

ОБЪЕДИНЕННЫЙ
ИНСТИТУТ
ЯДЕРНЫХ
ИССЛЕДОВАНИЙ
ДУБНА

C 506

P19-88-97

М.Е.Смирнова*, Н.А.Колтовая, И.П.Арман*,
А.Б.Девин*

ГЕН СТАРТА CDC28
И ОБЪЕДИНЕННЫЙ КОНТРОЛЬ ЯДЕРНОЙ
И МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ
СТАБИЛЬНОСТИ У *Saccharomyces cerevisiae*

Направлено в журнал "Доклады АН СССР"

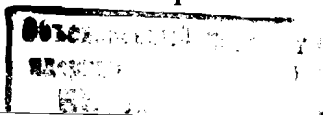
*Институт молекулярной генетики АН СССР, Москва

1988

Цикл деления эукариотических клеток служит объектом многочисленных цитологических, биохимических и генетических исследований ^{/1,2/}. Для генетиков первостепенный интерес представляют механизмы клеточного цикла, обеспечивающие точное воспроизведение наследственного аппарата и аккуратную передачу его вновь образующимся клеткам. Выделяя и изучая мутации, снижающие генетическую стабильность клеток, можно, в частности, надеяться идентифицировать новые гены цикла клеточного деления или лучше понять действие уже известных генов этого типа.

При изучении митотической стабильности хромосом у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* ^{/3,4/} мерой стабильности хромосом обычно служит темп (или частота) их потери у диплоидных клеток ^{/3/} или дисомиков ^{/5/}. Дисомики $n+1$ по некоторым хромосомам, в частности IY, VII, XIV, отличаются от изогенных им гаплоидов сниженной спонтанной митохондриальной (mt) ρho^- -мутабильностью ^{/6,7/}. Как хорошо известно, мутации представляют собой дегенеративные изменения mt генома, в основе которых предположительно лежат эксцизия и амплификация относительно коротких фрагментов молекулы mt ДНК ^{/8/}, иными словами, возникновение малых дочерних mt плазмид ρho^- , у которых способность поддерживаться в клетках, по-видимому, должна быть выше, чем у родительской плазмиды - нормальной молекулы mt ДНК (ρho^+). Падение спонтанной ρho^- -мутабильности у дисомиков, возможно, свидетельствует о некоторой общности механизмов поддержания mt плазмид ρho^- и природных хромосом в дрожжевых клетках.

Высокая ρho^- -мутабильность характерна для *S. cerevisiae* и детерминируется, в частности, ядерными генами *vrn*. ^{/9/} Мутации *vrn1* и *vrn5*, снижающие спонтанную и индуцированную ρho^- -мутабильность ^{/10,11/}, т.е. по-видимому, снижающие относительную стабильность mt плазмид ρho^- сравнительно с ρho^+ , в полном соответствии со сделанным выше предположением вызывают существенное (до 2 порядков величины) повышение темпа спонтанной утраты парных IY и XIV хромосом дисомиками ^{/6,7,11/}. Вероятно, в основе обнаруженного объединенного контроля ядерной и mt



к повышению темпа потери хромосом у диплоидов. Эта видимая противоречивость данных заставила нас исследовать влияние мутации *wtm5* на митотическую стабильность одной и той же хромосомы (VII) у дисомиков и диплоидов.

Были сконструированы диплоидные линии *ade1/ade1* и дисомики *ade1*, гетерозиготные по рецессивным маркерам VII хромосомы (в цис-положении) *cyh2* (левое плечо), *leu1* (вблизи центромеры) и *ade6* (правое плечо) и образующие красные колонии *Cyh⁺ Leu⁺*. Потеря такими клетками VII хромосомы, несущей доминантные аллели *CYH2, LEU1, ADE6*, должна приводить к появлению белых колоний (или секторов) *Cyh^r Leu⁻* /5/.

Колонии дисомиков, выращенные в течение 5 суток на полноценной питательной среде при 30°C, суспендировали и рассеивали на полноценную среду так, чтобы иметь около 100 колоний на чашку. Мозаичная колония, возникшая вследствие утраты VII хромосомы с доминантными маркерами в первом почковании после посева, должна иметь белый сектор *Cyh^r Leu⁻* размером не менее 180°. Как следует из табл.2, темп потери VII хромосомы у дисомиков *wtm1* и *SRM+*, ниже 10^{-4} , что согласуется с литературными данными /5/, и заметно ниже соответствующих величин для дисомиков по другим хромосомам /6,7/. Мутация *wtm5* вызывает существенное повышение этого темпа.

Таблица 2. Анализ спонтанной потери хромосом дисомиками различных генотипов (D (VII) - дисомия по VII хромосоме)

| Генотип | Число клонов | Общее число просмотренных красных и мозаичных колоний | Число потерь VII хромосомы |
|--------------------|--------------|---|----------------------------|
| D(VII) <i>SRM+</i> | 3 | 23 708 | 1 |
| D(VII) <i>wtm1</i> | 4 | 10 243 | 0 |
| D(VII) <i>wtm5</i> | 5 | 11 097 | 48* |

* Соответствующий темп потери хромосомы составляет $(4,3 \pm 1,5) \times 10^{-3}$.

Суспензии 5-суточных диплоидных колоний высевали на полноценную среду с добавкой циклогексимида (2-4 мкг/мл), на которой моносомики, утратившие VII хромосому с доминантными аллелями, должны образовывать белые колонии *Leu⁻*. Клетки из таких белых колоний, обнаруженных в опытах, отличаются от исходных клеток сниженной скоростью размножения и отсутствием способности спорулировать. Эти их свойства согласуются с предположением о моносомии, однако прямому подтверждению мешает отсутствие споруляции. Вместе с тем в нашем конкретном случае появление белых колоний *Cyh^r Leu⁻* без потери хромосом, т.е. за счет митотической рекомбинации (например, вследствие двух кроссинговеров и одного события геной конверсии), должно происходить с частотой, во всяком случае, не выше 10^{-10} . Поэтому можно считать, что возникновение практически всех обнаруженных нами белых колоний *Cyh^r Leu⁻* (табл.3) обусловлено потерей хромосом.

Таблица 3. Частота спонтанных потерь VII хромосомы у диплоидов различных генотипов

| Генотип | Число клонов | Количество посеянных клеток $\times 10^{-7}$ | Средняя частота потерь хромосом $\times 10^7$ |
|------------------|--------------|--|---|
| <i>wtm1/wtm1</i> | 4 | 10,0 | 1,4 |
| <i>wtm1/+</i> | 4 | 7,0 | 1,4 |
| <i>wtm5/wtm5</i> | 4 | 2,2 | 0,9 |
| <i>wtm5/+</i> | 4 | 7,1 | 4,4 |

Как видно из табл.3, частота потери VII хромосомы у гомозиготных диплоидов *wtm5/wtm5* не выше, чем у гетерозигот *wtm1/+* или *wtm5/+*, что вполне согласуется с литературными данными /3/.

Обнаруженным различиям в действии мутации *wtm5* на митотическую стабильность хромосом у дисомиков и диплоидов можно дать по крайней мере два предположительных объяснения. 1. Существует диплоидоцентрический механизм стабильности хромосом, не функционирующий у нормаль-

ных гаплоидов и дисомиков $n+1/5/$ и способный скомпенсировать эффект мутации *str5* у диплоидных клеток. 2. Влияние мутации *str5* на митотическую стабильность хромосом невелико у эуплоидных клеток (независимо от их пloidности), но становится значительным при нарушении хромосомного баланса.

Для выбора между этими гипотезами необходимы дальнейшие эксперименты. Сейчас лишь можно констатировать, что дисомия представляет собой чувствительную тест-систему, позволившую выявить влияние гена клеточного цикла *CDC28* (*SRM5*) на митотическую стабильность хромосом, ранее оставшееся незамеченным /3/.

Мутация *str1*, в отличие от *str5*, не влияет на митотическую стабильность VII хромосомы ни у диплоидов (табл.3), ни у дисомиков (табл.2). Таким образом, предполагаемое взаимодействие продукта *SRM1* с последовательностями ДНК, по-видимому, проявляет определенную хромосомную специфичность (вероятно, продукт *SRM1* взаимодействует с определенными последовательностями в IV и XIV хромосомах и не взаимодействует с последовательностями VII хромосомы).

Можно предположить, что в обеспечении митотической стабильности природных хромосом и рекомбинантных кольцевых минихромосом, а также конкурентоспособности мт плазмид *rho*⁻ у дрожжей сахаромикетов заметную роль играют взаимодействия определенных фосфорилируемых белков с последовательностями *ARS*. Эти взаимодействия могут быть существенны, например, для инициации репликации ДНК. Возможно, продукт *SRM1* является одним из таких белков, фосфорилируемых протеинкиназой *CDC28* (*SRM5*).

Авторы приносят благодарность профессору В.И.Корогодину за критическое прочтение рукописи, Г.И.Поповой за техническую помощь.

ЛИТЕРАТУРА

1. Lloyd D., Poole P.K., Edwards S.W. - The cell division cycle. N.Y. Acad. Press, 1982.
2. Pringle J.R., Hartwell L.H. In: The molecular biology of the yeast

Saccharomyces: life cycle and inheritance. Cold Spring Harbor Lab., 1981, p.161-191.

3. Hartwell L.H., Smith D. - Genetics, 1985, v.110, №3, p.381-395.
4. Broach Y.R. - Cell, 1986, v.44, №1, p.3-4.
5. Esposito M.S., Maleas D.T., Bjornstad K.A., Holbrook L.L. - Curr. Genetics, 1986, v.10, p.425-433.
6. Devin A.B., Koltovaya N.A., Cheryomukhina N.I. - Curr. Genetics, 1987, v.11, №5, p.407-410.
7. Смирнова М.Е., Зерниченко А.Н., Елисеенко Н.Н., Девин А.Б. - Генетика, 1987, т.23, №1, с.41-44.
8. Невзглядова О.В. - Мол.биология, 1984, т.18, №2, с.293-313.
9. Девин А.Б., Колтовая Н.А. - Генетика, 1986, т.22, №9, с.2244-2251.
10. Девин А.Б., Колтовая Н.А. - Генетика, 1986, т.22, №12, с.2768-2774.
11. Колтовая Н.А., Пешехонов В.Т., Просвирина Т.Ю., и др. - Препринт ОИЯИ, Р 19- 87- 575, Дубна, 1987, 8с.
12. Williamson D.N. - Yeast, 1985, v.1, №1, p.1-14.
13. Захаров И.А. и др. Сборник методик по генетике дрожжей-сахаромикетов. Л.: Наука, 1984, с.16 (вклейка).
14. Lörincz A.T., Reed S.I. - Nature, 1984, v.307, №5947, p.183-185.
15. Reed S.I., Hadwiger J.A., Lörincz A.T. - Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 1985, v.82, №12, p.4055-4059.

Рукопись поступила в издательский отдел
5 февраля 1988 года.