

ОБЪЕДИНЕННЫЙ
ИНСТИТУТ
ЯДЕРНЫХ
ИССЛЕДОВАНИЙ
ДУБНА

К616

P19-87-575

Н.А.Колтовая, В.Т.Пешехонов,¹ Т.Ю.Просвинова,²
М.Е.Смирнова,² О.В.Чепурная,¹ А.Б.Девин²

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ
МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ RNO^- -МУТАБИЛЬНОСТИ
У ДРОЖЖЕЙ САХАРОМИЦЕТОВ

Сообщение VI. Количественные характеристики
влияния мутации **srn5**
на митотическую стабильность природных
и рекомбинантных генетических структур

Направлено в журнал "Генетика"

¹ Ленинградский институт ядерной физики
им. Б.П.Константинова АН СССР, Гатчина

² Институт молекулярной генетики АН СССР, Москва

1987

В предыдущем сообщении^{/1/} описано выделение ядерной мутации *argm5*, свойства которой согласуются с предположением о наличии у *Saccharomyces cerevisiae* общего контроля митотической стабильности митохондриальных (мт) и ядерных наследственных структур. В настоящей работе количественно охарактеризовано влияние мутации *argm5* на спонтанную и индуцированную *rho*⁻-мутабельность, а также митотическую стабильность природных хромосом дрожжей и рекомбинантных кольцевых мини-хромосом.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Как и ранее^{/1/}, использовались производные линий 7Ia и 7I α . Линии VP1-P7 происходят от линии 55Д-Д3019-3Б (α *leu2-3,12 ura3-160, 188 trp1*), сконструированной С.А. Булатом, и получены скрещиванием гаплоидных потомков нескольких последовательных поколений с 7Ia и 7I α , а также с производным 7Ia и 7I α , несущим мутации *argm1*^{/2/} и *argm5*^{/1/}. Рекомбинантные плазмиды на основе pBR322 YCr19(CEN4)^{/3/} и pYe(CEN11)10^{/4/} несут функциональный ген TRP1 и элемент ARS1 *S. cerevisiae*, а также последовательности CEN, указанные в названиях. Для трансформации дрожжевых клеток плазмидной ДНК использовали методику^{/5/}. Состав сред, микроманипуляции, обработка клеток бромистым этидием, определение темпа потери парных хромосом были описаны^{/2,6,7/}. Подробности определения митотической стабильности плазмид даны в сносках к табл. 4 и 5.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Спонтанная *rho*⁻-мутабельность

Прямое определение темпа спонтанных мутаций *rho*⁻ у моноспорных клонов *argm5* (табл. I) дало среднюю величину 1%. Сравнив её с ранее опубликованными данными^{/7/}, можно видеть, что мутация *argm5* снижает спонтанную *rho*⁻-мутабельность примерно в той же степени, как *argm2* и *argm3* и, по-видимому, несколько слабее, чем *argm1*. Но у клеток *argm1* темп спонтанных мутаций *rho*⁻ составляет десятки доли процента, т.е. всё ещё очень высок. Возникает вопрос, не являются ли гены SRM1 и SRM5 лишь модификаторами (хоть и довольно сильными) спонтанной *rho*⁻-мутабельности.

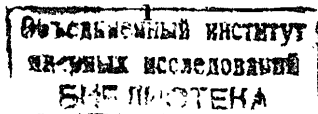


Таблица 1. Темпы спонтанных мутаций ρho^- и образования летальных секторов у гаплоидных линий strm5^*

Число изученных линий	Общее число почкований	Темпы спонтанных мутаций ρho^- , %	Темпы спонтанных летальных секторов, %
4	515	$1,0 \pm 0,4$	$3,4 \pm 0,5$

* Методика определения темпов описана ранее /7/.

Сконструировав близкородственные диплоидные линии генотипов SRM1/SRM1 SRM5/SRM5, $\text{strm1}/\text{strm1}$ SRM5/SRM5, SRM1/SRM1 $\text{strm5}/\text{strm5}$ и $\text{strm1}/\text{strm1}$ $\text{strm5}/\text{strm5}$, определили частоту спонтанных ρho^- -мутантов в культурах этих линий. Полученные данные (табл.2) показывают, что частота мутантов ρho^- среди клеток SRM+ в 500 раз выше, чем в культурах strm1 strm5 . Примерно такими же должны быть различия и соответствующих мутационных темпов. По-видимому, влияние генов SRM1 и SRM5 на спонтанную ρho^- -мутабельность следует расценивать как генетический контроль, сделав следующую оговорку. Возможно, нами выделены leaky мутации в этих генах, лишь снижающие количественно эффективность механизма спонтанного ρho^- -мутагенеза. Более вероятно, однако, что и сами механизмы ρho^- -мутагенеза у клеток strm1 и strm5 несколько отличаются друг от друга и от механизма, действующего в нормальных клетках SRM+.

Таблица 2. Частота мутантов ρho^- в рассевах диплоидных культур разных генотипов*

Генотип	Число изученных линий	Число просмотренных колоний	Частота мутантов ρho^- , %
SRM+/SRM+	4	6381	$30,3 \pm 6,1$
$\text{strm1}/\text{strm1}$ SRM5/SRM5	4	9162	$1,1 \pm 0,2$
SRM1/SRM1 $\text{strm5}/\text{strm5}$	3	4163	$3,1 \pm 0,7$
$\text{strm1}/\text{strm1}$ $\text{strm5}/\text{strm5}$	4	3755	$0,06 \pm 0,03$

* Суспендировали совместно 5-6 колоний, выращенных из отдельных клеток одной и той же линии на среде БС при 30°C в течение 5 суток инкубации. Суспензии разводили и рассевали на среду БС. Колонии подсчитывали после 6 суток инкубации при 30°C.

ρho^- -мутагенез под действием бромистого этидия (БЭ)

У моноспорных клонов из двух полных тетрад, полученных от гибрида $\text{strm5}/\text{SRM5}$, индуцировали мутации ρho^- , обрабатывая клетки БЭ. Данные, усредненные по клонам strm5 и SRM5 (рис.1), показывают, что мутация strm5 существенно снижает чувствительность клеток к мутагенному действию БЭ и в этом отношении похожа на strm1 и отличается от strm2 и strm3 /7/. Очевидно, полученный результат также говорит в пользу контроля ρho^- -мутабельности геном SRM5.

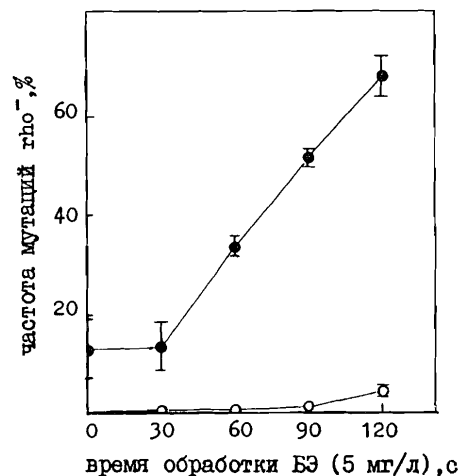


Рис.1. Зависимость выхода мутаций ρho^- от времени обработки БЭ гаплоидных клонов strm5 (—○—) и SRM+ (—●—). Для каждой из двух групп клонов частоты мутаций усреднены, представлены удвоенные стандартные ошибки.

Митотическая стабильность парных хромосом у дисомиков

В рассевах клеток strm5 с дисомией по IV хромосоме часто встречаются мозаичные колонии, возникшие вследствие утраты частью клеток одной из парных хромосом (рис.2). Темп утраты парной хромосомы в первом почковании после посева (табл.3) составляет около 2%, что примерно в 25 раз превышает соответствующую величину для дисомиков SRM+, опубликованную ранее /6/.

Как уже сообщалось /6/, мутация strm5 приводит также к заметному снижению митотической стабильности дисомиков по XIV хромосоме. Утрата парной XIV хромосомы клетками strm5 сопровождается резким увеличением скорости их размножения. Это обстоятельство, к сожалению, крайне затрудняет аккуратную оценку темпа потери хромосом.

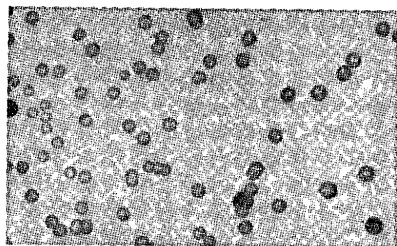


Рис.2. Колонии, образованные клетками *srm5* с дисоми-ей ($n+1$) по IV хромосоме.

Таблица 3. Темп спонтанной утраты парной IV хромосомы *srm5* мутантными дисомиками в первом почковании после посева*

Число изученных линий	Общее число просмотренных колоний	Темпы утраты хромосом $\alpha_1, \%$
8	12 887	$1,75 \pm 0,19$

* Методика определения темпа утраты хромосом описана ранее [7].

Митотическая стабильность кольцевых мини-хромосом

Трансактивность генов SRM1 и SRM5 в отношении митотической стабильности хромосом и мт генома позволяет предполагать наличие в ядерной и мт ДНК последовательностей, узнаваемых (непосредственно или опосредованно) продуктами SRM1 и SRM5 и потому, возможно, родственных.

Для идентификации таких последовательностей могли бы оказаться полезными рекомбинантные плазмиды, содержащие определенные фрагменты ДНК дрожжей. Возникает вопрос о влиянии мутаций *srm1* и *srm5* на митотическую стабильность таких плазмид.

Линии VP1 (α *ade1 SRM+ trp1 ura3*), VP2 (α *ade1 leu2 srm1 trp1 ura3*), VP3 (α *ade1 srm5 trp1 ura3*) и VP4 (α *ade1 leu2 srm1 srm5 trp1*) трансформировали ДНК кольцевых мини-хромосом (KM) YCr19(CEN4) и pYe(CEN11)10 (см. раздел "Материалы и методики"). Данные, полученные при выращивании отобранных трансформантов в неселективных условиях (табл.4), показывают, что стабильность обеих KM заметно и сходным образом варьирует в зависимости от реципиента: она наиболее высока у клеток *srm1* и минимальна у клеток *srm5*. Однако вывод о непосредственном влиянии мутаций *srm1* и *srm5* на митотическую стабильность KM был бы, очевидно, недостаточно обоснованным - не исключено, что наблюдаемые различия связаны просто с вариациями генотипического фона у линий-реципиентов.

Таблица 4. Стабильность кольцевых мини-хромосом у гаплоидных трансформантов различных генотипов*

Плазмиды	Стабильность в клетках генотипа			
	SRM+	<i>srm1</i>	<i>srm5</i>	<i>srm1 srm5</i>
YCr19(CEN4)	0,48 (4,9)**	0,72 (2,2)	0,19 (10,8)	0,28 (8,3)
pYe(CEN11)10	0,38 (6,4)	0,80 (1,5)	0,19 (10,8)	0,29 (8,2)

* На неселективной среде, обогащенной триптофаном (40 мг/л), выращивали колонии трансформантов (первичные колонии), суспендировали их поодиночке и после разведения высевали клетки вновь на неселективную среду. Выросшие вторичные колонии подсчитывали и перепечатавали на селективную среду, не содержащую триптофан. Для получения первичных колоний одного и того же генотипа использовали от 2 до 6 независимых трансформантов (по 5 первичных колоний от каждого). Суммарная численность проверенных вторичных колоний варьировала для разных генотипов от 211 до 1730. Мерой стабильности плазмид служила доля вторичных колоний Trp^+ .

** В скобках приведены величины α - темпа утраты плазмид на клеточное деление в процентах. Для оценки этой величины использовали формулу:

$$\alpha = \ln S / g \ln 2,$$

где S - доля вторичных колоний Trp^+ , g - число поколений, соответствующее размеру первичной колонии (в настоящей работе от 20 до 24).

Чтобы учесть влияние генотипического фона и вычленить эффект мутаций *srm*, целесообразно сравнивать стабильность KM в группах близкородственных линий, несущих и не несущих эти мутации. Мы оценили митотическую стабильность KM в трех группах диплоидных линий (по три линии в группе), полученных следующим образом. Трансформанты линий VP4 (см. выше), VP5 (α *ade1 leu2 srm1 srm5 trp1*) и VP6 (α *ade1 leu2 srm1 srm5 trp1 ura3*), несущие YCr19(CEN4) и pYe(CEN11)10, скрестили с уже упомянутыми линиями VP2 и VP3, а также с линией VP7 (α *ade1 leu2 SRM+ trp1*) Способность изолированных зиготических клонов спорулировать свидетельствовала об их диплоидности. Данные о митотической стабильности KM у полученных диплоидов (табл.5) хорошо коррелируют с данными табл.4 и вместе с ними свидетельствуют о вполне заметном и разнонаправленном действии мутаций *srm1* и *srm5* на митотическую стабильность KM.

Таблица 5. Стабильность кольцевых мини-хромосом в диплоидных клетках разных генотипов*

Плазмида	Стабильность в клетках генотипа			
	srn1/+ srn5/+	srn1/srn1 srn5/+	srn1/+ srn5/srn5	
YCr19(CEN4)	0,73 ± 0,10 (I50)	0,88 ± 0,02 (I80)	0,23 ± 0,09 (I72)	
pYe(CEN11)10	0,67 ± 0,06 (I63)	0,82 ± 0,03 (I54)	0,36 ± 0,07 (I71)	

* Клетки из двухсуточных клональных культур, выращенных на полноценной среде ЕС, с помощью микроманипулятора изолировали на поверхности ЕС и инкубировали 4 сут при 30°C. Клетки из образовавшихся колоний переносили на среду, не содержащую триптофан. Мерой стабильности плазмиды служила доля колоний Trp⁺.

** В скобках приведены суммарные численности тестированных колоний.

Известны два типа генотипических изменений, влияющих на стабильность природных хромосом дрожжей /8,9/: 1) мутации, одновременно сильно снижающие митотическую стабильность хромосом и КМ вследствие нарушения ответственных стадий клеточного цикла и, возможно, функционирования центромер, и 2) мутации, снижающие стабильность хромосом и не влияющие сколько-нибудь заметно на стабильность КМ. Мутации, подобно *srn1* и *srn5* резко снижающие митотическую стабильность хромосом у дисомиков и умеренно влияющие на стабильность КМ, ранее не описаны.

По предварительным данным мутация *srn5* снижает митотическую стабильность не только КМ, но и плазмид, не содержащих центромерных последовательностей. Поэтому можно предположить, что продукт SRM5 необходим для обеспечения полноценной активности элемента ARS1. Мутации, снижающие митотическую стабильность КМ за счёт ослабления ARS-функций, были описаны /10/, однако авторам не удалось обнаружить влияния этих мутаций на стабильность хромосом, и ничего не сообщалось относительно их действия на *rho*⁻-стабильность. Заметим, кстати, что в мт ДНК дрожжей выявлены многочисленные ARS-последовательности /11/.

Возможно, ARS-последовательности у *Saccharomyces cerevisiae* служат структурными элементами общего механизма контроля митотической стабильности различных (ядерных и митохондриальных, природных и рекомбинантных) генофоров. Мутации *srn1* и *srn5*, казалось бы, оказывают на стабильность хромосом действие, противоположное их влиянию на стабильность мт генома. Однако повышение стабильности нормального мт генома, вызванное этими мутациями, возможно, отражает относительное снижение стабильности генетических мт плазмид, образующихся при рекомбинации т.н. эксцизионных последовательностей /12/ и вытесняющих нормальную мт ДНК в ходе *rho*⁻-мутационеза.

Сравнительный анализ секвенированных ARS-элементов /13/ выявил наличие единственного консенсуса: 5' - $\overline{\text{TTTATATTTT}}_{\text{A}}$ -3'. Повреждение структуры соответствующего core-элемента приводит к утрате ARS-активности, вероятно, вследствие нарушения специфического взаимодействия с определенным клеточным белком /14-16/. Помимо core-элемента, необходимым, но не достаточным для ARS-активности, в обеспечении последней принимают заметное участие последовательности, фланкирующие core /14-19/. Эти последовательности, вероятно, также взаимодействуют с клеточными белками, однако менее специфично, чем core-элемент /16/. Можно констатировать, что молекулярные механизмы, связанные с ARS-активностью, в настоящее время понятны далеко не полностью. В связи с этим представляется целесообразным дальнейший анализ влияния генов SRM1 и SRM5 на митотическую стабильность плазмид, содержащих различные, в том числе и мутационно модифицированные, последовательности ARS.

Авторы приносят благодарность В.И. Корогодину, И.А. Захарову, И.П. Арман за критическое прочтение рукописи, Г.И. Поповой за техническую помощь.

ЛИТЕРАТУРА

1. Девин А.Б., Просвилова Т.Ю. - В кн.: VI Всесоюз. симп. "Мол. мех. ген. процессов", М., Институт общей генетики АН СССР, 1987, с.160.
2. Девин А.Б., Колтовая Н.А. - Генетика, 1986, т.22, №9, с.2244.
3. Stinchcomb D., Mann C., Davis R.W. - J. Molec. Biol., 1982, v.158, №1, p.157.
4. Fitzgerald-Hayes M., Buhler J.M., Cooper T.G., Carbon J. - Molec. Cell. Biol., 1982, v.2, №1, p.82.
5. Ito H., Fukuda Y., Murata K., Kimura A. - J. Bacteriol., 1983, v.153, №1, p.163.
6. Девин А.Б., Колтовая Н.А., Черёмухина Н.И. - Генетика, 1986, т.22, №10, с.2408.
7. Девин А.Б., Колтовая Н.А. - Генетика, 1986, т.22, №12, с.2768.
8. Larionov V.L. et al. - Curr. Genet., 1987, v.11, p.435.
9. Куприна Н.Ю., Пашкина О.Б., Цуладзе А.М., Ларионов В.Л. - Докл. АН СССР, 1987, т.292, №3, с.734.
10. Maine G.T., Sinha P., Tye B.-K. - Genetics, 1984, v.106, №2, p.365.
11. Hуman B.C., Cramer J.M., Rownd R.H. - Gene, 1983, v.26, №2, p.223.
12. Gaillard C., Strauss F., Bernardi G. - Nature, 1980, v.283, №5743, p.218.
13. Williamson D.H. - Yeast, 1985, v.1, №1, p.1.
14. Celnicko S.E., Sweder K., Srienс F., Bailey J.E., Campbell J.L. - Molec. cell. Biol., 1984, v.4, № 11, p.2455.

15. Kearsey S.—Cell, 1984, v.37, №2, p.299.
16. Bouton A.H., Smith M.M.—Molec.Cell.Biol., 1986, v.6, №7, p.2354.
17. Koshland D., Kent I.C., Hartwell L.H.—Cell, 1985, v.20, №2, p.393.
18. Srienc F., Bailey J.E., Campbell J.L.—Molec.Cell.Biol., 1985, v.5, №7, p.1676.
19. Snyder M., Buchman A.R., Davis R.W.—Nature, 1986, v.324, №6042, p.87.

Рукопись поступила в издательский отдел
22 июля 1987 года.

Колтовая Н.А. и др. P19-87-575
Генетический анализ митохондриальной rho⁻-мутабельности у дрожжей сахаромецетов. Сообщение VI. Количественные характеристики влияния мутации srm5 на митотическую стабильность природных и рекомбинантных генетических структур

Мутация srm5 снижает на порядок темп спонтанных мутаций rho⁻ у гаплоидных клеток дрожжей. Частота мутантов rho⁻ в 500 раз ниже в культурах гомозигот srm1/srm1 srm5/srm5 сравнительно с нормальными диплоидными клетками SRM+/SRM+. Мутация srm5 примерно в 25 раз повышает темп спонтанной потери парных IV хромосом дисомиками. У гаплоидных трансформантов srm1 srm5 темп спонтанной потери рекомбинантных кольцевых минихромосом примерно в 4 раза выше, чем у трансформантов srm1 SRM5. Полученные данные свидетельствуют о существовании у дрожжей общего генетического контроля митотической стабильности митохондриальных и ядерных наследственных структур, возможно, опосредованного через последовательности ARS.

Работа выполнена в Лаборатории ядерных проблем ОИЯИ.

Препринт Объединенного института ядерных исследований. Дубна 1987

Перевод О.С.Виноградовой

Koltovaya N.A. et al. P19-87-575
Genetic Analysis of the Mitochondrial rho⁻-mutability in Saccharomyces Cerevisiae. Quantitative Characterization of the Mitotic Stability of Natural and Recombinant Genetic Structures as Influenced by the srm5 mutation

The srm5 mutation diminishes the spontaneous rho⁻-mutation rate by an order of magnitude. The rho⁻ mutant frequencies are 500 times lower in the cultures of srm1/srm1 srm5/srm5 homozygous cells as compared with those of the normal SRM+/SRM+ diploids. The rate of spontaneous extra chromosome IV loss is about 25 times higher in the srm5 disomes as compared with SRM+ ones. The haploid srm1 srm5 transformants loose the recombinant circular minichromosomes spontaneously about 4 times more frequently than the srm1 SRM5 cells. The data presented suggest a general control of mitotic stability of different (mitochondrial and nuclear, natural as well as recombinant) genetic structures in Sacch. cerevisiae. Autonomously replicating sequences (ARS elements) seem to be involved in this mechanism. ●

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

Preprint of the Joint Institute for Nuclear Research. Dubna 1987