИНСТИТУТ
ЯДЕРНЫХ
ИССЛЕДОВАНИЙ
ДУБНА

P19-85-191

В.Л.Ильина, В.И.Корогодин, Ч.Файси

ЗАВИСИМОСТЬ ЧАСТОТЫ
СПОНТАННОГО ВОЗНИКНОВЕНИЯ РЕВЕРСОВ
У ГАПЛОИДНЫХ ДРОЖЖЕЙ РАЗНЫХ ГЕНОТИПОВ
ОТ СОДЕРЖАНИЯ АДЕНИНА В СРЕДЕ
И ОТ ВОЗРАСТА КУЛЬТУР

Направлено в журнал "Mutation Research"

1985

Одной из существенных причин спонтанной мутабельности генов и хромосом является, по-видимому, дисбаланс синтеза нуклеиновых кислот/1,2/ и дисбаланс скоростей синтеза ДНК и белка/3/. В обоих случаях усиление дисбаланса сопровождается увеличением частоты возникновения мутаций, что обычно объясняют "ошибками синтеза" генетических структур. Количественные закономерности этого явления, однако, изучены настолько мало, что до сих пор не получили своего отражения в методиках, применяемых при изучении мутационного процесса.

Так, для определения частоты возникновения реверсов у ауксотрофных микроорганизмов обычно используют методику, предложенную еще Райаном/4/: клетки ауксотрофного штамма выращивают на лимитированной по соответствующему метаболиту среде, а затем учитывают выход вторичных прототрофных колоний. В основу этой методики неявно положены допущения: /а/ - что мутанты возникают лишь во время деления клеток, /б/ - что степень лимитирования питательной среды не влияет на частоту ревертирования.

При работе с дрожжами для определения частоты возникновения реверсов часто используют штаммы, ауксотрофные по аденину, и лимитированную по аденину среду культивирования/5/. При этом возможность того, что варьирование содержания аденина может существенно влиять на сбалансированность синтеза ДНК и, тем самым, на частоту мутирования, в расчет не принимается. Однако представление о том, что содержание аденина в среде в случае дрожжей не влияет на мутационный процесс, нельзя считать обоснованным: в единственной работе/6/, посвященной этому вопросу, использовали дрожжи, ауксотрофные по аденину и лизину, и среду, столь сильно лимитированную по лизину, что различия в содержании аденина от 2,5 до 500 мг/л не изменяли выхода биомассы ауксотрофных клеток и, следовательно, не могли существенно повлиять на сбалансированность метаболических процессов. В действительности же, как будет показано ниже, в тех случаях, когда лимитирующим рост фактором служит аденин, варьируя его содержание в среде и возраст культур, частоту спонтанного возникновения реверсов у ауксотрофных по аденину дрожжей можно изменять в 10^3 - 10^4 раз.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Использовали различающиеся по мутабельности гаплоидные дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* петергофской линии, полученные от

проф. И.А.Захарова /ЛИЯФ АН СССР/: 8ПГ-59 (a ade2-192 rad2) и p192 (a ade2-192). Характеристики этих штаммов описаны ранее/7-9/. Состав сред и методы культивирования приведены в/5/.

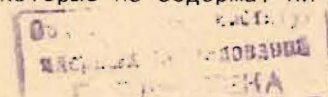
На средах без аденина дрожжи этих штаммов не растут, а на средах, содержащих аденин, образуют колонии красного цвета. Реверсы этих дрожжей /возникающие за счет обратных мутаций в гене ade2 или в результате прямых мутаций в генах-супрессорах/ формируют белые или бледно-розовые колонии и могут расти на средах без аденина.

Культивировали дрожжи на полной питательной среде. При проведении опытов их высевали в чашки Петри на агаризованные минимальные среды, содержащие 0,1; 1,0; 10 или 100 мг/л аденина. Густота посева - 100-200 клеток на чашку. В каждом варианте опытов использовали 10-20 чашек Петри. Опыты проводили в нескольких повторностях.

На минимальной среде с аденином исходные ауксотрофные клетки образуют первичные колонии красного цвета, размеры которых увеличиваются с возрастанием содержания аденина. Некоторые из таких колоний вообще не имеют реверсов; другие содержат так называемые "скрытые реверсы" - отдельные клетки или микроколонины, незаметные невооруженным глазом; у колоний третьего типа на поверхности вырастают хорошо различимые вторичные колонии реверсов - "бородавки".

Частоту возникновения реверсов определяли спустя разные сроки инкубации при 30°C. Для этого прежде всего подсчитывали общее число N вырастающих в чашках Петри первичных колоний и с помощью камеры Горяева находили среднее число n содержащихся в них ауксотрофных клеток. Одновременно определяли число N_p колоний, имеющих бородавки, и долю q колоний без бородавок, содержащих скрытые реверсы. Чтобы выявить колонии со скрытыми реверсами, использовали прием, описанный И.А.Захаровым/10/. Несколько десятков колоний без бородавок нанесли /каждую в отдельности/ в виде мазков на поверхность агаризованной минимальной среды без аденина: если какая-либо из них содержала реверсы, то в области мазка в течение трех-четырех суток вырастали одна или несколько крупных белых прототрофных колоний/11/.

Несмотря на то, что существование класса первичных колоний со скрытыми реверсами было описано еще Райаном/4/, при определении частот ревертирования этими колониями, как правило, пренебрегают. При таком подходе оценка частоты возникновения реверсов задается формулой $r = \frac{1}{n} \ln \frac{N}{N - N_p}$. Если же учитывать колонии со скрытыми реверсами, то оценкой частоты ревертирования должна служить величина $R = \frac{1}{n} \ln \frac{N}{(1-q)(N - N_p)}$, где q - найденная описанным выше способом доля лишенных бородавок колоний, содержащих скрытые реверсы. Очевидно, что число колоний "нулевого класса", которые не содержат ни явных, ни скрытых

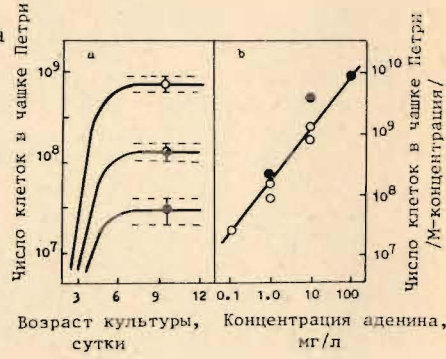


реверсов, равно $N_0 = (1 - q)(N - N_p)$. Частота ревертирования здесь задается как отношение числа событий возникновения реверсий к общему числу клеток в популяции к данному моменту времени.

РЕЗУЛЬТАТЫ

На рис. 1а приведены кривые роста дрожжей штамма 8ПГ-59 на средах с разным содержанием аденина. Видно, что при всех трех концентрациях аденина логарифмическая фаза роста этих дрожжей завершается к седьмым суткам, после чего наступает стационарная фаза. Для дрожжей обоих штаммов в стационарной фазе роста число клеток на чашку Петри прямо пропорционально содержанию аденина /рис. 1б/, - следовательно, в наших опытах именно аденин служил лимитирующим рост фактором.

Рис. 1. Влияние содержания аденина в твердой питательной среде на динамику роста культур дрожжей: а - кривые роста дрожжей штамма 8ПГ-59 на средах, содержащих 10 (○), 1 (●) и 0,1 (●) мг/л аденина; б - зависимость урожайности /числа клеток на чашку Петри/ в стационарной фазе роста дрожжей от содержания аденина в среде, для штаммов 8ПГ-59 (○) и p192 (●)



В таблице приведены значения частот ревертирования τ , полученные стандартным методом /т.е. без учета скрытых реверсов/ для обоих штаммов, двух сроков культивирования и двух уровней содержания аденина /различие в сроках культивирования обусловлено тем, что штамм p192 растет медленнее, чем штамм 8ПГ-59, что особенно заметно на лимитированных по аденину средах/. Видно, что с увеличением возраста культур и уменьшением содержания аденина значения частот ревертирования τ увеличиваются. О чем это может свидетельствовать?

Допустим, что в действительности частота ревертирования не зависит ни от возраста культуры, ни от содержания аденина в среде, а реверсы образуются лишь в логарифмической фазе роста. Тогда приведенные в таблице результаты оценок τ по выходу колоний класса N_p можно объяснить лишь тем, что продолжительность культивирования и уменьшение содержания аденина в среде способствуют более полному выявлению реверсов, возникающих в первичных колониях во время логарифмической фазы роста. В этом случае максимальные /для каждого штамма/ значения частот реверти-

Таблица. Влияние содержания аденина в среде и возраста культур на частоту возникновения реверсов, оцениваемую двумя методами

Штамм	Содержание аденина в среде, мг/л	Возраст культур, сутки	n	10^6	N	N_p	M	M_h	q	τ	R
p192	100	16	60	60	581	0	107	1	0,01	-	0,017
		27	61	426	15	241	42	42	0,17	0,06	0,36
	10	16	25	25	278	7	112	8	0,07	0,10	0,39
		27	34	34	129	12	115	26	0,23	0,29	1,06
8ПГ-59	10	7	8,7	821	0	75	3	0,04	-	-	0,47
		14	14,	628	30	74	13	0,18	0,35	1,77	
	1	7	1,0	608	0	48	6	0,13	-	-	13,9
		14	1,7	419	367	50	49	0,98	123.	353,	

Примечания: n - число клеток в одной колонии;

M - общее число колоний;

N_p - общее число колоний, содержащих бородавки;

M - число колоний без бородавок, посеянных для выявления скрытых реверсов;

M_h - число выявленных колоний со скрытыми реверсами;

q - относительное число колоний без бородавок, содержащих скрытые реверсы; $q = M_h / M$;

τ - частота ревертирования, оцениваемая только по числу колоний с бородавками;

R - частота ревертирования с поправкой на содержание колоний со скрытыми реверсами.

рования должны быть наиболее близкими к истинным, а меньшие - артефактом, результатом "недопроявления" части реверсов. Тогда доля колоний со скрытыми реверсами q с уменьшением аденина в среде и увеличением возраста культуры должна уменьшаться, а оценка частот ревертирования R с учетом выхода колоний со скрытыми реверсами - приводить к нивелировке таких различий.

Результаты определения величины q даны в этой же таблице. Мы видим, что выход колоний со скрытыми реверсами q не уменьшается, а возрастает с течением времени и уменьшением содержания аденина, учет же скрытых реверсов не приводит к сглаживанию различий в частотах ревертирования R между культурами разного возраста, выращиваемыми на средах с разным содержанием аденина. Это позволяет рассматривать возрастание частоты ревертирования с уменьшением содержания аденина в среде и увеличением возраста культуры дрожжей как реальный факт. Из таблицы следует также, что учет скрытых реверсов дает более высокие частоты ревертирования (R), чем стандартный метод (r). В дальнейшем мы будем пользоваться только этим, более корректным, методом оценки частот ревертирования.

При определении R учитываются практически все реверсы, возникшие в культуре к моменту наблюдения. Располагая такими данными, можно находить значения R для разных интервалов времени, как отношение числа происшедших в этом интервале реверсий к числу клеток в конце интервала. На рис.2 приведены такие результаты для дрожжей обоих штаммов, разных условий культивирования и двух сроков наблюдения - логарифмической и ранней стационарной /А/ и поздней стационарной /В/ фаз роста. Видно, что у дрожжей в условиях наших экспериментов реверсы возникают не только во время логарифмической, но и во время стационарной фазы роста, причем с весьма высокой частотой.

Посмотрим теперь, как зависит частота ревертирования от содержания аденина в среде. На рис.3 приведены результаты нескольких опытов с дрожжами обоих штаммов. Светлыми значками обозначены результаты, полученные в ранней стационарной фазе роста, темными - в поздней. Мы видим, что частота ревертирования, в зависимости от условий и продолжительности культивирования, может изменяться в 10^3 - 10^4 раз; минимальные значения R /порядка 10^{-10} - 10^{-9} / характерны для молодых культур на обогащенных аденином средах, а максимальные /порядка 10^{-6} - 10^{-5} / - для старых культур, сильно лимитированных по аденину. Во всех случаях частота ревертирования возрастает обратно пропорционально содержанию аденина в среде, что в двойном логарифмическом масштабе описывается прямой линией. Такая форма зависимости прослеживается у дрожжей обоих штаммов на всех сроках наблюдения, несмотря на огромные различия в абсолютных значениях R .

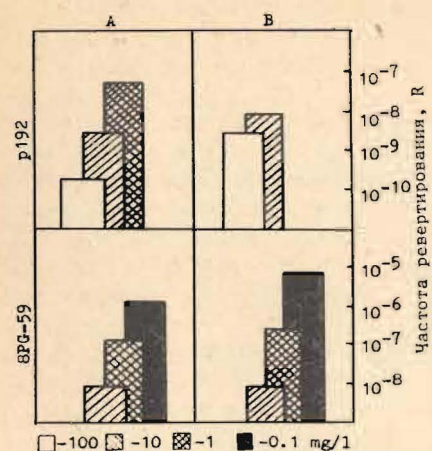


Рис.2. Частота возникновения реверсов у дрожжей штаммов p192 и 8ПГ-59 во время логарифмической и ранней стационарной /А/, а также поздней стационарной /В/ фаз роста культур на средах, содержащих 100 /□/, 10 /▨/, 1 /▩/ и 0,1 /■/ мг/л аденина. Для штамма p192 периоды А и В соответствуют 0:16 и 16:27 суткам, для штамма 8ПГ-59 - 0:7 и 7:17 суткам.

ОБСУЖДЕНИЕ

Итак, в наших опытах установлено, что у ауксотрофных по аденину гаплоидных дрожжей частота возникновения реверсов возрастает как по мере старения культур, так и по мере уменьшения содержания аденина в среде. Допустим, что оба феномена связаны друг с другом, т.е. "эффект старения" обуславливается истощением в среде аденина. Тогда следовало бы ожидать, что влияние исходного содержания аденина в среде на мутабельность дрожжей должно быть особенно ярко выражено у молодых культур и сглаживаться у старых, после достижения ими стационарной фазы роста: ведь пропорциональность M -концентрации клеток содержанию аденина в среде /рис.1б/ означает, что ко времени перехода к стационарной фазе культуры должны быть примерно одинаково лимитированы по аденину. В действительности, однако, ярко выраженная зависимость мутабельности от содержания аденина наблюдается как у молодых, так и у старых культур, причем характер этой зави-

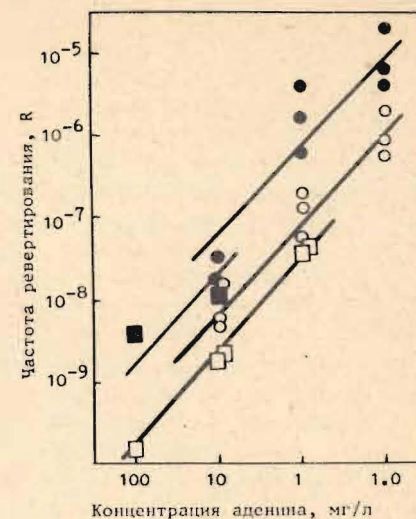


Рис.3. Зависимость частоты ревертирования дрожжей от содержания аденина в среде для культур разных возрастов: штамм 8ПГ-59, возраст 7 /○/ и 14-18 /●/ дней; штамм p192, возраст 16 /□/ и 27 /■/ дней.

симости с возрастом культур не изменяется /рис.3/. Создается впечатление, что по мере старения культур у них как бы реализуется тот "мутационный темп", который задается клеткам исходным содержанием в среде аденина.

Зарегистрированное нами возрастание числа реверсий во время стационарной фазы роста дрожжей может быть обусловлено тремя причинами: а/ запаздыванием фенотипического проявления мутаций, возникающих в клетках во время логарифмической фазы; б/ увеличением частоты мутирования у небольшого числа делящихся в стационарной фазе клеток; в/ новообразованием и фенотипическим проявлением мутаций у неделящихся клеток. Данные, которыми мы располагаем, не позволяют сделать окончательный выбор между этими возможностями. Однако более вероятной представляется третья из них, лучше соответствующая /по крайней мере на интуитивном уровне/ ситуации, изображенной на рис.2, когда выход реверсов в глубокой стационарной фазе превышает их выход в предшествующий период. Феномен этот генетически-зависим: некоторые авторы вообще его не наблюдали/12/; другие, изучавшие динамику появления реверсов у большого числа штаммов дрожжей, у одних из них видели возрастание выхода реверсов во время стационарной фазы, у других - нет/13/.

Как показано на рис.3, при всех сроках наблюдения и условиях культивирования у дефектных по репарации ДНК дрожжей /штамм 8ПГ-59/ частота ревертирования выше, чем у дрожжей с нормальной репарационной системой /штамм r192/. Это позволяет предположить, что мутагенез у дрожжей в стационарной фазе роста может быть связан с "ошибками репарации" спонтанно возникающих поврежденных ДНК. Материалом для такой репарации, естественно, служит нуклеотидный пул клеток. Если допустить, что у ауксотрофных по аденину дрожжей в стационарной фазе относительное содержание аденина в нуклеотидном пуле, используемом для репарации, пропорционально его исходному содержанию в среде, то зависимость частоты ревертирования от содержания аденина в среде можно объяснить в терминах гипотезы "дисбаланса репаративного синтеза ДНК".

Действительно, мерой дисбаланса в соотношении нуклеотидов /предшественников ДНК/ в случае ауксотрофных по аденину клеток, когда именно аденин является лимитирующим рост фактором, может служить величина, обратная его содержанию в среде. В таком случае данные, приведенные на рис.3, можно интерпретировать как пропорциональность частоты ревертирования степени дисбаланса аденина по отношению к другим нуклеотидам. Прототипом этой гипотезы может служить гипотеза "дисбаланса репликативного синтеза ДНК", широко обсуждающаяся в литературе/1,2/. Эта гипотеза была использована для объяснения зависимости частоты мутирования фаговой ДНК, реплицирующейся *in vitro*, от относительного содержания в среде разных нуклеотидов/14,15/. Для некоторых нуклеотидов и условий репликации /с участием репликативной ДНК-

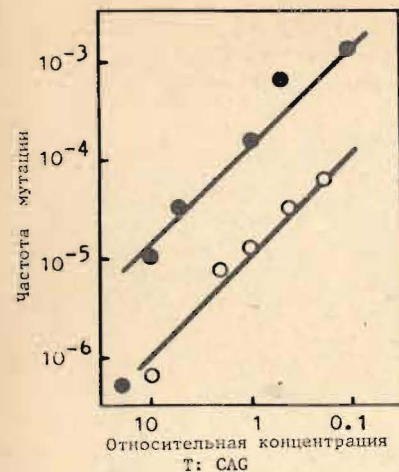


Рис.4. Влияние относительного содержания тимина в смеси нуклеотидов (T:CAG) на частоту мутирования фаговой ДНК при репликации *in vitro* с участием ДНК-полимеразы α /o/ и ДНК-полимеразы β /●/ /по данным/15//.

полимеразы α и репаративной ДНК-полимеразы β млекопитающих/ эта зависимость, при изображении в принятом нами масштабе, имеет такую же форму /рис.4/, что и для дрожжевых клеток /рис.3/. Гипотезу "дисбаланса репликативного синтеза ДНК" можно, по-видимому, использовать для объяснения зависимости частоты ревертирования дрожжей от содержания аденина в среде во время логарифмической и ранней стационарной фазы роста.

Судя по нашим данным /рис.3/, а также по данным, полученным на фаговой ДНК *in vitro*/14,15/, на счет "дисбалансного мутагенеза" может приходиться подавляющая доля спонтанно возникающих мутаций. Подобную точку зрения высказывал Бреслер/16/ на основании своих опытов с бактериями. Весьма вероятно, что таким же путем может влиять на мутагенез содержание в среде самых разных метаболитов, ионов металлов, а также субстратов энергетического обмена, который, как известно/17/, тесно связан с процессами репарации. Особый интерес при этом представляет вопрос - зависят ли от условий культивирования относительные частоты мутирования разных генов, и, прежде всего, генов, находящихся в репрессированном и дерепрессированном состоянии.

Однако, какие бы результаты ни были получены в ходе дальнейшего изучения мутационного процесса, уже сейчас можно утверждать, что частота спонтанного мутирования какого-либо гена у каких-либо клеток не может быть задана одним единственным числом: описать ее можно лишь в форме распределения на условиях культивирования, совместимых с жизнеспособностью данных клеток. В связи с тем, что перечислить все условия, пригодные для культивирования какого-либо объекта, невозможно, такое описание никогда не будет полным.

Авторы благодарят проф. И.А.Захарова за любезно предоставленные штаммы дрожжей для исследований.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bresler S.E., Mosevitsky M.I., Vyacheslavov L.G. Mutation Res., 1973, 19, p.281-293.

2. Barclay V.J. et al. Can.J.Biochem., 1982, 60, p.172-194.
3. Фрадкин Г.Е. Жизнеспособность, радиочувствительность, мутабельность клеток и метаболическая нестабильность ДНК. Энергоатомиздат, М., 1983.
4. Ryan F.J., Schwartz M., Fried P. J.Bacteriol., 1955, 69, p.552-557.
5. Захаров И.А. и др. Сборник методов по генетике дрожжей-сахаромицетов. "Наука", Л., 1984.
6. Schuller R.V., Von Borstel R.C. Mutation Res., 1974, 24, p.17-23.
7. Захаров И.А., Кожина Т.Н., Федорова И.В. ДАН СССР, 1968, 181, с.470-472.
8. Арман И.П., Дутова Т.А., Девин А.Б. "Генетика", 1971, 7, с.186-188.
9. Железнякова Н.Ю. и др. "Генетика", 1975, 11, с.89-96.
10. Захаров И.А. В сб.: Экспериментальный мутагенез у микроорганизмов и его практическое использование. "Наука", М., 1966, с.140.
11. Ильина В.Л., Корогодин В.И., Файси Ч. ОИЯИ, P19-84-171, Дубна, 1984.
12. von Borstel R.C., Cain K.T., Steinberg C.M. Genetics, 1971, 69, p.17-27.
13. Дутова Т.А., Мишина И.Н., Арман И.П. "Генетика", 1978, 14, с.1185-1194.
14. Kunkel T.A., Loeb L.A. J.Biol.Chem., 1980, 255, p.9961-9966.
15. Kunkel T.A., Silber J.R., Loeb L.A. Mutation Res., 1982, 94, p.413-419.
16. Бреслер С.Е. В сб.: Происхождение жизни и эволюционная биохимия. "Наука", М., 1975, с.14-21.
17. Корогодин В.И. Проблемы пострадиационного восстановления. Атомиздат, М., 1966.

Рукопись поступила в издательский отдел
18 марта 1985 года.

Ильина В.Л., Корогодин В.И., Файси Ч.

P19-85-191

Зависимость частоты спонтанного возникновения реверсов у гаплоидных дрожжей разных генотипов от содержания аденина в среде и от возраста культур

При культивировании ауксотрофных по аденину дрожжей на твердых питательных средах частота возникновения реверсов возрастает обратно пропорционально содержанию аденина в среде. Эта закономерность наблюдается при разных сроках регистрации эффекта, хотя абсолютные значения частоты ревертирования увеличиваются с возрастом культур, в том числе во время стационарной фазы роста. Благодаря этому частоты спонтанного возникновения реверсов у дрожжей одного и того же штамма при разных условиях эксперимента могут различаться в 10^3 - 10^4 раз. Зависимость частоты ревертирования от содержания аденина и возраста культуры идентична для дрожжей с нормальными и дефектными системами репарации ДНК, существенно различающихся по абсолютным значениям этих частот при прочих равных условиях.

Работа выполнена в Лаборатории ядерных проблем ОИЯИ.

Препринт Объединенного института ядерных исследований, Дубна 1985

Перевод М.И.Потапова