

ОБЪЕДИНЕННЫЙ
ИНСТИТУТ
ЯДЕРНЫХ
ИССЛЕДОВАНИЙ
ДУБНА

У 446

P19-88-339

А.И.Чепурной, Н.Михова-Ценова, Х.Брунцкова

**ЗАВИСИМОСТЬ
СПОНТАННОГО МУТИРОВАНИЯ ГЕНА *leu2*
У *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*
ОТ ФАЗЫ РОСТА И ФАЗЫ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА**

Направлено в журнал "Генетика"

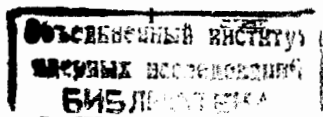
1988

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время общепринятой является точка зрения, по которой спонтанные мутации возникают во время репликации, репарации и рекомбинации ДНК как ошибки, допускаемые ферментами, участвующими в этих процессах ^{/1/}. Предполагается, а на самом деле постулируется наличие в клетках "первичных спонтанных повреждений в ДНК", преобразующихся в последующем с какой-то вероятностью в спонтанные мутации при участии трех упомянутых процессов.

Обычно применяемые для оценки мутабельности микроорганизмов методики ^{/2,3/} позволяют учитывать частоты мутирования, усредненные по всему периоду развития культуры — от лаг-фазы до стационарной фазы роста. Несмотря на большое количество работ, посвященных проблемам мутагенеза у дрожжей, вопрос о мутировании в разных фазах роста культуры остался в стороне и до сих пор не исследован, как и вопрос о мутировании клеток в разных фазах клеточного цикла. Хотя именно эта информация в первую очередь может пролить свет на причастность трех процессов, связанных с синтезом ДНК, — репликации, репарации, рекомбинации — к образованию мутаций и дать первичные данные о вкладе и роли каждого из этих процессов в мутирование клеток. Действительно, в гаплоидных клетках ошибки репликации должны приводить к образованию мутантов в S-фазе клеточного цикла, ошибки рекомбинации — в S и G₂. Оценка вклада в мутагенез разных процессов произведена только в одной работе ^{/4/}, где, по расчетам авторов, доля спонтанных мутаций репарационного происхождения должна составлять не менее 90% от всех мутаций.

В настоящей работе представлены результаты исследований по образованию спонтанных мутаций в разных фазах роста и клеточного цикла гаплоидных дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*; результаты проверки возможности накопления в клетках премутационных повреждений, служащих субстратом для образования спонтанных мутаций; обсуждается возможное участие трех процессов, связанных с синтезом ДНК, в формировании спонтанных мутаций. Отметим, что проведение настоящих исследований оказалось возможным благодаря появлению корректной методики, подробно описанной в работах ^{/5/} и ^{/6/}.



МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

В работе использовали гаплоидные дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* штамм NA3-24 (а *leu2-1 lys 1-1 rad*) /6/. В качестве мутантов наблюдались реверсы по гену *leu2*.

Суспензию дрожжей методом упорядоченного посева (220 колоний на чашку) рассеивали на агаризованную питательную среду M_3 /2/ с добавками лейцина и лизина (30 мг/мл), покрытую лавсановыми ядерными фильтрами. Варьируя концентрацию клеток в суспензии, из которой производили посев дрожжей, изменяли количество клеток в инокулятах в зависимости от задачи опыта от $1,2 \cdot 10^3$ до $3,7 \cdot 10^5$.

Инокулированные клетки в течение опытов выращивали при 30°C. В требуемое время несколько десятков колоний ресуспендировали в воде для определения общего количества клеток в одной колонии (путем микрокопирования суспензии в камере Горяева) и числа жизнеспособных клеток (по количеству выросших колоний при посеве соответствующего разведения суспензии на богатую агаризованную среду II /2/). В то же время необходимое для дальнейшей статистической обработки количество колоний вместе с фильтрами переносили на селективную среду M_3 с лизином для выявления реверсов по гену *leu2*. На селективной среде ежедневно производили учет реверсов, образующих видимые глазом колонии вторичного роста. Оценку количества реверсов в момент переноса клеток на селективную среду производили по их числу в "первой волне" выявления /6/.

Частоту спонтанного мутирования рассчитывали по стандартной для флуктуационного теста формуле $R = 1/n \ln N/N_0$, где n - число клеток в одной колонии, N - число колоний, использованных для оценки количества мутантов в культуре, N_0 - число колоний без мутантов из выборки N .

Синхронизацию клеток производили по методу Вильямсона и Скоупса /7/.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Образование спонтанных реверсов в разных фазах роста культур

В табл. I представлены данные двух опытов по определению частот спонтанного мутирования клеток в лаг-фазе и первом после лаг-фазы делении клеток. В этих опытах использовали двухсуточную культуру клеток. При посеве брали густую ($\sim 10^9$ клеток в мл) суспензию с целью получения достаточного для статистической обработки количества мутантов. При таком густом посеве, естественно, большое количество реверсов было занесено изначально. В таблице: t - время с момента посева клеток на питательную среду, n - число клеток в одной колонии, N - число тестируемых колоний, M - число колоний с реверсами из выборки N , R - частота мутирования на клетку на деление.

Таблица I Спонтанное ревертирование гена *leu2* в клетках штамма NA3-24 в лаг-фазе и первом после лаг-фазы делении клеток

Опыт	t, час	n, $\cdot 10^5$	N	M	R, $\cdot 10^{-8}$
I	0	$2,7 \pm 0,3$	4400	78	-
	2	$2,4 \pm 0,3$	4400	70	-
	4	$5,5 \pm 0,6$	2200	55	$2,8 \pm 0,7$
II	0	$3,8 \pm 0,4$	4400	74	-
	2	$3,5 \pm 0,4$	4400	62	-
	4	$8,5 \pm 0,9$	1320	35	$2,6 \pm 0,7$

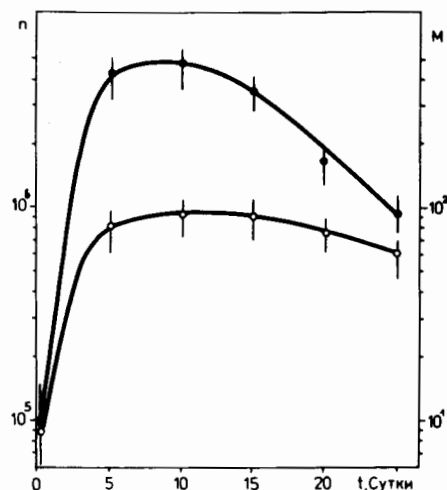
Результаты типичного опыта по определению спонтанной мутабельности во время экспоненциальной фазы роста культуры представлены в табл. 2. Суточная культура клеток рассеивалась на питательную среду с $n \sim 1,2 \cdot 10^3$ клеток в каждом инокуляте. В течение времени экспоненциального роста культуры определялось содержание мутантов и частота мутирования за интервал времени.

Таблица 2 Спонтанное мутирование гена *leu2* в клетках штамма NA3-24 в экспоненциальной фазе роста

t, час	n	N	M	R(Δt), $\cdot 10^{-8}$
0	$1,2 \cdot 10^3$	880	0	-
18	$1,9 \cdot 10^5$	8800	23	$1,4 \pm 0,5$
22	$7,0 \cdot 10^5$	4400	48	$1,6 \pm 0,5$
24	$1,2 \cdot 10^6$	1760	36	$1,7 \pm 0,6$
29	$5,0 \cdot 10^6$	880	59	$1,4 \pm 0,6$

Данные по спонтанному мутированию клеток в стационарной фазе приведены на рис. I. Суточную культуру клеток рассеивали на питательную среду с $n \sim 1 \cdot 10^5$ клеток в инокуляте. Культивирование клеток продолжалось 25 суток. Количество мутантов оценивали в выборках из 880 колоний.

Рис.1. Число клеток в одной колонии n (●) и количество колоний M с реверсами в 880 колониях (○) клеток штамма NA3-24 при культивировании их на твердой питательной среде.



Образование спонтанных мутантов в разных фазах клеточного цикла

На рис.2 представлены данные типичного опыта по определению содержания спонтанных реверсов по гену *leu2* в синхронизированной культуре в течение клеточного цикла при культивировании клеток штамма NA3-24 на среде M_3 с добавками лейцина и лизина по 30 мкг/мл. Эти данные свидетельствуют об отсутствии возникновения реверсов в течение G_1 -фазы клеточного цикла. Образование регистрируемых спонтанных мутантов совпадает по времени с фазой репликации ДНК, о наступлении которой свидетельствует появление у клеток культуры почек ^{/8/}.

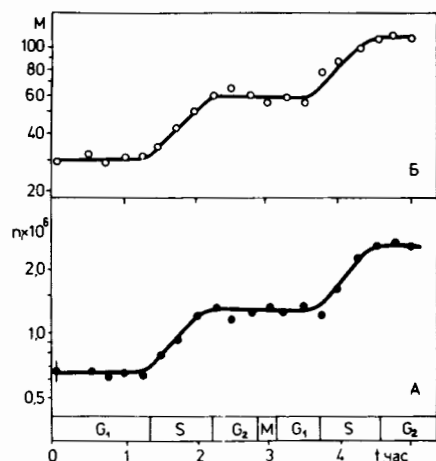


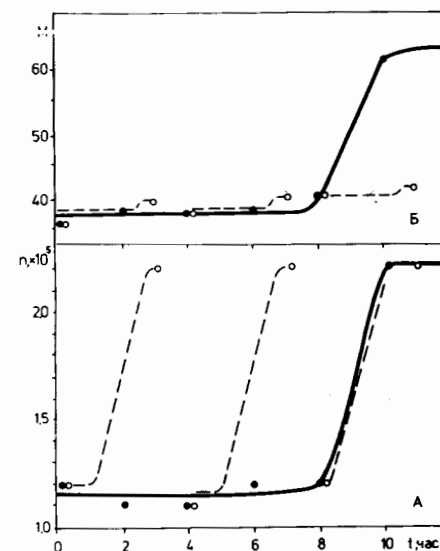
Рис.2. Количество клеток и почек в одной колонии (А) и колоний со спонтанными реверсами по гену *leu2* в выборках из $N = 2000$ (Б) в синхронизированной культуре клеток штамма NA3-24.

Ранее нами было показано ^{/9/}, что культивирование клеток на среде с пониженным до 3 мкг/мл содержанием лейцина сопровождалось увеличением частоты спонтанного ревертирования. В опытах с синхронизированной культурой мы также получили более высокую по сравнению с культивированием на среде с 30 мкг/мл лейцина частоту мутирования на клетку на деление. Характер кривых $n(t)$ и $M(t)$ свидетельствовал о том, что и в случае культивирования синхронизированных клеток на среде с 3 мкг/мл лейцина образование спонтанных реверсов совпадало по времени с фазой синтеза ДНК. Рост клеток на среде с пониженным содержанием лейцина характеризовался удлинением клеточного цикла до 10 часов на генерацию. Такое удлинение происходит за счет изменения длительности G_1 -фазы ^{/10/}. Можно предположить, что возрастание частоты мутирования происходит за счет накопления в удлинённой G_1 -фазе большего количества премутационных или "первичных спонтанных повреждений в ДНК" с последующей реализацией их в мутации во время репликации ДНК.

С целью проверки этого предположения о накоплении спонтанных премутационных повреждений во время G_1 -фазы, был поставлен следующий эксперимент. Часть колоний со среды с 3 мкг/мл лейцина в разные моменты времени G_1 -фазы переносили на среду с нормальным содержанием лейцина 30 мкг/мл, где клетки делились через 2-3 часа после переноса. Соответственно до и после деления определяли количество мутантов и расчи-

Рис.3. Данные по проверке гипотезы о накоплении спонтанных премутационных состояний во время G_1 -фазы клеточного цикла.

А - количество клеток с почками в одной колонии на средах с пониженным (●) и после переноса их на среду с нормальным (○) содержанием лейцина.
Б - количество колоний со спонтанными реверсами в выборках из $N = 1100$.



тывали частоту мутирования на клетку на генерацию. Если премутационные повреждения накапливаются в клетке, то в культурах, перенесенных на среду с 30 мкг/мл лейцина позже, после деления клеток мы вправе ожидать большее количество реверсов. Результаты представлены на рис.3.

Полученные в этих опытах данные свидетельствуют об отсутствии накопления в G_1 спонтанных премутационных повреждений. Очень показателен последний перенос - клетки на среде с 3 мкг/мл лейцина уже практически достигли S-фазы: перенесенные на среду с 30 мкг/мл лейцина и неперенесенные поделались одновременно, однако количество мутантов в них существенно различалось. Если бы в G_1 происходило накопление премутационных повреждений, а в S-фазе они закреплялись в мутациях, тогда количество мутантов в обеих группах совпадало бы. Однако этого не наблюдается.

ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты опытов, приведенные в табл.1, свидетельствуют об отсутствии спонтанного мутирования клеток в лаг-фазе. Первое после лаг-фазы деление сопровождается такой же, в пределах ошибки экспериментов, частотой мутирования, что и в экспоненциальной и ранней стационарной фазах роста культуры $R \sim (2,7 \pm 0,4) \cdot 10^{-8}$.

Данные, приведенные в табл.2, демонстрируют постоянство частоты спонтанного ревертирования на клетку на деление в течение экспоненциального роста культуры $R \sim (1,6 \pm 0,6) \cdot 10^{-8}$.

Расчет частоты спонтанного мутирования в интервалах 0-5 и 5-10 дней культивирования по данным, представленным на рис.1, также дал одинаковую частоту мутирования $R \sim (2,4 \pm 0,6) \cdot 10^{-8}$ мутантов на клетку на деление для обоих интервалов, включающих в себя экспоненциальную и раннюю стационарную фазы роста. Далее в культуре снижалось содержание жизнеспособных клеток, как исходных, так и реверсов, в силу естественной гибели клеток на истощенной среде, лишенной необходимых для роста метаболитов.

Из результатов описанных опытов следует, что в условиях, благоприятных для роста клеток, спонтанные реверсы по гену *leu2* образуются с постоянной, не зависящей от фазы роста, частотой $r = (2,2 \pm 0,6) \cdot 10^{-8}$ реверсов на клетку на деление.

Результаты проведенной работы позволяют сделать некоторые выводы. Во-первых, что образование спонтанных реверсов по гену *leu2* у клеток штамма NA3-24 происходит во время репликации ДНК. В отсутствие репликации ДНК в лаг-периоде, в стационарной фазе роста, в G_1 -фазе клеточного цикла, с точностью до чувствительности использованной методики, в культуре клеток не регистрируется появление мутантов.

Последнее обстоятельство позволяет поставить под сомнение участие процессов репарации в образовании спонтанных мутаций. Мнение же об участии репарации в формировании спонтанных мутаций, на наш взгляд, недостаточно обосновано. Оно основано на экспериментальном факте повышения частоты спонтанного мутирования генов у дефектных по репарации штаммов и двух гипотезах: гипотезы о существовании первичных спонтанных повреждений в ДНК и гипотезы каналирования этих повреждений в случае блокирования одного из путей репарации в другие ^{/4/}. Мутации по репарационным системам проявляют плейотропный эффект, но никто не изучал влияния мутаций по репарации на протекание в клетке других процессов, той же репликации, во время которой как раз и образовывались в наших опытах спонтанные мутанты. Возможно допустить, что нарушение нормального протекания репликации из-за плейотропного действия мутаций по репарации может вызвать повышение частоты образования спонтанных мутаций. Тогда отпадает необходимость гипотез о первичных спонтанных повреждениях, тем более, что отсутствие накопления их в клетках в G_1 -фазе связано, скорее всего, с отсутствием таковых вообще. Конечно, полностью исключить репарацию из рассмотрения нельзя, поскольку, как стало недавно известно, не все типы репарации функционируют в клетке на протяжении всего клеточного цикла. Так, работа эксцизионной репарации может быть привязана к определенной стадии клеточного цикла ^{/11/}, а именно - к S-фазе, где мы как раз наблюдали возникновение спонтанных мутантов.

На основании наших опытов мы можем утверждать, что, по крайней мере, G_1 -репарационные процессы в спонтанном мутагенезе не участвуют.

Из известных на сегодняшний день представлений о рекомбинационных механизмах легко представить рекомбинацию в качестве источника спонтанных мутаций. Легко в случае прямых мутаций, гораздо труднее - в случае образования спонтанных реверсов локусного типа, которые встречаются среди реверсов в значительном количестве ^{/9/}. Литературные данные ^{/12,13/} об участии процессов рекомбинации в спонтанном мутагенезе у дрожжей крайне малочисленны и свидетельствуют только о наличии общих генов, контролируемых в клетках и рекомбинацию и спонтанное мутирование ^{/14/}, но не о прямом участии рекомбинации в образовании спонтанных мутаций.

Таким образом, если наш штамм не является исключением, то следует заключить, что у дрожжей отсутствует накопление первичных спонтанных повреждений ДНК; спонтанные мутации образуются в S-фазе клеточного цикла, по-видимому, в результате ошибок репликации ДНК. В отсутствие репликации ДНК спонтанных мутантов не образуется.

Авторы благодарят проф. В.И.Корогодина и Ч.Файси за проявленное внимание, интерес и помощь в работе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Захаров И.А., Ковальцова С.В., Кожина Т.Н., Федорова И.В., Яровой Б.Ф. Мутационный процесс у грибов. Л.: Наука. 1980. 287с.
2. Von Borstel R.S. - In: Methods in cell biology. v.XX. New York. Acad. Press. 1978. P.1-20.
3. Захаров И.А., Кожин С.А., Кожина Т.Н., Федорова И.В. Сборник методик по генетике дрожжей-сахаромицетов. Л.: Наука. 1984. 144с.
4. Brychcy T., Borstel R.S. von. - Mut.Res. 1977. v.45. P.185-194.
5. Ильина В.Л., Корогодин В.И. - Генетика. 1987. т.XXIII. № 4. С.630.
6. Чепурной А.И., Михова-Ценова Н. - Препринт ОИЯИ Р19-87-563. Дубна, 1987.
7. Williamson D.H. and Scores A.W. - Nature. 1962. v.193. P.256-257.
8. Williamson D.H. - J.Cell.Biol. 1965. v.25. P.517-528.
9. Чепурной А.И., Михова-Ценова Н. - Препринт ОИЯИ Р19-88-333. Дубна, 1988.
10. Иванов В.Н., Угодчиков Г.А. Клеточный цикл микроорганизмов и гетерогенность их популяций. Киев: Наук.думка. 1984. 280с.
11. Ахмедов А.Т., Кабоев О.К., Беккер М.Л. - ДАН. 1986. т.291(2). С.463.
12. Magni G.E. - J.Cell.Comp.Physiol. 1964. v.64. Suppl.1. P.165-172.
13. Esposito M.S., Bolotin-Fukuhara M., Esposito R.E. - Molec.Gen.Genet. 1975. v.139. P.9-18.
14. Golin J.E. and Esposito M.S. - Molec.Gen.Genet. 1977, v.150, p.125-135.

Рукопись поступила в издательский отдел
16 мая 1988 года.

Чепурной А.И., Михова-Ценова Н., Брунцкова Х. P19-88-339
Зависимость спонтанного мутирования гена leu2
у *Saccharomyces cerevisiae* от фазы роста и
фазы клеточного цикла

Полученные в работе данные свидетельствуют об образовании спонтанных мутантов у *Saccharomyces cerevisiae* во время репликации ДНК. В отсутствие репликации ДНК в лаг-периоде, стационарной фазе роста, в G1-фазе клеточного цикла спонтанных мутантов в культуре клеток не возникает. Экспериментально показано отсутствие накопления в клетках первичных спонтанных повреждений ДНК в G1-фазе. Спонтанные мутации у дрожжей образуются в S-фазе клеточного цикла, по-видимому, в результате ошибок репликации ДНК.

Работа выполнена в Лаборатории ядерных проблем ОИЯИ.

Препринт Объединенного института ядерных исследований. Дубна 1988

Chepurnoy A.I., Michova-Tsenova N., P19-88-339
Bruntskova H.

Dependence of Spontaneous Mutation of leu2 Gene
in *Saccharomyces Cerevisiae* on the Growth
Phase and the Cell Cycle Phase

The data obtained indicate that spontaneous mutations of *Saccharomyces cerevisiae* are formed during of DNA replication. When DNA replication is absent in lag-period, in static phase of growth, in G1-phase of cell cycle the spontaneous mutations are not formed in cell culture. Experimental data show the absence of primary spontaneously occurring DNA lesion accumulation in cell in G1-phase. Spontaneous mutations of yeasts are formed in S-phase of cell cycle apparently as DNA replication errors.

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

Preprint of the Joint Institute for Nuclear Research. Dubna 1988