

**ОБЪЕДИНЕННЫЙ
ИНСТИТУТ
ЯДЕРНЫХ
ИССЛЕДОВАНИЙ
ДУБНА**

У 446

P19-88-340

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

**ЗАКОНОМЕРНОСТИ ОБРАЗОВАНИЯ
ГАММА-ИНДУЦИРОВАННЫХ МУТАНТОВ
SACCHAROMYCES CEREVISIAE**

Направлено в журнал "Генетика"

1988

ВВЕДЕНИЕ

В вопросах индуцированного ионизирующими излучениями мутагенеза у дрожжей к настоящему времени устоялось представление, что индуцированные мутации возникают в результате ошибок, происходящих во время репарации поврежденной ДНК ^{/1/}. До сих пор во всех изученных случаях это положение как будто подтверждалось. Считается, что лишь один из трех путей репарации, известных для дрожжей, принимает участие в процессе возникновения мутаций ^{/1,2/}.

Репарационная природа индуцированных мутаций допускает, что мутации могут возникать в любой фазе клеточного цикла, что и отмечалось в ряде работ ^{/1/}. Однако в последние годы появились публикации, в которых описаны случаи зависимости числа индуцированных мутантов от количества повреждений в ДНК, оставшихся неотрепарированными к моменту репликации ^{/3/}, а также отсутствие у дрожжей индуцированного мутагенеза при блокировании репликации ДНК в температурочувствительном штамме *Saccharomyces cerevisiae* ^{/4/}. Эти работы указывают на причастность репликации к процессам образования индуцированных мутаций.

Имеющиеся на сегодняшний день данные, полученные при изучении связи мутагенеза с репликацией, недостаточны для того, чтобы представить полную картину процессов, происходящих в клетках при индукции мутаций ионизирующими излучениями. Существенное влияние на судьбу первичных индуцированных повреждений оказывает работа репарационных систем, обеспечивающих их ликвидацию ^{/5/}. Поэтому при изучении связи индуцированного мутагенеза и репликации количественный учет мутаций, возникающих на разных стадиях клеточного цикла, часто давал данные, которые трудно интерпретировать ^{/6,7/}.

В настоящей работе представлены результаты изучения связи гамма-индуцированного мутагенеза и репликации у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* по образованию мутантов в разных фазах роста культуры и разных фазах клеточного цикла. В работе применена новая методика количественного учета мутантов, описанная в ^{/8/} и ^{/9/}.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКИ

В работе использовали гаплоидные дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* штамм NA3-24 (а leu2-1 lys1-1 RAD) ^{/9/}. В качестве мутантов наблюдали реверсы по гену leu2.

Суспензию дрожжей методом упорядоченного посева (220 колоний на чашку) рассеивали на агаризованную питательную среду M₃ ^{/10/} с добавками лейцина и лизина (30 мкг/мл), покрытую лавсановыми ядерными фильтрами. Количество клеток в инокулятах изменяли в зависимости от задачи опытов от 10³ до 10⁵.

Инокулированные клетки в течение опытов культивировали 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 число жизнеспособных клеток по количеству выросших колоний при посеве соответствующего разведения суспензии на богатую агаризованную среду П ^{/10/}. В то же время необходимое для дальнейшей статистической обработки количество колоний вместе с фильтрами переносили на селективную среду M₃ с добавками лизина для учета реверсов по гену leu2. На селективной среде ежедневно производили регистрацию реверсов, появляющихся в форме белых колоний вторичного роста. Оценку количества реверсов в момент переноса производили по их числу в "первой волне" выявления ^{/9/}.

Облучение клеток производили на гамма-установке "Свет" при мощности дозы Р ~ 35 Гр/мин. Клетки облучали как в суспензии, из которой они потом рассеивались на чашки, так и прямо в чашках. Различий в результатах при этих двух способах облучения не наблюдалось.

Синхронизацию клеток производили по методу Вильямсона и Скоупса ^{/II/}. Продолжительность клеточного цикла у клеток штамма NA3-24 составляет (2,0 ± 0,2) ч. Облучение в G₁-фазе клеточного цикла производили через 30 мин после посева синхронизированных клеток на чашки, а в G₂ - спустя 30 мин с момента появления почек у 50% клеток (середина S-фазы) ^{/12/}.

Особенности других приемов, использованных в работе, приведены в экспериментальной части.

Частота мутирования рассчитывалась по стандартной для флуктуационного теста формуле $R = 1/n \cdot \ln N/N_0$, где n - число клеток в одной колонии, N - число колоний, использованных для оценки количества мутантов в культуре, N₀ - число колоний без мутантов из выборки N.

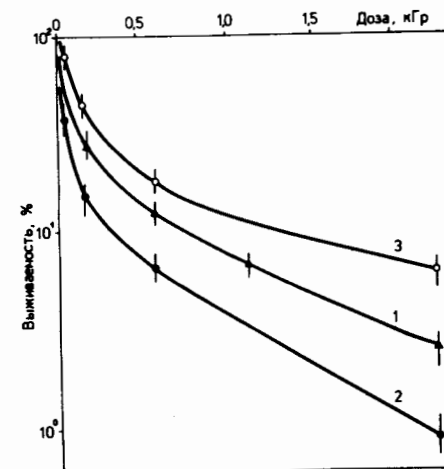
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ И ОБСУЖДЕНИЕ

Радиочувствительность клеток

Облучение клеток производили в G₁- и G₂-фазах клеточного цикла, а также в период экспоненциального роста культуры. Кривые, описыва-

щие зависимость выживания клеток штамма NA3-24 от дозы, представлены на рис.1. Клетки, находящиеся в момент облучения в G₂-фазе клеточного цикла, обладают большей радиорезистентностью по сравнению с клетками в G₁-фазе. Это обстоятельство в радиобиологии связывают с изменением эффективности репарации в клеточном цикле ^{/13/}. Изменяется ли при этом устойчивость к мутагенному действию гамма-лучей, мы увидим ниже.

Рис.1. Выживаемость клеток штамма NA3-24 от дозы при действии гамма-излучения в экспоненциальной фазе роста (1), в G₁ (2) и G₂ (3) фазах клеточного цикла.



Образование индуцированных гамма-излучением реверсов в разных фазах роста культуры

Суточную культуру клеток высевали на питательную среду с $n \sim 1 \cdot 10^5$ клеток в каждом инокуляте. Культивирование клеток продолжалось 25 суток. Облучение клеток производили в дозе 35 Гр. Часть клеток облучали сразу после посева, часть - через 5, 10, 15 и 20 суток культивирования. Количество мутантов оценивали в выборках из 880 колоний. Результаты представлены на рис.2.

Как следует из полученных результатов, гамма-индуцированные реверсы образуются лишь тогда, когда облученные клетки имеют возможность размножаться. Если колонии тотчас после облучения перенести на селективную среду, не дав им ни разу поделиться, то гамма-индуцированных реверсов не обнаруживается. В отсутствие деления клеток в стационарной фазе роста (10-25 суток культивирования) гамма-облучение также не вызвало образования индуцированных реверсов.

Индукцированные реверсы были зарегистрированы только в двух случаях - при пострадиационном инкубировании клеток, облученных сразу после посева и на 5-е сутки культивирования, когда клетки ещё имели

возможность размножаться. Причем, в силу ограниченного роста, клетки, облученные на 5-е сутки культивирования, дали гораздо меньше индуцированных реверсов, чем облученные сразу после высева, хотя подвергавшихся облучению клеток было гораздо больше.

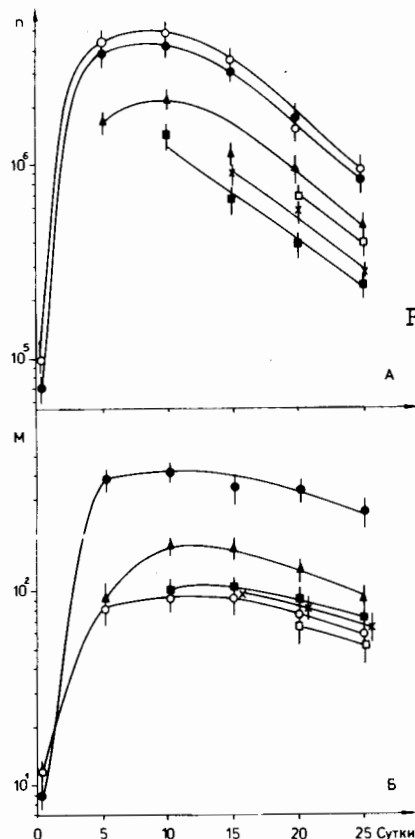


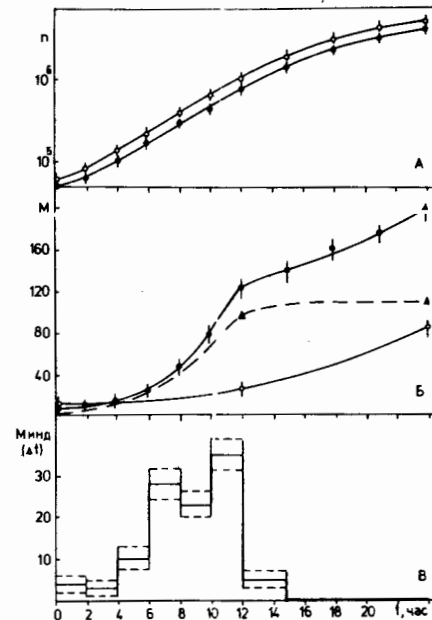
Рис.2. Число жизнеспособных клеток в одной колонии (А) и число колоний с реверсами по гену *leu2* в выборках из $N=880$ (Б) в культуре клеток штамма NA3-24 без облучения (o) и после облучения клеток в дозе 35 Гр сразу после высева их на питательную среду (●), через 5 (▲), 10 (■), 15 (×) и 20 (□) суток культивирования.

Таким образом, из полученных данных следует, что образование гамма-индуцированных реверсов зависит от количества делений клеток исходного штамма после облучения. В отсутствие делений клеток в период от облучения до переноса их на селективную среду гамма-индуцированных реверсов по гену *leu2* не образуется. Последний вывод согласуется с результатами работы ¹⁴, где при блокировании клеточного деления УФ-облучение не вызвало образования индуцированных мутантов.

Зависимость образования гамма-индуцированных реверсов от числа пострadiационных делений клеток

Сначала рассмотрим результаты опытов по образованию индуцированных реверсов после облучения клеток в экспоненциальной фазе роста. Облучение экспоненциально растущей культуры производили в течение 0,2; 0,5; 1; 2; 3; 5; 16; 32 и 64 мин (7-2000 Гр). После облучения клетки содержались на питательной среде в термостате. Через каждые два часа производили определение количества жизнеспособных клеток в одной колонии и перенос части колоний облученных клеток на селективную среду. Количество гамма-индуцированных реверсов определяли из общего количества реверсов в облученных пробах за вычетом спонтанных. Во всех опытах были получены качественно одинаковые результаты. Для случая дозы в 35 Гр (выживаемость $(55 \pm 10)\%$) результаты представлены на рис.3.

Рис.3. Образование реверсов по гену *leu2* после облучения гамма-лучами в дозе 35 Гр ($t=0$) культуры клеток штамма NA3-24, находящейся в экспоненциальной фазе роста. А - число жизнеспособных клеток в одной колонии без облучения (o) и после облучения (●). Б - число колоний с реверсами по гену *leu2* в выборках из $N=660$ в необлученных (o) и облученных (●) колониях и число колоний с гамма-индуцированными реверсами (▲). В - накопление колоний с индуцированными реверсами после облучения.



Полученные данные свидетельствуют о том, что процесс образования индуцированных гамма-излучением мутантов не является одномоментным, он наблюдается в течение 12-15 часов пострadiационного инкубирования в оптимальных для роста клеток исходного штамма условиях. Ни в одном опыте индуцированных мутантов не обнаруживалось сразу после облучения,

что согласуется с результатами, полученными ранее, когда в отсутствие репликации в период от облучения до первого пострadiaционного деления индуцированные мутанты не образовывались.

Облучение синхронизированных клеток в G_1 - и G_2 -фазах клеточного цикла производили в течение 1, 4, 16 и 64 мин (35–2000 Гр). После облучения клетки культивировали на питательной среде в термостате. Перенос колоний на селективную среду для выявления реверсов производили через каждые два часа. Полученные результаты, как и в случае облучения экспоненциально растущей культуры, оказались качественно одинаковыми для всех доз облучения, но зависящими от состояния культуры. Данные по накоплению колоний с гамма-индуцированными реверсами для случая дозы в 35 Гр представлены на рис.4.

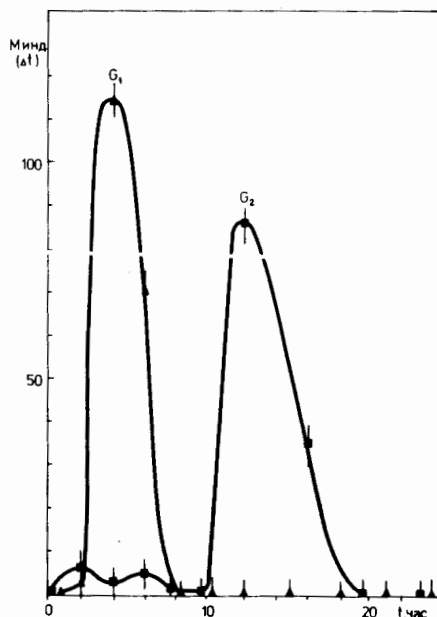


Рис.4. Накопление колоний с гамма-индуцированными реверсами по гену *leu2* в выборках из $N=660$ колоний клеток штамма NA3-24 после облучения их в дозе 35 Гр в G_1 (▲) и G_2 (■)-фазах клеточного цикла. При облучении в G_1 $n \sim 2,1 \cdot 10^5$; выживаемость $45 \pm 10\%$. В G_2 — $n \sim 5,5 \cdot 10^4$; выживаемость $(74 \pm 10)\%$.

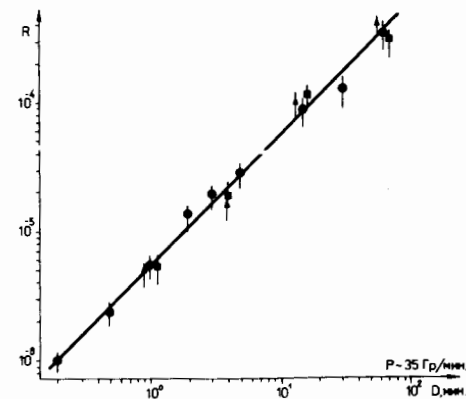
При облучении клеток в G_1 -фазе клеточного цикла образование индуцированных реверсов наблюдалось в течение первых 6 часов пострadiaционного инкубирования; в G_2 — основное количество индуцированных мутантов образовывалось на 10–15 часы инкубирования. Незначительное количество мутантов до этого объясняется, по-видимому, отсутствием абсолютной синхронности культуры. С учетом данных, полученных при облучении клеток в G_1 - и G_2 -фазах, становится понятным такое растянутое во време-

ни накопление индуцированных мутантов при облучении экспоненциально растущей культуры (рис.3В), поскольку в культуре одновременно находятся клетки в разных фазах клеточного цикла.

Задержка начала образования индуцированных мутантов при облучении клеток в G_2 -фазе до 10-го часа пострadiaционного инкубирования, по нашему мнению, вызвана задержкой получивших повреждения клеток на G_2 -М стадии клеточного цикла. Задержка деления клеток после облучения наблюдается всегда, и максимальна она как раз при облучении клеток в G_2 -фазе клеточного цикла [14].

По количеству индуцированных мутантов после длительного периода их образования были рассчитаны частоты мутирования от дозы при облучении клеток в G_1 , G_2 -фазах клеточного цикла и в период экспоненциального роста культуры. В исследованном диапазоне доз от 7 до 2000 Гр наблюдался линейный характер зависимости частоты мутирования от дозы гамма-излучения. Частоты образования индуцированных реверсов не зависели от физиологического состояния клеток и определялись лишь дозой облучения (рис.5).

Рис.5. Зависимость частоты образования индуцированных реверсов по гену *leu2* от дозы гамма-излучения при облучении клеток штамма NA3-24, находящихся в G_1 - (▲), G_2 (■)-фазах клеточного цикла и экспоненциальной фазе роста (●).



С учетом этих результатов, следует отметить, что, по-видимому, те репарационные процессы, которые обуславливают большое различие в чувствительности клеток в разных фазах клеточного цикла (рис.1 и [13]), не играют существенной роли в мутагенном пути репарации. Репарационные же процессы, непосредственно участвующие в образовании индуцированных мутантов, имеют одинаковую эффективность в G_1 и в G_2 в отношении образования гамма-индуцированных реверсов. Учитывая выводы об отсутствии индуцированных мутантов в период от облучения до первого пострadiaционного деления, следует признать, что эта эффективность равна нулю в

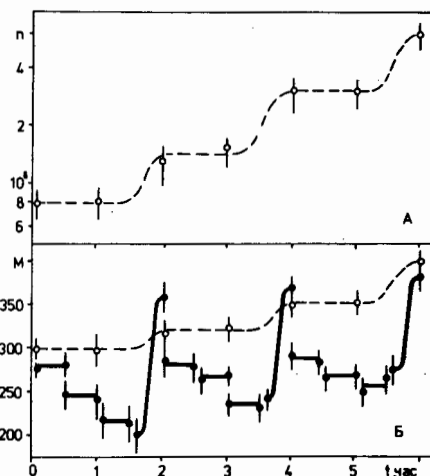
G₁-фазе клеточного цикла, а следовательно, и в G₂. Поэтому мутагенный путь репарации, если он вообще существует для данного штамма, остается отнести к стадии репликации ДНК. К этому вопросу мы сейчас и перейдем.

Образование индуцированных гамма-излучением мутантов в разных фазах клеточного цикла

Ранее мы показали, что образование спонтанных реверсов по гену *leu2* происходит во время репликации ДНК; в G₁-фазе клеточного цикла отсутствует накопление первичных спонтанных повреждений в ДНК, вероятнее всего в силу отсутствия их вообще; все события, связанные со спонтанным мутированием, разыгрываются в S-фазе [15].

Если в случае спонтанного мутагенеза существование премутационных повреждений ДНК находится под сомнением, то в случае индуцированного — премутационные повреждения, конечно же, имеются в клетке. Когда в этом случае происходит их реализация в мутации? Мы уже пришли к заключению, что формирование гамма-индуцированных мутантов происходит, по видимому, во время S-фазы клеточного цикла. Опыты с синхронизированными клетками подтвердили этот вывод. На рис.6 приведены результаты опытов по определению фазы клеточного цикла, в которой происходит возникновение гамма-индуцированных мутантов.

Рис.6. Данные по определению фазы клеточного цикла, в которой происходит возникновение гамма-индуцированных мутантов. А — число клеток в одной колонии синхронизированной культуры клеток штамма NA3-24, Б — количество колоний с реверсами в необлученной (o) и облученных (●) культурах сразу после облучения и через 30 мин пострadiационного инкубирования в выборках из N = 1100.



Синхронизированные клетки высевали методом упорядоченного посева на чашки и помещали в термостат. Через каждые 30 мин инкубирования

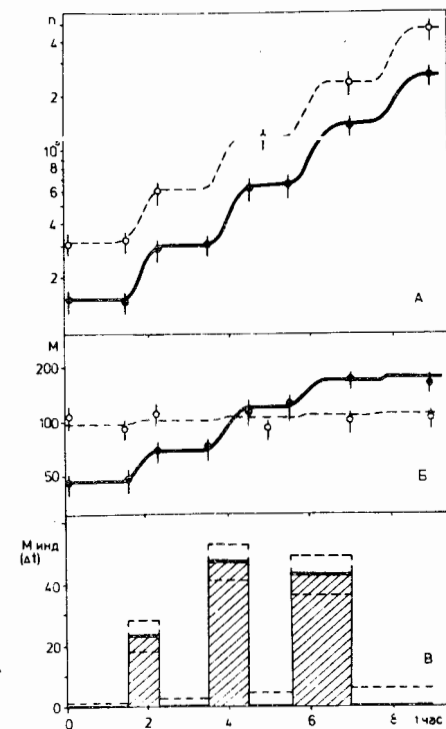
несколько чашек с колониями дрожжей облучали в дозе 35 Гр. Половину из этих колоний сразу после облучения переносили на селективную среду для выявления реверсов по гену *leu2*, другую половину переносили на селективную среду через 30 мин пострadiационного инкубирования в термостате.

Данные, полученные в этих опытах, однозначно указывают, что возникновение гамма-индуцированных мутантов происходит в S-фазе клеточного цикла, независимо от того, когда клетки были облучены. Пострадиационное инкубирование приводило к образованию индуцированных реверсов только, если в течение этого времени в культуре имела место репликация ДНК. До и после репликации мутанты не образовывались.

На рис.7 приведены данные о содержании индуцированных мутантов в облученной сразу после посева (в G₁-фазе) синхронизированной культуре клеток штамма NA3-24 в течение клеточных циклов первых четырех генераций после облучения.

Рис.7. Образование реверсов по гену *leu2* в клетках штамма NA3-24 в течение первых четырех генераций после облучения в дозе 35 Гр.

А — число жизнеспособных клеток в одной колонии в необлученной (o) и облученной (●) культурах. Б — количество колоний с реверсами в выборках из N = 880. В — прирост числа колоний с индуцированными реверсами за промежутки времени.



Как уже говорилось выше, образование индуцированных реверсов при облучении в G_1 -фазе не ограничивается первой пострадиационной репликацией, а наблюдается в течение 6 часов пострадиационного инкубирования или в течение первых трех генераций облученных клеток. В данном случае (рис.7В) мы имеем "тонкую структуру" пика, представленного ранее на рис.4, при облучении клеток в G_1 -фазе и переносе облученных клеток на селективную среду через каждые два часа. Как видно на рис.7, образование индуцированных мутантов не является монотонным в течение 6-часового инкубирования, что можно было бы ожидать из-за дисперсии задержки деления у получивших повреждения клеток, а привязано к трем последовательным фазам репликации ДНК.

Образование индуцированных реверсов во второй и третьей после облучения фазах репликации, на наш взгляд, является следствием возможности сохранения в клетках премутационных повреждений без реализации их в мутации в течение нескольких делений. При этом не исключено, что премутационные повреждения могут наследоваться дочерними клетками.

Особенности механизмов спонтанного и гамма-индуцированного мутагенеза у дрожжей

Как мы установили, спонтанные и индуцированные мутанты образуются в S-фазе клеточного цикла. Однако это ещё не означает, что оба процесса имеют одинаковые механизмы. Представленные на рис.8 данные позволяют полагать, что механизмы спонтанного и индуцированного мутагенеза у дрожжей различаются.

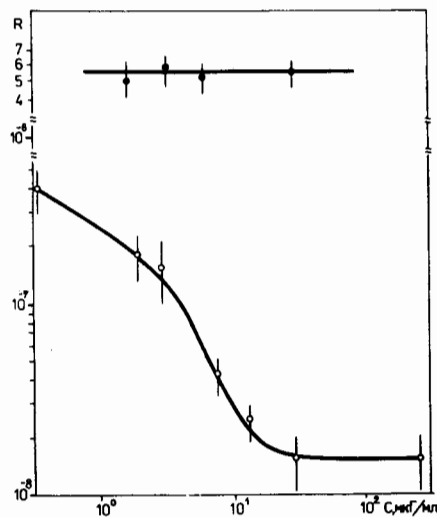


Рис.8. Частоты спонтанного (о) и гамма-индуцированного (●) ревертирования клеток штамма NA3-24 на средах с разным содержанием лейцина при облучении клеток в дозе 35 Гр.

В работе /16/ описана зависимость частоты спонтанного ревертирования гена *leu2* от содержания в среде лейцина. При уменьшении содержания лейцина частота спонтанного ревертирования гена *leu2* резко возрастает. В случае одинаковых механизмов спонтанного и индуцированного мутагенеза мы вправе при уменьшении содержания в среде лейцина ожидать аналогичной зависимости и для частоты индуцированного ревертирования. Однако частота гамма-индуцированного мутирования гена *leu2* после облучения в дозе 35 Гр, рассчитанная с учетом зависимости образования индуцированных реверсов от числа последующих после облучения генераций и вычитом спонтанных реверсов, оказалась одинаковой и не зависящей от содержания в среде лейцина.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Применение новой методики количественного учета мутантов, основанной на использовании ядерных фильтров и знании кинетики выявления мутантов на селективных средах, позволило на примере реверсов по гену *leu2* показать, что образование гамма-индуцированных мутантов не является одномоментным, а растянуто во времени. Сроки образования мутантов зависят от того, в какой фазе клеточного цикла были облучены клетки. При облучении в экспоненциальной фазе роста формирование мутантов растягивается до 15 часов, в G_1 — до 6 часов, в G_2 основное количество индуцированных мутантов образуется между 12 и 15 часами пострадиационного инкубирования облученных клеток. В отсутствие репликации ДНК образования гамма-индуцированных мутантов не происходит.

Репарационные процессы, обуславливающие возрастание радиорезистентности клеток в G_2 -фазе клеточного цикла по сравнению с G_1 , не влияют на частоту образования гамма-индуцированных реверсов, которая в обоих случаях была одинаковой при всех дозах в диапазоне от 35 до 2000 Гр. В указанном диапазоне доз наблюдался линейный характер зависимости частоты мутирования от дозы.

В опытах с синхронной культурой клеток показано, что гамма-индуцированные реверсы образуются во время пострадиационных репликаций. В G_1 и G_2 образования мутантов не происходит.

Различный характер зависимости частот возникновения спонтанных и гамма-индуцированных мутантов от содержания в среде лейцина свидетельствует о существовании различий в механизмах спонтанного и индуцированного мутагенеза у дрожжей.

Авторы благодарят проф. В.И.Корогодина и Ч.Файси за плодотворные обсуждения полученных результатов и интерес к 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. Lawrence C.W. - *Advances in Genetics*. 1982. v.21. P.173-254.
3. Barale R., Rusciano D., Loprieno N. - *Mutat.Res.* 1982. v.92. P.39.
4. Baranowska H., Zaborowska D. and Zuk J. - *Mutagenesis*.1987.v.2.P.1.
5. Hayes R.H., Kunz B.A. - In: "The molecular biology of the yeast *Saccharomyces*. Life cycle and inheritance." Cold Spring Harbor. 1982.P.371.
6. Magni G.E., Panzeri L., Sora S. - *Mutat. Res.* 1977. v.42. P.223-234.
7. Eklund T. - *Mutat.Res.* 1977. v.44. P.217-226.
8. Ильина В.Л., Корогодин В.И. - *Генетика*. 1987. т.ХХIII. № 4. С.630.
9. Чепурной А.И., Михова-Ценова Н. - Препринт ОИЯИ Р19-87-563. Дубна. 1987.
10. Захаров И.А., Кожин С.А., Кожина Т.Н., Федорова И.В. Сборник методик по генетике дрожжей-сахаромицетов. Л.: Наука. 1984. 144с.
11. Williamson D.H., Scores A.W. - *Nature*. 1962. v.193. P.256-257.
12. Brunborg G., e.a. - *Radiat.Res.* 1980. v.82. P.547-558.
13. Brunborg G., Williamson D.H. - *Mol.Gen.Genet.* 1978. v.162. P.277.
14. Lucke-Huhle S., Blukely E.A., Chang P.Y., Tobias C.A. - *Radiat. Res.* 1979. v.79. P.79-112.
15. Чепурной А.И., Михова-Ценова Н., Брунцкова Х. - Препринт ОИЯИ Р19-88-339, Дубна, 1988.
16. Чепурной А.И., Михова-Ценова Н. - Препринт ОИЯИ Р19-88-333. Дубна. 1988.

Рукопись поступила в издательский отдел
17 мая 1988 года.

Чепурной А.И., Михова-Ценова Н., Брунцкова Х. Р19-88-340
Закономерности образования гамма-индуцированных мутантов у *Saccharomyces cerevisiae*

На примере образования реверсов по гену *leu2* у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* показано, что процесс возникновения мутантов после гамма-облучения привязан к фазам пострадиационной репликации ДНК. В отсутствие репликации ДНК мутанты не образовывались. Сроки реализации премутационных повреждений в мутации зависят от того, в какой фазе клеточного цикла находились клетки при облучении.

Работа выполнена в Лаборатории ядерных проблем ОИЯИ.

Препринт Объединенного института ядерных исследований. Дубна 1988

Перевод авторов

Chepurnoy A.I., Michova-Tsenova N., P19-88-340
Bruntskova H.
Regularities in the Formation of Gamma-Induced Mutants of *Saccharomyces Cerevisiae*

The formation of reversions of the *leu2* gene in *Saccharomyces cerevisiae* as an example indicates that the process of mutant formation after gamma-irradiation occurs during of the postirradiation replication phases. When DNA replication is absent the mutants are not formed. The realizing periods of premutation lesions to mutations depend in what of cell cycle phase the cells were under irradiation.

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

Preprint of the Joint Institute for Nuclear Research. Dubna 1988