

ОБЪЕДИНЕННЫЙ
ИНСТИТУТ
ЯДЕРНЫХ
ИССЛЕДОВАНИЙ
ДУБНА

P19-85-730

В.Л.Ильина, В.И.Корогодин, Ч.Файси

ЗАВИСИМОСТЬ ЧАСТОТЫ ОБРАЗОВАНИЯ
РЕВЕРСОВ РАЗНЫХ ТИПОВ
У АУКСОТРОФНЫХ ПО АДЕНИНУ ДРОЖЖЕЙ
ОТ СОДЕРЖАНИЯ АДЕНИНА В СРЕДЕ

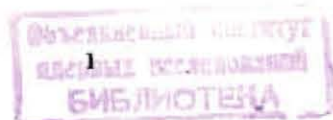
Направлено в журнал "Генетика"

1985

На ауксотрофных по аденину (мутация *ade2-192*) гаплоидных дрожжах *Saccharomyces cerevisiae* двух штаммов было показано ^{/1,2/}, что уменьшение содержания в среде этого метаболита приводит к увеличению частоты возникновения реверсов. Этот феномен не связан с селекцией, а представляет собой реальный факт ^{/3/}. Реверсы, выход которых регистрировали в этих работах, имели смешанную природу и возникали за счет мутаций трех типов: локусных мутаций (истинные обратные мутации и внутригенные супрессоры в гене *ade2*), супрессорных мутаций узкого спектра действия (т.е. влияющих только на синтез аденина) и супрессорных мутаций широкого спектра действия ^{/4/}. В этой работе приводятся результаты экспериментов, позволяющие оценить частоты возникновения реверсов первых двух типов (класс А) и реверсов третьего типа (класс В).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

В работе использовали гаплоидные дрожжи-сахаромыцеты, штамм 769-р192-15В-П4 (а *ade2-192 lys5-3*). Дрожжи рассевали по 150-300 клеток в чашки Петри на лавсановые ядерные фильтры (диаметр пор 0,5 мкм), покрывавшие агаризованную минимальную среду ^{/5/}, содержащую 30 мг/л лизина и 100, 10 и 1 мг/л аденина. Культуры инкубировали при 30°C в течение 20 сут (к концу этого срока дрожжи находились в поздней стационарной фазе роста). Затем ядерные фильтры с выросшими колониями переносили в другие чашки Петри на селективную среду, лишенную аденина, но содержащую 30 мг/л лизина. Инкубация на этой среде дает преимущественную возможность клеткам-ревертантам образовывать



видимые глазом колонки - "бородавки". Такие бородавки регистрировали при первом одновременном появлении. Бородавки, проявившиеся в более поздние сроки, образовывались за счет реверсов, возникавших из клеток исходного штамма уже после переноса фильтров на селективную среду. Ошибки в идентификации колоний реверсов этих двух типов были незначительными. В предварительных опытах было установлено, что эта методика выявления реверсов, образовывавшихся на средах с разным содержанием аденина, дает такие же результаты, как и использовавшаяся ранее /1/, но менее трудоёмка и позволяет оперировать с большими выборками.

Частоту ревертирования оценивали по стандартной формуле $R = \frac{1}{n} \ln \frac{n}{n_0}$, где n - среднее число ауксотрофных клеток в одной колонии, n_0 - общее число колоний, n_0 - число колоний, не содержащих реверсов.

Пробы клеток из каждой колонии реверсов наносили штрихами на минимальные среды, не содержащие аденина (лизин 30 мг/л), и среды, лишенные как аденина, так и лизина; на первых средах могли размножиться все реверсы по аденину, независимо от их потребности в лизине (т.е. реверсы классов А и В), а на вторых - только реверсы, прототрофные как по аденину, так и по лизину (реверсы класса В). Это стандартный прием, широко используемый для разделения реверсов на такие классы /6,7/. Все реверсы класса А, прототрофные по аденину, но сохранявшие потребность в лизине, образовывали колонии белого цвета, характерные для дрожжей генотипа $\Delta b y 2$, а все реверсы класса В, прототрофные по обоим метаболитам, образовывали в той или иной мере окрашенные колонии - от бледно-розовых до темно-вишневых.

Статистическую обработку результатов проводили по стандартным методам.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Размеры выборок и результаты учета выхода реверсов классов А и В, полученные в двух независимых опытах (среда с 100 мг/л аденина использовалась лишь в одном из них), приведены в таблице. Относительные выходы таких реверсов, оцененные по результатам обоих опытов, достоверно не различались ($p > 0,5$), и соответствующие данные можно было объединить. Оценки относительного выхода реверсов классов А и В на средах с разным содержанием аденина показали, что при 100 мг/л аденина выход реверсов класса А равнялся 2,2%, а при 10 и 1 мг/л аденина - соответственно 24,6 и 41,2%. Различия между выходами таких реверсов, с одной стороны, на среде с 100 мг/л аденина и, с другой стороны, на средах с 10 и 1 мг/л аденина высокодостоверны ($p < 0,01$).

Таблица

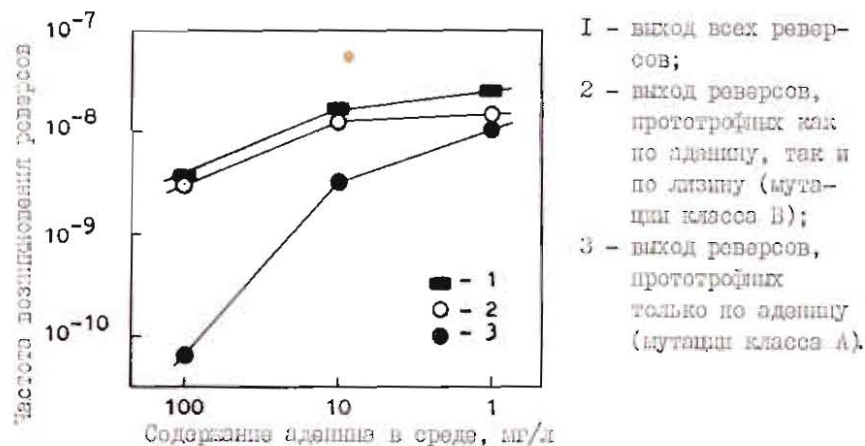
Зависимость относительного выхода колоний реверсов разных классов от содержания аденина в питательной среде

аденин, мг/л	№ опыта	n, 10 ⁵	N	n ₀	Выход реверсов разных классов			Частота ревертирования, 10 ⁻⁸		
					SS	локусные	локусные, %	общая	SS	локусная
1	1	3.4	1001	990	6	5	41.2	2.72	1.55	1.17
	2	2.6	3798	3775	14	0				
10	1	27.8	1287	1206	67	14	24.6	1.72	1.36	0.35
	2	36.4	5275	5074	129	50				
100	2	90.1	7596	7354	225	5	2.2	0.36	0.35	0.006

Обозначения: n - среднее число клеток в колонии,
 N - число всех колоний,
 n₀ - число колоний без реверсов,
 SS - суперрепрессорные мутации.

На долю мутаций в генах-супрессорах широкого спектра действия приходится, соответственно, 28, 75 и 69% всех реверсов.

Зависимость частоты возникновения реверсов по аденину от содержания аденина в среде



На рисунке показана зависимость от содержания аденина в среде частот возникновения всех реверсов (кривая 1), реверсов класса B (кривая 2) и реверсов класса A (кривая 3). Видно, что при переходе от 100 к 10 и, далее, к 1 мг/л аденина частота возникновения реверсов класса B возрастает в 3,9 и 1,1 раза, а реверсов класса A — в 43,8 и 3,3 раза.

ОБСУЖДЕНИЕ

Как отмечалось выше, все реверсы класса B возникают за счет мутирования генов — супрессоров широкого спектра действия (или супер-супрессоров, 38), а реверсы класса A — за счет локусных мутаций в гене *ade2* и генах-супрессорах узкого спектра действия. Однако по некоторым оценкам /4,6/ вклад супрессорных мутаций в возникновение реверсов класса A невелик (несколько процентов), и в первом приближении можно считать, что основное место их обуславливается локусными мутациями. На этом мы и будем основываться в дальнейшем обсуждении.

На других штаммах дрожжей было показано /1,2/, что частота возникновения всех реверсов (смешанная группа) увеличивается с уменьшением содержания аденина в среде. Такая закономерность характерна и для

штамма, использованного в этой работе (рис., кривая 1), хотя эффект здесь и менее выражен. Так же ведет себя и частота мутирования генов-супрессоров (кривая 2). В отличие от этого частота возникновения локусных мутаций изменяется подобным образом лишь в интервале 1 + 10 мг/л аденина, а в интервале 10 + 100 мг/л резко падает, более чем в 40 раз (кривая 3). Если монотонное возрастание частот мутирования с уменьшением содержания аденина в среде можно объяснить мутагенным эффектом дисбаланса нуклеотидов /8/, то в случае локусных мутаций такое объяснение, по-видимому, недостаточно.

Можно предположить, что избыточное содержание аденина в среде (100 мг/л) подавляет активность генов, контролируемых его синтез, в том числе и гена *ade2*, тогда как при недостатке аденина (10 и 1 мг/л) эти гены "активно работают", участвуя в синтезе и-РНК (хотя в случае гена *ade2* продукт его транскрипции, конечно, является дефектным /9/). В пользу этого косвенно свидетельствует тот факт, что при выращивании на среде со 100 мг/л аденина ауксотрофные по аденину клетки образуют белые колонии, а на средах с 10 и 1 мг/л аденина — характерные для них колонии розового цвета. Хотя прямых данных, свидетельствующих о влиянии разных концентраций аденина в среде на активность генов, контролируемых его синтез, мы в литературе не обнаружили, аналогичной может служить репрессия генов у дрожжей, контролируемых синтез метиона, при избыточном содержании в среде этого метаболита /10/. В отличие от этого гены класса B должны активно работать как при избытке, так и при недостатке в среде аденина /11/.

Эти соображения позволяют высказать следующее предположение. Показанный на рисунке наклон кривой 2 отражает мутагенный эффект лимита по аденину только для активно работающих генов. Резкое повышение выхода локусных мутаций при переходе от избытка (100 мг/л) к недостатку (10 и 1 мг/л) в среде аденина (кривая 3) свидетельствует о том, что активно работающие гены мутируют в десятки раз чаще, чем неработающие. В случае гена *ade2* уменьшение содержания аденина в среде от 100 до 10 мг/л вылетит на мутабельность как за счет изменения его функциональной активности, так и за счет появления дисбаланса нуклеотидов, дальнейшее же уменьшение содержания аденина (от 10 до 1 мг/л) — в основном за счет усиления нуклеотидного дисбаланса.

В пользу гипотезы о повышенной спонтанной мутабельности активно работающих генов могут свидетельствовать, прежде всего, результаты работ, в которых было показано влияние функционального состояния некоторых генов *Escherichia coli* /12,13/ и *Salmonella typhimurium* /14/ на частоту возникновения мутаций, индуцированных UV-светом и несколькими химическими мутагенами. Частота мутирования депрессированных

генов была в 2 - 8 раз выше, чем у тех же генов, находящихся в репрессированном состоянии. Спонтанную мутабельность репрессированных и дерепрессированных генов эти авторы специально не изучали. Имеются также данные, что у *E. coli* плазмиды, содержащие триптофановый оперон, значительно менее стабильны в дерепрессированном состоянии, чем в репрессированном /15/. Повышенная мутабельность активно работающих генов по сравнению с неработающими может быть связана с их конформационными различиями, известно, например, что у эукариот в зависимости от интенсивности транскрипции происходит постепенное удаление гистонов, что приводит к деконденсации цепей ДНК /16/.

Однако чем бы ни были обусловлены различия в спонтанной мутабельности активно работающих и неработающих генов, в том случае, если дальнейшие исследования покажут, что описанный нами феномен относится не только к локусу *ade2*, но имеет место и для других генов эукариот и прокариот, это будет означать, что как в эксперименте, так и в природных условиях значительно чаще мутируют те гены, которые в данных конкретных ситуациях находятся в активном состоянии, и реже - те, которые не работают. Как уже отмечали Герман и Дворкин /12/, зависимость мутационных спектров от условий культивирования может иметь существенное значение для теории эволюции.

Обычно частоту спонтанного мутирования генов задает одним единственным числом. Как мы видели, это справедливо только по отношению к данным конкретным условиям. В общем случае мутабельность гена может быть описана лишь в форме распределения по пространству режимов, причем для разных генов такие распределения будут перекрываться, но не совпадать.

Авторы благодарят Л.А.Горденина за предоставления штамма дрожжей; Е.Д.Воробьева - за идонные фильтры; В.В.Велькова, А.Г.Давина, Н.А.Колтову, М.М.Огневецкую и И.И.Толсторукова - за обсуждение результатов работы и ценные замечания; а также Р.Кливарда и К.Воскряни - за помощь в проведении экспериментов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ильина В.Л., Корогодин В.И., Фейси Ч. Влияние содержания аденина в питательной среде на частоту возникновения реверсов у гаплоидных дрожжей. Препринт ОИИ, PI9-84-171, Дубна, 1984.
2. Ильина В.Л., Корогодин В.И., Фейси Ч. Зависимость частоты спонтанного возникновения реверсов у гаплоидных дрожжей разных генотипов

от содержания аденина в среде и от возраста культур. Препринт ОИИ, PI9-85-191, Дубна, 1985.

3. Ильина В.Л., Корогодин В.И. Доказательство реальности повышения частоты ревертирования у гаплоидных дрожжей с уменьшением содержания аденина в среде. Препринт ОИИ, PI9-85-649, Дубна, 1985.
4. Инге-Вечтомов С.Г. Реверсии к прототрофности у дрожжей, нуждающихся в аденине. Вестник ЛГУ, серия биология, 1964, №9, вып. 2, с. 112.
5. Захаров И.А., Кожин С.А., Кожина Т.И., Федорова И.В. Сборник методик по генетике дрожжей-сахаромшцетов. Л., "Наука", 1984, 143 с.
6. Schaller R.C., von Borstel R.C. Spontaneous mutability in yeast. I. Stability of lysine reversion rates to variation of adenine concentration. *Mutat. Res.*, 1974, v. 24, p. 17.
7. Quah S.-K., von Borstel R.C., Hastings P.J. The origin of spontaneous mutation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 1960, v. 96, p. 819.
8. Haynes R.H. Molecular mechanisms in genetic stability and change: The role of deoxyribonucleotide pool balance. In: Genetic consequences of nucleotide pool imbalance/Ed. de Serres P.J. New York: Plenum Publ. Corp., 1985, p.1.
9. Инге-Вечтомов С.Г. Введение в молекулярную генетику. М., "Высшая школа", 1983, 343 с.
10. Andreadis A., Hsu Y.-P., Hermodson M., Kohlhaw G., Schimmel P. Yeast LBU2. Repression of mRNA levels by leucine and primary structure of the gene product. *J. Biol. Chem.*, 1984, v. 259, p. 8059.
11. Sherman F. Suppression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. - In: The molecular biology of the yeast *Saccharomyces*/Eds. Streathern J.N., Jones E.W., Broach J.R. Cold Spring Harbor Monograph Series, 1982, v. 2, p. 463.
12. Herman R.K., Dworkin M.B. Effect of gene induction on the rate of mutagenesis by ICR-191 in *Escherichia coli*. *J. Bact.*, 1971, v. 106, p.543.
13. Brock R.D. Differential mutation of the β -galactosidase gene of *Escherichia coli*. *Mutat. Res.*, 1971, v. 11, p. 181.
14. Savič D.J., Kanazir D.T. The effect of histidine operator-constitutive mutation on UV-induced mutability within the histidine operon of *Salmonella typhimurium*. *Molec. gen. Genet.*, 1972, v. 118, p. 45.
15. Kim S.H., Ryu D.D.Y. Instability kinetics of *trp* operon plasmid ColB1-*trp* in recombinant *Escherichia coli* MV12/pVH5/ and MV12Biotechnol. Bioeng., 1984, v. 26, p. 497.

ИГ. Преображенский О.В., Карпов В.Л., Нагорская Т.В., Мирзабеков А.Д.
Структура хроматина, активного в транскрипции. Мол. биол.,
1984, т. 18, № 1, с. 8.

Рукопись поступила в издательский отдел
10 октября 1985 года.

Ильина В.Л., Корогодин В.И., Файси Ч. P19-85-730
Зависимость частоты образования реверсов разных типов у ауксотрофных
по аденину дрожжей от содержания аденина в среде

На гаплоидных дрожжах *Saccharomyces cerevisiae*, штам 769-p192-158-p4
(a *ade2-192 lys5-3*), показано, что при содержании в среде 100, 10 и 1 мг/л
аденина частоты возникновения реверсов по аденину равны $0,36 \cdot 10^{-8}$, $1,7 \cdot 10^{-8}$
и $2,7 \cdot 10^{-8}$. Относительные частоты возникновения локусных реверсов (за счет
мутаций в гене *ade2*) не превышают соответственно 2, 25 и 41%. Предполагается,
что избыток аденина в среде (100 мг/л) подавляет активность генов, контроли-
рующих его синтез, в том числе и гена *ade2*. Высказывается гипотеза, согласно
которой гены, находящиеся в "активном" состоянии, спонтанно мутируют в десят-
ки раз чаще, чем "не работающие" гены.

Работа выполнена в Лаборатории ядерных проблем ОИЯИ.

Препринт Объединенного института ядерных исследований. Дубна 1985

Перевод О.С.Виноградовой

Ilyina V.L., Korogodin V.I., Fajsi Cs. P19-85-730
Dependence of the Rate of Occurrence of Revertants of Different
Types on the Adenine Content of the Medium in Adenine
Auxotrophic Yeasts

It is shown in the haploid yeast *Saccharomyces cerevisiae*, strain
769-p192-158-p4 (a *ade2-192 lys5-3*), that the rates of reversion to adenine
prototrophy are $0.36 \cdot 10^{-8}$, $1.7 \cdot 10^{-8}$ and $2.7 \cdot 10^{-8}$, when the medium contains
100, 10 and 1 mg/l adenine. The proportion of locus revertants (due to muta-
tion in the gene *ade2*) does not exceed 2, 25 and 41%, respectively. It is
assumed that excess adenine in the medium (100 mg/l) suppresses the activity
of the genes controlling its synthesis, including gene *ade2*. A hypothesis
is forwarded according to which the genes being in the "active" state are
spontaneously mutating several tens of times more frequently than "not wor-
king" genes.

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

Preprint of the Joint Institute for Nuclear Research. Dubna 1985