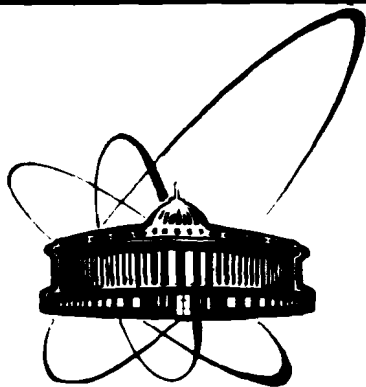


89-129



ОБЪЕДИНЕННЫЙ
ИНСТИТУТ
ЯДЕРНЫХ
ИССЛЕДОВАНИЙ
ДУБНА

К 68

P19-89-129

В.И.Корогодин, В.Л.Корогодина, Ч.Файси

ГИПОТЕЗА О ЗАВИСИМОСТИ МУТИРОВАНИЯ ГЕНОВ
ОТ ИХ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ

Направлено в журнал "Nature"

1989

"Главная догма генетики" - неадаптивный характер мутирования генов - дискутируется с разных точек зрения уже много лет, порой приобретаемая даже политический оттенок. Научные данные в этой области, однако, фрагментарны и неоднозначны.

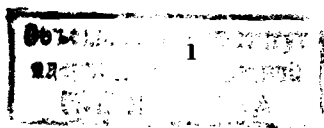
В этой статье приводятся итоги изучения спонтанного ревертирования ауксотрофных по аденину дрожжей при разном содержании аденина в среде, позволяющие сформулировать новую точку зрения на эту проблему. Часть результатов была опубликована ранее ^{1/1/}, а полный отчет направляется в журнал **Mol. Gen. Genet.**

В работе были использованы штаммы гаплоидных дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, ауксотрофные по аденину: p192 (**a ade2-192**), ДК769-172 (**a ade2-192 lys5-3**) и 769-p192-15В-П4 (**a ade2-192 lys5-3**). Учитывались реверсии к прототрофности двух типов: за счет мутации в гене **ade2** (локусные) и за счет мутаций в генах-супрессорах (супрессорные, которые в нашем случае служили контролем).

У дрожжей система биосинтеза аденина контролируется конечным продуктом на уровне репрессии генов ^{2,3/}. Изменяя количество аденина в питательной среде, можно регулировать состояние адениновой системы, в том числе и активность гена **ADE2**. При работе дефектного гена **ade2** клетки накапливают красный пигмент (продукт полимеризации предшественников аденина), так что о функционировании системы аденинового синтеза может свидетельствовать окраска колоний.

Для анализа мы использовали культуры дрожжей в трех разных состояниях: а) в логарифмической фазе роста (когда при содержании аденина от I до 500 мг/л клетки размножаются с одинаковой скоростью, а их колонии - белые); б) в стационарной фазе роста (когда на средах, содержащих менее 20 мг/л аденина, "урожай" клеток в чашке Петри лимитируется истощением аденина, и колонии краснеют, а на средах, содержащих более 20 мг/л аденина, "урожай" лимитируется другими факторами, аденин остается в избытке, а колонии - белые); в) во время остаточного роста на среде без аденина (при перенесении на которую колонии быстро краснеют, независимо от того, на какой среде и в какой фазе роста они ранее находились).

Методика проведения экспериментов следующая ^{4,5/}. Клетки высевали инокулятором на агаризованные питательные среды, содержащие от I до 500 мг/л аденина и покрытые пористыми лавсановыми фильтрами. После



культивирования (требуемое время от 1 до 24 суток) фильтры с выросшими колониями переносили на селективную среду (без аденина), где регистрировали и идентифицировали вырастающие колонии реверсов обоих типов (локусные и супрессорные). Специальные приемы /5-7/ позволяли различать реверсы, возникающие до перенесения фильтров на селективную среду и в более поздние сроки, т.е. во время остаточного роста; динамика выявления тех и других показана на рис. 1. Исключив такие возможные источники артефактов, как недоразвитие части реверсов из-за селективного давления клеток исходного штамма, гибель части клеток, а также возникновение вторичных мутаций, придающих локусным реверсам фенотип супрессорных, мы получили возможность оценивать с точностью до нескольких процентов число мутаций обоих типов, образующихся на любой среде в любой период времени. Нормируя число мутаций на прирост клеток за время их культивирования на исходной или на селективной среде, мы рассчитывали частоту мутирования интересующих нас генов.

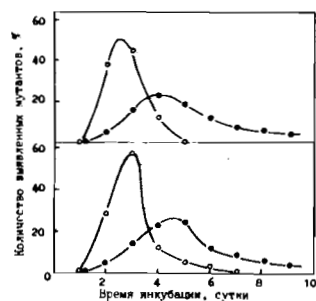


Рис. 1. Динамика выявления мутантов, возникающих до (○) и после (●) перенесения фильтров с колониями дрожжей на селективную среду. Вверху - локусные мутанты, внизу - супрессорные. Общее число мутантов каждой группы принято за 100 %.

Частоты мутирования при разных условиях культивирования для одного из штаммов приведены в таблице. Видно, что переход системы биосинтеза аденина от репрессированного к дерепрессированному состоянию сопровождается резким увеличением частоты мутирования гена *ade2*. Частота мутирования генов-супрессоров также возрастает, но значительно меньше. Этот эффект, разный по величине для трех тестируемых штаммов, был ярко выражен во всех опытах. Изменения частот мутирования гена *ade2* и генов-супрессоров у всех этих штаммов, усредненные по данным большого числа независимых опытов, показаны на рис. 2. Видно, что мутабельность гена *ade2* возрастает в 15-150 раз, а генов-супрессоров - всего в 2,5-4,5 раза.

Как мы уже отмечали /1/, умеренное повышение частоты мутирования генов-супрессоров при исчерпании аденина в среде согласуется с гипотезой о мутагенном эффекте дисбаланса пулов нуклеотидов /8/, тогда как резкое повышение частоты мутирования гена *ade2* требует другого объяснения. Необходимость этого обуславливается и следующим обстоятельством.

Таблица. Зависимость частоты возникновения локусных и супрессорных реверсов от состояния системы биосинтеза аденина. Штамм p192

Фаза роста культуры	Содержание аденина в среде, мг/л	Состояние системы	Частота возникновения реверсов, 10 ⁻⁹	
			Локусные	Супрессорные
Логарифмическая фаза	I	Репрессия	0,41 ± 0,23	8,4 ± 1,3
	10	"	0,38 ± 0,15	4,2 ± 0,7
	100	"	0,20 ± 0,04	4,5 ± 0,9
Стационарная фаза	I	Дерепрессия	5,5 ± 0,6	13,0 ± 3,0
	10	"	2,5 ± 0,3	5,9 ± 1,1
	100	Репрессия	0,14 ± 0,05	2,3 ± 0,5
Остаточный рост	I*	Дерепрессия	6,1 ± 0,9	13,0 ± 1,0
	10*	"	17,0 ± 5,0	23,0 ± 4,0
	100*	"	20,0 ± 4,0	19,0 ± 3,0

* Содержание аденина перед перенесением клеток на селективную среду.

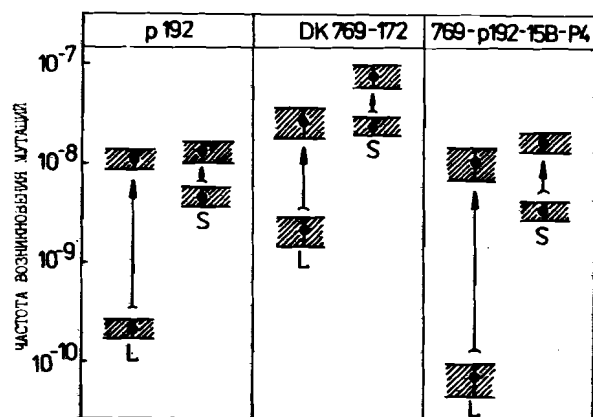


Рис. 2. Изменения частот мутирования гена *ade2* (L) и генов-супрессоров (S) при переходе от репрессии (нижние точки) к дерепрессии (верхние точки) для трех штаммов дрожжей. В виде заштрихованной зоны дается ошибка среднего по независимым опытам.

Результаты, подобные нашим, А.И.Чепурной и Н.Михоза-Ценова^{/9/} получили на репрессируемой конечным продуктом системе биосинтеза лейцина. Как установили эти авторы, уменьшение содержания лейцина в среде (от 30 до 0,3 мг/л), что, очевидно, не может вызвать дисбаланс пулов нуклеотидов, приводит к резкому повышению мутабельности гена *leu2*, слабому - генов-супрессоров, и никак не влияет на мутабельность гена *lys1*.

В качестве объяснения приведенных выше фактов можно предложить гипотезу о зависимости спонтанной мутабельности генов от их функционального состояния^{/1/}.

Известно, что активированные гены приобретают более открытую конформацию^{/10/}, с них удаляются многие белки^{/11/}, и они могут становиться более доступными для атак внутриклеточными мутагенными факторами. У бактерий функциональное состояние генов в значительной степени определяет чувствительность к УФ-облучению^{/12/}, фотореактивируемость^{/13/}, а также подверженность мутагенному действию УФ-лучей^{/14, 15/} и химических соединений^{/16, 17/}; у дрожжей - частоту митотической рекомбинации^{/18/}; у клеток млекопитающих - скорость репарации пиримидиновых димеров^{/19-21/}; у плазмид - их стабильность^{/22/}. Спонтанная мутабельность естественным образом вписывается в этот ряд.

Недавно Дж.Кэрнс с соавторами^{/23/} сообщили о повышении спонтанной мутабельности генов лактозного оперона *Escherichia coli* при наличии

в среде лактозы, что, по-видимому, относится к этой же категории явлений. Различия в частотах мутирования лактозного гена в зависимости от наличия лактозы не превышали десяти раз, что примерно совпадает с опубликованными ранее данными о повышении частоты мутирования генов прокариот при переходе от репрессированного в дерепрессированное состояние при действии некоторых мутагенов^{/14-17/}. Существенно больший эффект возрастания частоты мутирования генов у эукариот, описанный нами, может быть обусловлен другой структурной организацией их хромосом.

Гипотезу о зависимости частоты мутирования генов от их функционального состояния можно, пожалуй, рассматривать как частный случай более общего утверждения о влиянии функционального состояния генов на самые разные генетически значимые события, совершающиеся с участием ДНК: возникновение точковых и структурных мутаций, осуществление репарации и рекомбинации, а также, возможно, конверсию генов, их амплификацию и взаимодействие с мобильными элементами.

Гипотеза о зависимости спонтанной мутабельности генов от их функционального состояния может иметь несколько важных следствий.

Во всех случаях, когда изменения условий существования организмов сопровождаются изменениями активности некоторых генов, может наблюдаться "генная специфичность" мутагенеза - разное влияние этих условий на частоты мутирования генов с разными путями активации. Примером генной специфичности может служить мутагенез у бактерий^{/24/} и дрожжей^{/25, 26/} при дисбалансе пулов нуклеотидов. Другими словами, мутационный спектр клеток (т.е. относительные частоты мутирования разных генов) должен зависеть от условий их культивирования, отражая функциональное состояние их генетического аппарата.

Всеобщность этих закономерностей позволяет предположить их существенную роль не только в эволюции живых организмов (как уже отмечали Р.Герман и Н.Дворкин^{/17/}), но также в дифференцировке тканей в онтогенезе и в иммунной системе.

Другим следствием нашей гипотезы является то, что частоту мутирования отдельного гена следует задавать не одной какой-либо величиной, а распределением этой величины на пространстве режимов.

В заключение следует подчеркнуть, что описанное нами явление и гипотеза, принимаемая для его объяснения, не имеют ничего общего с "адаптивным мутагенезом" С.Хиншельвуда^{/27/}. О "направленности мутагенеза" в нашем случае можно говорить лишь в том смысле, что гены, "активно работающие" при данных условиях обитания организмов, чаще мутируют и таким образом поставляют более обильный материал для естественного отбора, чем гены, находящиеся в репрессированном состоянии.

Литература

1. Ильина В.Л., Корогодина В.И., Файси Ч. - Генетика, 1987, т. 23, с. 637.
2. Gross T.S., Woods R.A. - *Heredity*, 1972, v. 28, p. 275.
3. Аленин В.В., Домкин В.Д., Ковалева А.А., Смирнов М.Н. - Биополимеры и клетка, 1987, т. 3, с. 325-326.
4. Ильина В.Л., Корогодина В.И. - Генетика, 1987, т. 23, с. 630-636.
5. Корогодина В.И., Абетян Н.О., Брунцкова Х., Джанполадян Н.Л., Корогодина В.Л., Михова-Ценова Н., Симонян Н.В., Файси Ч., Чепурной А.И. - Препринт ОИЯИ, PI9-88-351, Дубна, 1988.
6. Корогодина В.Л., Корогодина В.И., Файси Ч. - Сообщение ОИЯИ, PI9-88-766, Дубна, 1988.
7. Корогодина В.Л., Колтовая Н.А., Любимова К.А., Корогодина В.И., Файси Ч. - Сообщение ОИЯИ, PI9-88-835, Дубна, 1988.
8. Haynes R.H. - In: *Genetic consequences of nucleotide pool imbalance*. Ed. de Serres F.J. Plenum Publishing Corporation, N.-Y., 1985, p. 1-23.
9. Чепурной А.И., Михова-Ценова Н. - Препринт ОИЯИ, PI9-88-333, Дубна, 1988.
10. Weisbrod S. - *Nature*, 1982, v. 297, p. 289-295.
11. Преображенская О.В., Карпов В.Л., Нагорская Т.В., Мирзабеков А.Д. - Молекулярная биология, 1984, т. 18, с. 8-20.
12. Kölsch E., Starlinger P. - *Z. Vererbungsl.*, 1965, v. 96, p. 297-303.
13. Kölsch E., Starlinger P. - *Z. Vererbungsl.*, 1965, v. 96, p. 304-306.
14. Lipschutz R., Falk R., Avigad C. - *Israel J. Medical Sci.*, 1965, v. 1, p. 323-324.
15. Savié D.J., Kanazir D.T. - *Mol. den. Genet.*, 1972, v. 118, p. 45-50.
16. Brock R.D. - *Mut. Res.*, 1971, v. 11, p. 181-186.
17. Herman R.K., Dworkin N.B. - *J. Bacteriol.*, 1971, v. 106, p. 543-550.
18. Clavilier L., Luzzati M., Slonimski P.P. - *C. R. Soc. Biol.*, 1960, v. 154, p. 1970-1974.
19. Madhani H.D., Bohr V.A., Hanawalt P.C. - *Cell*, 1986, v. 45, p. 417-423.
20. Mellon J., Bohr V.A., Smith C.A., Hanawalt P.C. - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1986, v. 83, p. 8878-8882.
21. Mellon J., Spivak G., Hanawalt P.C. - *Cell*, 1987, v. 51, p. 241-249.
22. Kim S.H., Ryu D. - *Biotechnol. Bioeng.*, 1984, v. 26, p. 497-502.
23. Cairns J., Overbaugh J., Miller S. - *Nature*, 1988, v. 333, p. 142-145.
24. Bresler S., Mosevitsky M., Vyacheslavov L. - *Mut. Res.*, 1973, v. 19, p. 281-293.
25. Eckardt F., Kunz B.A., Haynes R.H. - *Current Genetics*, 1983, v. 7, p. 399-402.
26. Brendel M. - In: *Genetic consequences of nucleotide pool imbalance*. Ed. de Serres F.J., Plenum Publishing Corporation, N.-Y., 1985, p. 425-434.
27. Дин А., Хиншельвуд С. - В кн.: *Адаптация у микроорганизмов*. Изд. иностр. лит., М., 1966, с. 24-81.

Рукопись поступила в издательский отдел
27 февраля 1989 года.