

**ОБЪЕДИНЕННЫЙ
ИНСТИТУТ
ЯДЕРНЫХ
ИССЛЕДОВАНИЙ
ДУБНА**

У 446

P19-88-333

А.И.Чепурной, Н.Михова-Ценова

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

Направлено в журнал "Генетика"

1988

ВВЕДЕНИЕ

В работах /1-4/ сообщалось о зависимости частоты спонтанного ревертирования ауксотрофных по аденину мутантов *Saccharomyces cerevisiae* от содержания аденина в питательной среде. Проблема спонтанного мутагенеза, несмотря на давность своего существования, крайне мало изучена и поэтому обнаружение зависимости спонтанного мутирования от каких-либо факторов представляется всегда интересным и обнадеживающим в плане приближения к пониманию причин и механизмов этого явления.

В дополнение к гипотезе о дисбалансе предшественников ДНК, которая распространена для случая тиминового голодания и уже нашла экспериментальное подтверждение в опытах *in vitro* /5/, авторы /4/ предложили следующее объяснение наблюдаемому феномену. Предполагается, что из-за недостатка аденина в среде может происходить активация мутантного гена *ade2*, и как следствие более активной работы гена - повышенный спонтанный мутагенез на этом участке ДНК. Нам представляется возможным разделить эти две гипотезы, если их проверку проводить на генах, активность которых можно менять в эксперименте, причем эти гены не должны участвовать в синтезе предшественников ДНК и, следовательно, влиять на их дисбаланс. В отличие от гена *ADE2*, об активности которого в литературе данных нет, у *Saccharomyces cerevisiae* известно довольно большое число генов, активность которых зависит от различных факторов и метаболитов /6/. Так, активность гена *LEU2* зависит от содержания лейцина в среде /7/; при больших концентрациях ген репрессируется, при малых - активируется. В работе /6/ описано изменение активности гена *LEU2* в 39 раз в зависимости от содержания в среде лейцина и треонина. Активность гена *LYS2* также может меняться. В литературе описано изменение его активности в 7 раз при добавлении в питательную среду 3-Амино-1,2,4-Триазола (ЗАТ) /8/.

В настоящей работе представлены результаты экспериментов по оценкам частот спонтанного мутирования этих генов в зависимости от факторов, влияющих на их активность.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

В работе использовались гаплоидные штаммы дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* NA3-24 (a *leu2-1 lys1-1*) и S288C (c). Оба штамма использовались нами ранее в работе /9/. Дрожжи высевали методом упорядоченного посева на поверхность твердой питательной среды, покрытой ядерными фильтрами. На одну чашку наносилось 220 инокулюмов. В каждом инокулюме содержалось около $2 \cdot 10^2$ клеток. Инокулированные таким образом клетки выращивали при 30°C. По истечении необходимого времени несколько десятков колоний ресуспендировали в воде для микроскопирования в камере Горяева с целью определения количества клеток в одной колонии. Остальные колонии вместе с фильтрами переносили на селективные среды для учета реверсов по лейцину и лизину (при работе со штаммом NA3-24) или мутантов по гену *LYS2* (при работе со штаммом S288C), которые хорошо выявляются на селективной среде в виде колоний вторичного роста.

В качестве ростовых питательных сред для клеток штамма NA3-24 использовали среду M_3 /10/ с добавками лизина (30 мкг/мл) и лейцина (0,3; 2; 3; 20; 30 и 300 мкг/мл). Для клеток штамма S288C - M_3 и M_3 с ЗАТ (10 мм). В качестве селективных сред использовали: для выявления реверсов по лейцину - среду M_3 с лизином, реверсов по лизину - среду M_3 с лейцином, мутантов по гену *LYS2* - среду с аминокислотой в качестве источника азота /11/.

Количественную оценку мутантов в культуре в момент переноса клеток на селективную среду производили по их числу в первой волне кривой выявления по методике, подробно описанной ранее /9/.

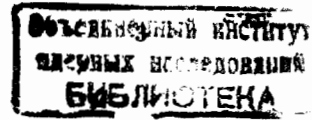
Расчет частоты мутирования производили по стандартной для флукуационного теста формуле $R = 1/n \cdot \ln N/N_0$, где n - число клеток в одной колонии, N - число колоний, N_0 - число колоний без мутантов.

Для определения спектра мутаций у клеток штамма NA3-24 все проявившиеся реверсы проверяли на способность расти на среде M_3 . Аллели *leu2-1* и *lys1-1*, как известно /12,13/, являются ochre-супрессибельными, поэтому если реверс проявлял способность расти на среде без лейцина и лизина, его относили к группе супрессорных (S), если же реверс был неспособен расти на M_3 , то его относили к группе локусных (L) реверсий.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

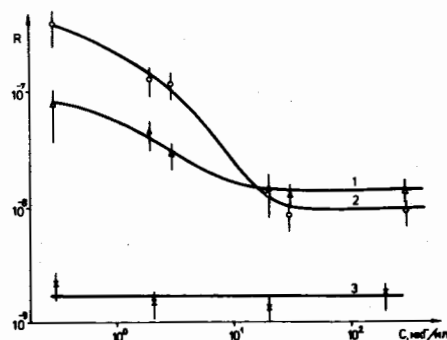
Результаты четырех серий опытов по спонтанному ревертированию мутантов NA3-24 при культивировании их на средах с разным содержанием лейцина представлены на рис.1.

Как следует из полученных данных, частоты возникновения спонтанных реверсов как локусного, так и супрессорного типа по гену *leu2*



значительно возрастают при уменьшении содержания лейцина в среде. Частота же образования спонтанных реверсов локусного типа по гену *lys1* оставалась постоянной в исследованном диапазоне концентраций лейцина.

Рис. I. Частоты спонтанного ревертирования клеток штамма NA3-24 при культивировании их на средах с разным содержанием лейцина: 1 и 2 - реверсии по гену *leu2* S- и L-типов соответственно; 3 - реверсии L-типа по гену *lys1*.



Результаты одного из трёх опытов с триазолом приведены в таблице, где *n* - число клеток в одной колонии, *N* - число теотированных колоний, *M* - число колоний с мутантами по гену *LYS2*, *R* - частота мутирования (мутантов на клетку на деление).

Таблица. Данные по частотам возникновения спонтанных мутантов по гену *LYS2* в клетках штамма S288C при культивировании их на средах с и без ЗАТ

Среда	<i>n</i> , · 10 ⁶	<i>N</i>	<i>M</i>	<i>R</i> , · 10 ⁻⁷
<i>M</i> ₃	4,5 ± 0,5	240	158	2,4 ± 0,4
<i>M</i> ₃ + ЗАТ	3,0 ± 0,3	240	127	2,5 ± 0,4

Два других опыта, выполненные при других значениях *n*, дали точно такие же частоты мутирования. Как следует из этих данных, добавление в ростовую питательную среду ЗАТ не влияет на частоту спонтанного мутирования гена *LYS2*.

ОБСУЖДЕНИЕ

Представленные на рис. I данные свидетельствуют о сильной зависимости частоты возникновения спонтанных реверсов по гену *leu2* от содержания в среде лейцина. В большей степени эта зависимость выражена для реверсов L-типа, в меньшей - для S. При этом частота образования спон-

танных реверсов L-типа по гену *lys1* оставалась постоянной в исследованном диапазоне концентраций лейцина. Наличие этих зависимостей находится в соответствии с гипотезой о повышенном мутагенезе на участках ДНК, работающих более активно /4/, поскольку при уменьшении в среде лейцина действительно происходит активация гена *LEU2* на уровне транскрипции /7/. Мутация же в локусе *leu2-1* на регуляции гена не сказывается. В рамках этой гипотезы постоянство частоты образования реверсов L-типа по гену *lys1* может быть объяснено независимостью активности *lys1* гена от содержания в среде лейцина.

Однако постоянство частоты мутирования гена *LYS2* при разных уровнях его активности (см. табл.) ставит под сомнение правильность предположения о зависимости частоты мутирования генов от их функциональной активности, хотя и не исключает его полностью в силу того обстоятельства, что твердо ещё не известно, на каком уровне - трансляционном или транскрипционном - происходит активация при добавлении в среду ЗАТ.

Зависимость частоты ревертирования гена *leu2* от содержания в среде лейцина свидетельствует о том, что дисбаланс предшественников ДНК, который в нашем случае не создается, не является единственным и достаточным объяснением повышенного спонтанного мутирования генов у микроорганизмов, возможно, даже в случаях тиминового или аденинового голодания. Возможно наличие и других механизмов, поиск и проверка которых может открыть путь к решению проблемы спонтанного мутирования генов.

Авторы благодарят В.И.Корогодина и Ч.Файси за помощь и интерес к работе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ильина В.Л., Корогодина В.И., Файси Ч. - Генетика. 1985. т. XXI. № 10. с. 1643-1649.
2. Ilyna V.L., Korogodin V.I., Fajsi Cs. - Mutation Research. 1986 v. 174. p. 189-194.
3. Ильина В.Л., Корогодина В.И. - Генетика. 1987. т. XXIII. № 4. с. 630-636.
4. Ильина В.Л., Корогодина В.И., Файси Ч. - Генетика. 1987. т. XXIII. № 4. с. 637-642.
5. Haynes R.H. - In: F.J.de Serres (Ed.) "Genetic Consequences of Nucleotide Pool Imbalance". Plenum. New York. 1985. p. 1-23.
6. Jones E.W. and Fink G.R. - In: "The molecular biology of the yeast *Saccharomyces*. Metabolism and Gen Expression". By Cold Spring Harbor Laboratory. 1982. p. 181-300.

7. Andreadis A., Yun-Pung Hsu, Hermodson M., Kohlhan G., Schimmel P. - The Journal of Biological Chemistry. 1984. v.259. N.13. p.8059-8061.
8. Wolfner M., Yep D., Messenguy F., Fink G.R. - J.Mol.Biol. 1975. v.96. p.273-290.
9. Чепурной А.И., Михова-Ценова Н. - Препринт ОИЯИ Р19-87-563. Дубна. 1987.
10. Захаров И.А., Кожин С.А., Кожина Т.Н., Фёдорова И.В. Сборник методик по генетике дрожжей-сахаромицетов. Л.: Наука. 1984. 144с.
11. Chattoo B.B., Sherman F. e.a. - Genetics. 1979. v.93. p.51.
12. Lawrence C.W. - Advances in Genetics. 1982. v.21. p.173-254.
13. Gilmor R.A. - Genetics. 1967. v.56. p.641-658.

Рукопись поступила в издательский отдел
13 мая 1988 года.

Чепурной А.И., Михова-Ценова Н. P19-88-333
Влияние содержания лейцина в питательной
среде на частоту возникновения реверсов
у гаплоидных дрожжей

Установлено, что уменьшение содержания лейцина в питательной среде с 30 мкг/мл до 0,3 мкг/мл приводит к возрастанию частоты образования спонтанных реверсов по гену *leu2* в культивируемых на поверхности этих сред клеток штамма NA3-24 *Saccharomyces cerevisiae* более чем в 20 раз. Увеличение частоты спонтанного мутирования происходит в основном за счет реверсов локусного типа. Частота образования реверсов локусного типа по гену *lys1* в этих же экспериментах не зависела от содержания в среде лейцина и оставалась на уровне $\sim 2 \cdot 10^{-9}$.

Работа выполнена в Лаборатории ядерных проблем ОИЯИ.

Препринт Объединенного института ядерных исследований. Дубна 1988

Перевод авторов

Chepurnoy A.I., Michova-Tsenova N. P19-88-333
Effects of Leucine Concentration
in the Medium on the Frequency
of Reversion in Haploid Yeasts

It is established that the frequency of spontaneous of the *leu2* gene in *Saccharomyces cerevisiae* strain NA3-24 increases more than 2+ times when the cells are cultivated on the culture medium with different concentrations of leucine from 30 mkg/ml to 0,3 mkg/ml. Mainly it occurs as result of increasing the frequency of locus-type reversions. In these experiments the frequency of locus-type reversions of the *lys1* gene was constantly of about $2 \cdot 10^{-9}$.

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

Preprint of the Joint Institute for Nuclear Research. Dubna 1988