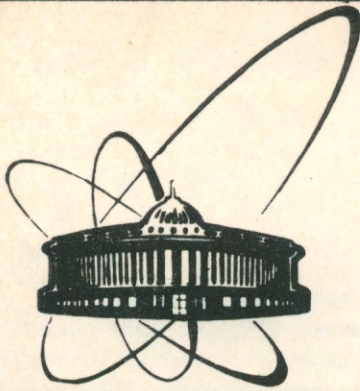


89-216



ОБЪЕДИНЕННЫЙ
ИНСТИТУТ
ЯДЕРНЫХ
ИССЛЕДОВАНИЙ
ДУБНА

К 68

P19-89-216

В.И.Корогодин, В.Л.Корогодина, Ч.Файси,
А.И.Чепурной, Н.Михова-Ценова, Н.В.Симонян*

К ВОПРОСУ О ЗАВИСИМОСТИ
ЧАСТОТЫ СПОНТАННОГО МУТИРОВАНИЯ
ОТ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ГЕНОВ

Направлено в журнал "Molecular General Genetics"

* Ереванский физический институт

1989

ВВЕДЕНИЕ

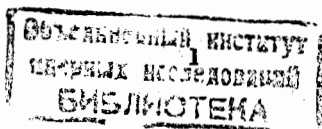
В учении о мутагенезе существуют две крайние точки зрения относительно связи между условиями культивирования клеток и частотами мутирования их генов. Согласно первой из них условия культивирования не влияют на спонтанный мутагенез и мутационный спектр (воображаемая гистограмма, на которой отложены частоты мутирования всех генов данного организма) есть величина инвариантная. Согласно второй мутации возникают в строгой зависимости от условий культивирования и имеют адаптивный характер.

Классические опыты Лурия и Дельбрука /42/ и супругов Ледерберг /40/, а также работа Райана /50/, вскрывшая методические погрешности Хин - шельвуда и его сотрудников /22,33/, доказали существование неадаптивных мутаций и позволили отклонить адаптационную концепцию мутационного процесса как не согласующуюся с фактами.

Но предположение о полной независимости мутагенеза от внешних условий тоже пришло в противоречие с фактами. Оказалось, что частота возникновения мутаций сильно зависит от температуры, причем не только повышение, но и понижение температуры по сравнению с оптимальной приводит к повышению мутабельности /6,29,46/. Новик и Сциллард /47,48/ в хемотростных культурах обнаружили, что частота мутаций изменяется при изменении концентрации в среде лимитирующего метаболита. Было также показано, что распределение числа мутантов в флуктуационном тесте не всегда соответствует ожидаемому /51/.

Существует третья точка зрения, согласно которой условия внешней среды существенно влияют на мутационный процесс, но возникающие мутации не обязательно адаптивны.

Некоторые общие соображения в пользу этой, физиологической, концепции мутационного процесса были сформулированы более сорока лет назад /7,9/, хотя экспериментальная разработка ее началась значительно позже. В числе первых здесь, пожалуй, следует назвать опыты Вейнберга /28/ и Кафлина и Адельберга /21/, показавшие резкое увеличение частот мутирования бактерий при тиминовом голодании. Начиная с семидесятых годов в ряде лабораторий ведутся уже систематические исследования влияния дисбаланса пулов нуклеотидов на различные биологические процессы, в том числе и на мутирование разных генов /27,38/. Дисбаланс



пулов нуклеотидов увеличивает, как правило, частоту мутирования генов у самых разных биологических объектов.

Несколько лет назад мы обнаружили /4,34/, что частота возникновения реверсов у ауксотрофных по аденину дрожжей возрастает при уменьшении содержания аденина в среде. На одном из штаммов дрожжей было установлено /5/, что содержание аденина в среде по-разному влияет на возникновение локусных и супрессорных реверсов: при уменьшении концентрации аденина от 100 до 1 мг/л частота возникновения локусных реверсов увеличилась более чем в 100 раз, а частота возникновения супрессорных - всего в 4,5 раза.

Заинтересовавшись этими результатами, мы провели серию исследований на нескольких штаммах дрожжей, используя в качестве лимитирующего фактора не только аденин, но и лейцин. Ниже мы опишем основные результаты этих опытов, а затем вернемся к обсуждению вопроса о влиянии условий культивирования клеток на частоты мутирования их генов.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДИКИ

Мы использовали в работе гаплоидные ауксотрофные штаммы *Saccharomyces cerevisiae* p192 (a *ade2-192*) - из петергофской линии, получен от И.А.Захарова (Гатчина); 769-p192-I5B-П4 (a *ade2-192 lys5-3*) - из петергофской линии, получен от Д.А.Горденина (Ленинград); ДК769-I72 (a *ade2-192 lys5-3*) - сконструирован А.Б.Девиным (Москва) путем скрещивания штаммов петергофской линии со штаммами, полученными от Р.К.Мортимера (Беркли); NA3-24 (a *leu2-1 lys1-1*), сконструирован нами путем скрещивания штаммов, полученных от Р.К.Мортимера.

Среды и методы культивирования - стандартные /2/.

Схема проведения опытов следующая. Методом упорядоченного посева /II/ с помощью металлического инокулятора дрожжи высевали на поверхность питательной среды, покрытой пористыми лавсановыми фильтрами. На одну чашку Петри приходилось 220 инокулюмов, содержащих примерно по 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 числа клеток в одной колонии. Остальные колонии вместе с фильтрами переносили на селективные среды для учета и выделения реверсов, которые хорошо выявляются на таких средах в виде колоний вторичного роста. Подобная методика, с высевом клеток на фильтры и перенесением на селективную среду, была описана Борнштейном с сотр. /15/.

Динамика выявления реверсов на селективных средах описывается, как правило, двуволнистой кривой /3,12/: первая волна приходится на ревер-

сы, возникшие до перенесения культуры на селективную среду, а вторая - после перенесения, во время остаточного роста. Разделить реверсы этих двух групп можно и другим методом /8/. Для этого колонии, выросшие на пористом фильтре, перед перенесением на селективную среду следует растереть стеклянной палочкой (каждую колонию отдельно). Если в такой колонии содержалась микроколонию реверса (состоящая из двух и более клеток), то на фоне мазка вырастет несколько однородных вторичных колоний, тогда как реверс, возникший во время остаточного роста (т.е. уже после растирания колоний), образует единственную вторичную колонию. Используя оба метода, мы могли с высокой надежностью различать реверсы, образовавшиеся на средах с тем или иным содержанием лимитирующего метаболита, и реверсы, возникшие на селективной среде, таких метаболитов вообще не содержащей.

Реверсы, образующие колонии на селективной среде, изолировали и дифференцировали на локусные и супрессорные. К первой группе относили те, которые возникали за счет мутаций в изучаемых генах, т.е. в генах *ade2-192* и *leu2-1*, ко второй группе - реверсы, возникающие за счет мутаций в генах-супрессорах, что контролировалось генетическим и фенотипическим анализом /5,8,12/. Супрессоры, ответственные за возникновение реверсов второй группы, не идентифицировали.

Большую опасность в подобной работе могут представить ошибки, обусловленные гибелью части клеток, недоявлением некоторых реверсов, различиями в скоростях размножения локусных и супрессорных мутантов, а также возникновением вторичных мутаций, придающих локусным реверсам фенотип супрессорных. Специальные методические разработки /8а,8б/ позволили нам почти полностью исключить источники таких артефактов. В результате мы получили возможность с большой точностью определять частоты возникновения локусных и супрессорных реверсов у ауксотрофных дрожжей в разные периоды роста культур на средах, содержащих разное количество лимитирующих метаболитов, а также во время остаточного роста на селективной среде.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Кривые роста дрожжей на средах с лимитирующими метаболитами

На рис. I показаны кривые роста дрожжей, ауксотрофных по аденину и лейцину, на средах с разным содержанием этих метаболитов.

В случае штаммов, ауксотрофных по аденину, скорость размножения клеток в логарифмической фазе роста практически не зависит от его содержания в среде (в интервале от 1 до 100 мг/л), что сказывается только на размерах колоний в стационарной фазе роста, т.е. на M-концентрации. Анализ зависимости M-концентрации этих штаммов от содержания аде-

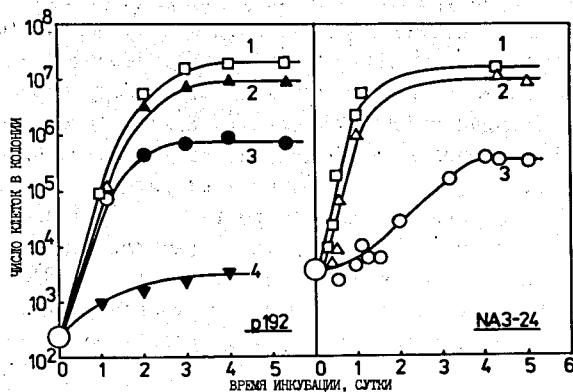


Рис. 1. Кривые роста ауксотрофных по аденину (p192) и по лейцину (NA3-24) дрожжей на средах с разным содержанием этих метаболитов. Аденин (левый рисунок): 1 - 100, 2 - 10 и 3 - 1 мг/л; 4 - среда без аденина, остаточный рост. Лейцин (правый рисунок): 1 - 300, 2 - 30 и 3 - 3 мг/л.

нина в среде показал, что при 20 мг/л и менее аденин является лимитирующим рост фактором, тогда как при более чем 20 мг/л аденин содержится в среде в избытке и культура прекращает расти из-за истощения каких-то других компонентов среды. Во время логарифмической фазы роста колонии у *Ade⁻* штаммов белые, при переходе к стационарной фазе в случае истощения аденина они краснеют, а при избытке аденина остаются белыми. После перенесения на селективную среду колонии быстро краснеют, независимо от того, сколь долго и на какой среде они предварительно культивировались.

В случае штамма, ауксотрофного по лейцину, содержание лейцина в среде (в испытанном интервале) влияет как на скорость размножения клеток в логарифмической фазе роста, так и на величину M-концентрации.

Частота возникновения реверсов по аденину в разных фазах роста культур

В табл. 1 представлены данные по частотам возникновения локусных (R_L) и супрессорных (R_S) реверсов у двух штаммов дрожжей для культур 24-30-и часового возраста, т.е. находящихся в логарифмической фазе роста. Мы видим, что обе величины не зависят от содержания аденина в среде и равны соответственно $2,5 \cdot 10^{-9}$ и $2,8 \cdot 10^{-8}$ для штамма ДК769-172 и $2,8 \cdot 10^{-10}$ и $5,8 \cdot 10^{-9}$ для штамма p192.

При переходе к стационарной фазе роста, т.е. в случаях, когда содержание реверсов определяли в культурах, имеющих возраст от 4 до 21 суток, картина изменяется. Как следует из табл. 2, при избытке аденина в среде (100 и 500 мг/л) частоты мутирования гена *ade2* и генов-супрессоров и в этом случае примерно такие же, как и в логарифмической фазе роста (см. табл. 1), но при лимитирующих концентрациях аденина (1, 5 и 10 мг/л) они увеличиваются, что особенно ярко выражено для ло-

Таблица 1. Частоты (R) возникновения локусных и супрессорных мутантов у ауксотрофных по аденину дрожжей при разном содержании аденина в среде. Логарифмическая фаза роста. Данные независимых опытов

Штамм	Содержание аденина мг/л	Возраст культур час	Число колоний N	Число клеток в одной колонии $n \cdot 10^6$	Частота мутирования		
					Локусные		Супрессорные
					$m R_L \cdot 10^{-10}$	$m R_S \cdot 10^{-9}$	
p192	I	30	20111	$0,36 \pm 0,01$	3 4,1	61	0,84
	10	30	19448	$0,82 \pm 0,09$	6 3,8	67	0,42
	100*	30	24937	$0,57 \pm 0,08$	3 2,1	74	0,52
		40	3388	$2,31 \pm 0,22$	2 2,6	56	0,72
		40	3509	$4,32 \pm 0,34$	2 1,3	60	0,40
Среднее R					$2,78 \pm 0,52$	$0,58 \pm 0,09$	
ДК769-172	I	24	623	$0,72 \pm 0,06$	2 45	26	5,9
		30	547	$0,73 \pm 0,13$	1 25	12	3,0
	5**	24	1362	$1,11 \pm 0,21$	3 20	44	3,0
		30	2817	$2,92 \pm 0,31$	15 18	134	1,7
	100**	24	1250	$0,88 \pm 0,14$	3 27	32	2,9
		30	1353	$3,61 \pm 0,43$	4 8,2	78	1,6
	500**	24	1505	$0,71 \pm 0,06$	5 47	38	3,6
	30	1918	$4,31 \pm 0,33$	9 11	140	1,8	
Среднее R					$25,2 \pm 5,0$	$2,94 \pm 0,50$	

* Разные варианты различались количеством среды в чашках Петри.

** Разные варианты различались содержанием в среде лизина.

кусных мутаций. Эта закономерность присуща всем трем ауксотрофным по аденину штаммам, несмотря на различия между ними по абсолютным значениям частот.

Наконец, в табл. 3 приведены частоты возникновения реверсов во время остаточного роста на среде без аденина. Видно, что частоты возникновения как локусных, так и супрессорных реверсов в этом случае не зависят ни от содержания аденина (от 1 до 500 мг/л) при предварительном культивировании, ни от его продолжительности (от 1 до 13 сут) и для штамма ДК769-172 равны соответственно $3,2 \cdot 10^{-8}$ и $8,6 \cdot 10^{-8}$, а для штамма p192 - $1,7 \cdot 10^{-8}$ и $1,8 \cdot 10^{-8}$. Заметим, что частоты возникновения локусных реверсов на среде без аденина значительно выше, чем в логарифмической фазе роста, а частоты возникновения супрессорных реверсов различаются в меньшей степени.

Таблица 2. Частоты (R) возникновения локусных и супрессорных мутантов у ауксотрофных по аденину дрожжей при разном содержании аденина в среде. Переход к стационарной фазе роста. Данные независимых опытов

Штамм	Содержание аденина мг/л	Возраст культур сутки	Число колоний N	Число клеток в одной колонии $n \cdot 10^6$	Частота мутирования			
					Локусные $m R_L \cdot 10^{-9}$		Супрессорные $m R_S \cdot 10^{-8}$	
p192	I	4	3094	$0,49 \pm 0,05$	8	5,3	30	1,99
		4	5083	$0,57 \pm 0,01$	10	3,5	20	0,69
		10	5525	$0,61 \pm 0,03$	25	7,4	31	0,92
		16	5083	$0,62 \pm 0,04$	18	5,7	50	1,59
	Среднее R				$5,47 \pm 0,82$	$1,30 \pm 0,30$		
	10	4	5304	$1,8 \pm 0,2$	18	1,9	42	0,44
		4	5083	$1,6 \pm 0,1$	18	2,2	33	0,41
		10	5304	$1,6 \pm 0,2$	21	2,5	55	0,65
		16	5525	$1,6 \pm 0,1$	30	3,4	77	0,88
	Среднее R				$2,50 \pm 0,33$	$0,59 \pm 0,11$		
	100*	4	7072	$1,6 \pm 0,2$	1	0,088	21	0,19
		7	2360	$7,0 \pm 0,6$	4	0,24	46	0,28
7		2540	$22,1 \pm 3,2$	5	0,089	-	-	
Среднее R				$0,14 \pm 0,05$	$0,23 \pm 0,05$			
DK769-172	5	13	844	$5,3 \pm 0,3$	25	5,7	109	2,6
		13	1689	$6,1 \pm 0,3$	112	11,2	403	4,5
	Среднее R				$8,46 \pm 2,79$	$3,54 \pm 0,93$		
	500	13	1086	$44,1 \pm 4,2$	12	0,26	321	0,81
		13	2032	$44,3 \pm 3,2$	33	0,37	369	0,45
Среднее R				$0,31 \pm 0,06$	$0,63 \pm 0,18$			
769-p192-15B-14	1**	13	231	$1,8 \pm 0,1$	11	27,1	14	3,5
		13	182	$3,2 \pm 0,2$	10	17,7	12	2,1
		21	3798	$0,25 \pm 0,03$	9	9,5	14	1,5
	Среднее R				$18,1 \pm 5,1$	$2,36 \pm 0,59$		
	10**	13	404	$5,6 \pm 0,2$	17	7,8	33	1,5
		13	244	$17,3 \pm 3,1$	12	2,9	33	0,8
		21	5064	$3,6 \pm 0,2$	50	2,8	129	0,7
	Среднее R				$4,45 \pm 1,61$	$1,0 \pm 0,25$		
100	21	7596	$9,0 \pm 1,3$	5	0,073	255	0,38	

* Разные варианты различались количеством среды в чашках Петри.

** Разные варианты различались содержанием в среде лизина.

Таблица 3. Частота (R) возникновения локусных и супрессорных мутантов у ауксотрофных по аденину дрожжей во время остаточного роста на среде без аденина. Предварительное культивирование на разных средах в течение разных интервалов времени. Данные независимых опытов

Штамм	Предварительное культивирование	Содержание аденина мг/л	Возраст культур	Число колоний N	Прирост числа клеток в одной колонии $n \cdot 10^6$	Частота мутирования			
						Локусные $m R_L \cdot 10^{-8}$		Супрессорные $m R_S \cdot 10^{-8}$	
p192	I	40 час	4 сут	19890	$0,33 \pm 0,11$	46	0,70	89	1,4
			4 сут	3094	$0,32 \pm 0,09$	5	0,51	11	1,1
	10	40 час	4 сут	18564	$1,1 \pm 0,3$	241	1,2	390	1,9
			4 сут	5304	$0,9 \pm 0,4$	103	2,2	129	2,7
	100	40 час	4 сут	3388	$1,3 \pm 0,1$	77	1,8	105	2,4
			4 сут	3509	$2,2 \pm 0,3$	84	1,1	67	0,88
		40 час	4 сут	24310	$1,1 \pm 0,3$	178	0,67	556	2,1
			4 сут	7072	$1,2 \pm 0,3$	215	2,6	180	2,1
		7 сут	7 сут	2360	$2,0 \pm 0,4$	144	3,1	-	-
			7 сут	2540	$2,0 \pm 0,2$	133	2,7	-	-
	Среднее R				$1,65 \pm 0,30$	$1,84 \pm 0,23$			
	DK769-172	I	24 час	30 час	623	$0,76 \pm 0,12$	8	1,7	27
30 час				547	$0,88 \pm 0,11$	8	1,7	24	5,1
5		24 час	30 час	1362	$0,33 \pm 0,08$	55	12,5	108	25,0
			30 час	2817	$1,1 \pm 0,2$	95	3,1	217	7,3
13 сут		844	13 сут	844	$0,90 \pm 0,08$	9	1,2	34	4,6
			13 сут	1689	$2,0 \pm 0,3$	26	0,78	82	2,5
100		24 час	30 час	1250	$0,64 \pm 0,11$	20	2,5	104	13,6
			30 час	1353	$2,7 \pm 0,3$	45	1,3	141	4,1
500		24 час	30 час	1505	$3,8 \pm 1,2$	43	0,76	202	3,8
			30 час	1918	$1,1 \pm 0,2$	127	6,2	338	17,6
13 сут	1068	13 сут	1068	$1,1 \pm 0,1$	34	2,9	65	5,7	
		Среднее R				$3,15 \pm 1,05$	$8,64 \pm 2,14$		

Теперь мы можем усреднить данные, полученные для каждого штамма при разных условиях культивирования. Для этого объединим частоты мутирования, которые соответствуют либо наличию в среде аденина (логарифмическая фаза роста и стационарная фаза при избытке аденина, колонии белые),

либо его исчерпанию или отсутствию (стационарная фаза роста при лимите по аденину и остаточный рост на селективной среде, колонии красные). Средние с ошибками для каждой группы данных, для всех трех штаммов, приведены на рис. 2. Видно, что частоты возникновения локусных реверсов, соответствующие частотам мутирования гена *ade2*, при исчерпании в среде аденина возрастают от 15 (для штамма ДК769-172) до 150 раз (для штамма 769-p192-15B-P4), а частоты возникновения супрессорных реверсов, соответствующие частотам мутирования генов-супрессоров, увеличиваются всего в 2,5-4,5 раза.

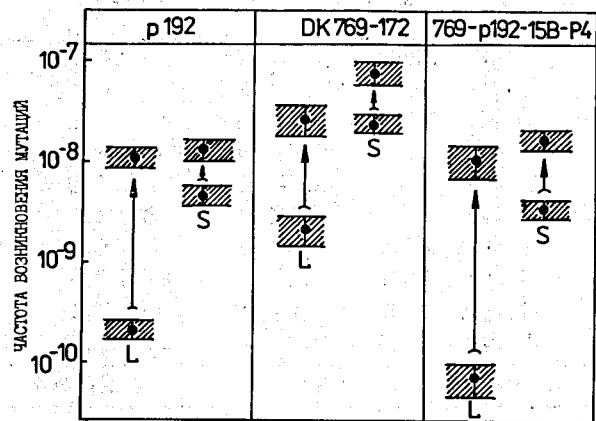


Рис. 2. Частоты возникновения локусных (L) и супрессорных (S) мутаций у дрожжей разных штаммов при наличии (нижние значки) и отсутствии или исчерпании (верхние значки) аденина в питательной среде. Ширина полос соответствует средним значениям с ошибками.

Частоты возникновения реверсов по лейцину при разном содержании в среде этого метаболита

На рис. 3 представлены данные по частотам возникновения реверсов разных типов у штамма NA3-24 при разном содержании лейцина в среде во время логарифмической фазы роста культуры. Видно, что при изменении концентрации лейцина от 300 до 0,3 мг/л частота возникновения локусных реверсов по лейцину увеличивается в среднем от $9,0 \cdot 10^{-9}$ до $3,0 \cdot 10^{-7}$, т.е. более чем в 30 раз, а частота возникновения супрессорных реверсов - от $1,3 \cdot 10^{-8}$ до $6,3 \cdot 10^{-8}$, т.е. примерно в 5 раз. Характерно, что данные для супрессорных реверсов, выделенных на селективной среде без лейцина (но с лизином) или без лизина (но с лейцином), практически совпа-

дают. Частота возникновения локусных реверсов по потребности в лизине, определявшаяся в этих же опытах, не зависела от содержания лейцина в среде и равнялась в среднем $1,8 \cdot 10^{-9}$.

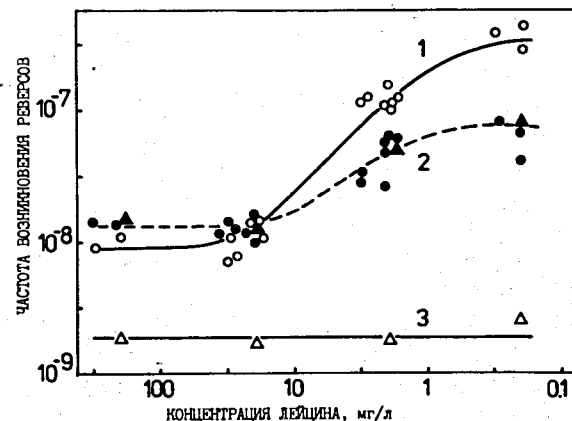


Рис. 3. Зависимость частоты возникновения реверсов разных типов от содержания лейцина в среде. Штамм NA3-24, логарифмическая фаза роста. 1 - локусные реверсы по потребности в лейцине; 2 - супрессорные реверсы, выделенные на среде с лизином, но без лейцина (●), и на среде с лейцином, но без лизина (▲); 3 - локусные реверсы по потребности в лизине. Разными значками отмечены результаты независимых опытов.

ОБСУЖДЕНИЕ

На основании приведенных экспериментальных данных можно принять за достоверно установленный факт, что спонтанная мутабельность существенно зависит от условий, в которых культивируются клетки. Частота спонтанного мутирования при изменении содержания в среде некоторых метаболитов может изменяться в сто и более раз, но изменения эти не одинаковы для разных генов. Подобное наблюдалось и при дисбалансе пулов нуклеотидов: увеличение мутабельности разных генов в клетках одной и той же популяции было выражено по-разному как у прокариот [17], так и у эукариот [16, 23].

Теперь рассмотрим вопрос о том, какими путями условия культивирования могут влиять на частоту мутирования разных генов у дрожжевых организмов. Для этого сопоставим полученный нами экспериментальный материал с разными точками зрения, имеющимися в литературе.

Спонтанная мутабельность и продолжительность клеточного цикла

Мы видели выше, что, в отличие от аденина, содержание которого в среде практически не влияет на скорость размножения дрожжей с мутацией *ade2-192* в логарифмической фазе роста, уменьшение содержания лейцина в среде ниже некоторого уровня сильно тормозит размножение клеток, ауксотрофных по этому метаболиту (рис. 1). Можно думать, что именно поэтому наблюдаются отмеченные выше различия во влиянии содержания в среде соответствующих метаболитов на частоту возникновения реверсов у дрожжей, ауксотрофных по аденину (табл. I) и по лейцину (рис. 3).

Попробуем объяснить результаты наших опытов допущением, что частота спонтанного возникновения мутаций, при расчете на клетку на деление, тем больше, чем продолжительнее клеточный цикл. Действительно, увеличение продолжительности клеточного цикла, что в опытах с лейцином наблюдается уже в логарифмической фазе роста, а в опытах с аденином может быть приурочено к переходу к стационарной фазе, сопровождается резким увеличением частот возникновения реверсов. Эта точка зрения возвращает нас к вопросам, обсуждавшимся еще в тридцатых годах /53/ и специально изучавшимся Новиком и Сциллардом /48/ и некоторыми другими авторами /24,37/. Однако это допущение плохо согласуется с тем фактом, что увеличение мутабельности по-разному выражено у разных генов (локусных и супрессорных), а у гена *lys1*, нейтрального к испытанным ситуациям, эффект вообще отсутствует. Результаты специально поставленных опытов заставляют окончательно отвергнуть эту гипотезу.

Если частота возникновения хотя бы некоторых реверсов, например по лейцину, действительно связана с продолжительностью клеточного цикла, то резонно допустить, что в предсинтетический период в клетках происходит накопление премутационных повреждений, реализующихся в мутации во время репликации ДНК, или же мутации возникают в предсинтетический период с постоянной во времени частотой. Чем продолжительнее G_1 -фаза, тем больше таких повреждений (или мутаций) должно накапливаться в клетках, и тогда безразлично, на какой среде будет проходить S -фаза: при высоком или низком содержании лимитирующего метаболита. Эти соображения были проверены следующим образом. Культуру дрожжей штамма NA3-24, синхронизованную по методике Вильямсона и Скопеса /55/, инкубировали на среде с 3 мг/л лейцина, и спустя разные интервалы времени, в течение G_1 -фазы, переносили на среду с 30 мг/л этого метаболита, где клетки быстро вступали в S -фазу и через 2-3 часа отделяли почки. До и после почкования определяли общее число содержащихся в культуре реверсов. Результаты показаны на рис. 4. Видно, что продолжительность предварительной инкубации на обедненной среде никак не влияет на ко-

нечный результат. Следовательно, не продолжительность клеточного цикла сама по себе, а только условия культивирования во время репликации ДНК определяют мутационный статус клеток.

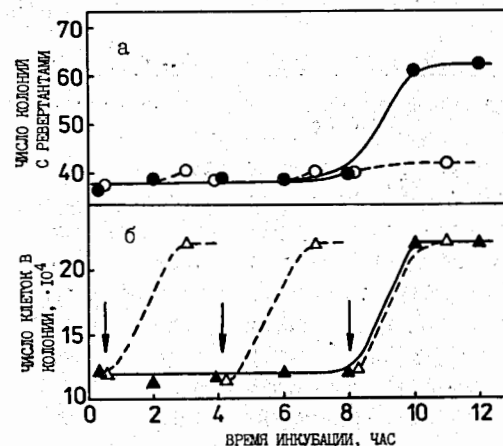
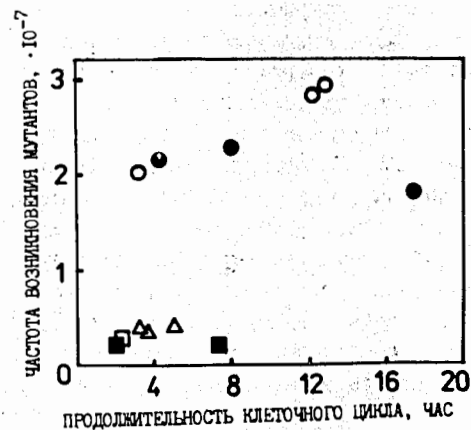


Рис. 4. Зависимость числа колоний с реверсами (в расчете на 2200 колоний, а) и числа клеток в одной колонии (почка принимается за отдельную клетку, б) от продолжительности инкубации ауксотрофных по лейцину дрожжей на разных средах. Темные значки - 3 мг/л лейцина, светлые - 30 мг/л. Стрелками показаны сроки перенесения культур с первой среды на вторую.

Рис. 5. Зависимость частоты возникновения реверсов по лейцину от продолжительности клеточного цикла при инкубации синхронизованных культур штамма NA3-24 на средах, содержащих 3 мг/л (○, ●) и 30 мг/л (△, □) лейцина. Разными значками отмечены результаты независимых опытов.



Вывод, сделанный выше, подтверждается и другим, независимым, экспериментом. Синхронизованные культуры этого же штамма дрожжей выращивали на средах с разным содержанием лейцина (3 и 30 мг/л) и через разные сроки определяли общее число клеток и число реверсов к прототрофности. Продолжительность клеточного цикла не только зависела от содержания в среде лейцина, но и варьировалась от опыта к опыту, а также изменялась во время роста синхронизованных культур. Это позволило нам

рассчитать частоты возникновения реверсов на разных средах при разных продолжительностях клеточного цикла. Результаты приведены на рис. 5. Хорошо видно, что на частоту мутирования влияет не продолжительность клеточного цикла, а только содержание в среде лимитирующего метаболита.

Спонтанная мутабельность и гипотеза дисбаланса пулов нуклеотидов

Обнаружив возрастание частоты возникновения реверсов по аденину при уменьшении содержания аденина в среде ^{/4,34/}, мы предположили, что этот феномен можно объяснить с позиций гипотезы дисбаланса пулов нуклеотидов в ее простейшем варианте ^{/17,31/}. Эта гипотеза хорошо согласуется и с тем фактом, что мутабельность генов определяется условиями культивирования только во время репликации ДНК: действительно, можно ожидать, что чем сильнее выражен дисбаланс в этот период клеточного цикла, тем чаще должны происходить ошибки репликации и, следовательно, тем выше будет частота возникновения мутаций ^{/27/}. Но различия в изменениях частот мутирования разных генов в клетках одной и той же культуры, как мы уже отмечали ^{/5/}, так просто объяснить не удастся.

Рассмотрим теперь другой подход к объяснению данных, приведенных в табл. 1-3 и на рис. 2.

Известно, что при работе на пути биосинтеза аденина у дрожжей с мутациями **ade1** или **ade2** в клетках накапливается красный пигмент (продукт полимеризации предшественника аденина) и колонии приобретают красную окраску. Это справедливо и по отношению к нашим штаммам, несущим мутацию **ade2-192**. Мы видели, что колонии этих штаммов приобретают красный цвет либо на среде, полностью лишенной аденина, либо после его исчерпания в средах, первоначально содержащих аденин в лимитирующих количествах. Это позволяет думать, что в отсутствие аденина система его биосинтеза активно "работает", но уже 1 мг/л аденина оказывается достаточно, чтобы вызвать ее репрессию. Эта репрессия, по-видимому, не полная, т.к. дальнейшее увеличение концентрации аденина в среде подавляет в несколько раз активность генов, контролирующих его синтез ^{/1,30/}. Такая регуляция конечным продуктом системы биосинтеза аденина, в том числе и гена **ADE2**, осуществляется на уровне транскрипции ^{/1/}. Можно считать поэтому, что быстрое покраснение колоний дрожжей с мутацией **ade2-192** на среде без аденина отражает резкую интенсификацию системы его биосинтеза также на уровне транскрипции, что должно сопровождаться полной дерепрессией гена **ade2**.

В наших опытах, как уже отмечалось, покраснение колоний ауксотрофных по аденину дрожжей сопровождается резким повышением частоты возникновения локусных мутаций. Это позволило нам высказать следующее предположение ^{/5/}. Допустим, что увеличение выхода супрессорных реверсов при

уменьшении в среде аденина обусловлено прямым мутагенным эффектом дисбаланса пула этого нуклеотида. Тогда значительно более выраженное увеличение выхода локусных реверсов может быть связано с изменением функционального состояния гена **ade2**: при достаточном количестве в среде аденина (1 мг/л и более) этот ген находится в репрессированном состоянии и его "чувствительность" к дисбалансу низка, а при исчерпании аденина ген **ade2** активируется и его "чувствительность" к дисбалансу резко возрастает.

Однако сколь бы ни казалась правдоподобной эта точка зрения, ее, по-видимому, следует пересмотреть в пользу более общей гипотезы. Действительно, в случае лимита по лейцину вряд ли можно говорить о дисбалансе пулов нуклеотидов даже по отношению к ауксотрофным по лейцину штаммам. В то же время зависимость выхода локусных и супрессорных реверсов к прототрофности по лейцину от содержания в среде этой аминокислоты (рис. 3) имеет такой же характер, что и зависимость выхода реверсов по аденину от наличия в среде этого нуклеотида (рис. 2). Учитывая это, можно думать, что "дисбалансный мутагенез" является частным случаем более общего механизма влияния функционального состояния генов на их мутабельность, а генная специфичность дисбалансного мутагенеза в значительной мере обусловлена регуляторным эффектом дисбаланса пулов нуклеотидов на функциональное состояние разных генов.

Гипотеза влияния функционального состояния генов на их мутабельность

Не только для гена **ade2**, но и для генов, контролирующих синтез лейцина ^{/13/}, их репрессия конечным продуктом на уровне транскрипции считается твердо установленной. Зависит ли и как функциональное состояние генов-супрессоров от содержания в среде лимитирующих метаболитов и вообще от метаболического статуса клеток, мы не знаем. Сказанного, однако, достаточно, чтобы высказать предположение, что мутабельность таких генов, как **ade2** и **leu2**, повышается при переходе от репрессированного к дерепрессированному состоянию (рис. 2 и 3). Чем это может быть обусловлено?

Как известно, дерепрессия генов у эукариот связана с существенными изменениями их конформации ^{/10/}. "Активная конформация" гена сохраняется и во время репликации ДНК ^{/26,54/}. Дерепрессированный ген становится более доступным для действия разных ферментов, чем ген, находящийся в репрессированном состоянии ^{/14,25,26,39,54/}; на нем более активно идут процессы фотореактивации ^{/36/} и темновой репарации ^{/43-45/}. Имеются и другие сведения о большей "лабильности" дерепрессированных генов. Так, у бактерий дерепрессированные гены сильнее повреждаются УФ-светом, чем гены, находящиеся в репрессированном состоянии ^{/35/}, а

при действии некоторых химических мутагенов /18,32,41/ и УФ-света /52/ частота возникновения мутаций дерепрессированных генов выше, чем репрессированных. У дрожжей дерепрессия генов сопровождается повышением частоты митотической рекомбинации /20/. К сожалению, в литературе практически нет сведений о влиянии функционального состояния гена на его спонтанную мутабельность. Только в одной работе /52/ приведены таблицы, из которых можно рассчитать, что спонтанная мутабельность одного из генов гистидинового оперона *Salmonella typhimurium* в дерепрессированном состоянии в 0,7-1,8 раза выше, чем в состоянии репрессии. Может быть, с этой точки зрения следует рассматривать и недавно опубликованную работу Кэрнса с соавт. /19/, в которой авторы, повторив опыты Луриа и Дельбрука /42/ в условиях нелетальной селекции, обнаружили, что у *Escherichia coli* в одном из генов лактозного оперона мутации возникают и после перенесения клеток на селективную среду, и интерпретировали этот результат как существование адаптивного мутагеназа. Правда, относительно этой работы имеются серьезные методические возражения /49/.

Всё, сказанное выше, позволяет рассматривать гипотезу о зависимости частоты мутирования генов от их функционального состояния как частный случай более общего утверждения о влиянии функционального состояния генетических структур на самые разные генетически значимые события, совершающиеся с участием ДНК: возникновение генных и хромосомных мутаций, осуществление репарации и рекомбинации, а, возможно, также конверсии генов, их амплификации и взаимодействия с мобильными элементами. Это делает вполне правдоподобным допущение о большей подверженности дерепрессированных генов, по сравнению с репрессированными, различным мутагенным воздействиям эндогенной природы, совокупность которых и создает мутационный фон, называемый "спонтанным мутагенезом". Тот факт, что у клеток эукариот различия в функциональном состоянии генов изменяют их мутабельность в десятки и сотни раз, а у клеток прокариот - всего в несколько раз, может быть объяснен разной структурной организацией генетического аппарата у этих групп организмов. При этом в затронутых генах должны происходить случайные разнонаправленные мутации, среди которых уже селекция может выбирать те, которые имеют адаптивную ценность. Просто в активных генах должно возникать большее число мутаций, чем в генах, находящихся в состоянии репрессии.

Большим достоинством гипотезы о влиянии функционального состояния генов на их мутабельность является ее доступность для экспериментальной проверки на самых разных живых организмах, достаточно изученных в генетическом отношении. Всё это и позволяет нам принять эту гипотезу в качестве "рабочей" для дальнейших исследований в области спонтанного и индуцированного мутагенеза.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Если будущие исследования подтвердят сформулированную выше гипотезу, это, помимо необходимости конкретизировать молекулярные механизмы влияния функционального состояния генов на их мутабельность, будет иметь по меньшей мере три следствия.

Во-первых, это будет означать естественное решение старого вопроса о влиянии внешних условий на мутационный процесс: если гены мутируют тем чаще, чем интенсивнее они "работают", то мутационный спектр клеток должен отражать функциональное состояние их генетического аппарата при данных внешних условиях. Естественно, что в таком случае мутабельность клеток следует характеризовать не одним единственным числом (например, частотой мутирования какого-либо гена), а распределением этой величины на пространстве режимов. Трудности нахождения такого распределения будут полностью окупаться его эвристичностью.

Во-вторых, зависимость мутабельности клеток от функционального состояния генов откроет возможности для изучения ряда регуляторных связей непосредственно на живых клетках, без их разрушения и препарирования. Ряд вопросов молекулярной генетики, связанных с регуляцией активности разных генов, можно будет изучать на живых объектах, используя в качестве маркеров частоты мутирования разных генов, подобно тому, как используется всплеск мутабельности в точке репликации ДНК для картирования хромосом бактерий. Не исключено, что некоторые химические мутагены будут усиливать мутационный эффект функционального состояния генома, выступая в роли своеобразного микроскопа.

В-третьих, очевидно значение описанного феномена (если он получит статус всеобщности) для изучения дифференцировки клеток и тканей в онтогенезе и в иммунной системе и, как уже отмечали Герман и Дворкин /32/, для общей теории эволюции.

Совершенно ясно, что феномен этот не имеет никакого отношения ни к "адаптивному мутагенезу", ни к наследованию приобретаемых свойств. Однако и представлению о полной независимости мутагенеза от условий обитания придется уступить место представлениям об определенной "направленности" мутационного процесса, в том смысле, что гены, интенсивнее работающие в данных условиях среды, чаще мутируют и тем самым представляют собой более лабильный материал для естественного отбора, нежели стабильные, консервативные, в данных условиях не используемые гены.

Изложенную выше систему представлений можно назвать "функциональной концепцией мутационного процесса".

ЛИТЕРАТУРА

1. Аленин В.В., Домкин В.Д., Ковалева А.А., Смирнов М.Н. (1987) Регуляция экзогенным аденином экспрессии генов ADE2 и ADE1, кодирующих структуру двух ферментов пуринового биосинтеза у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Биополимеры и клетка, 3,325-326.
2. Захаров И.А., Кожин С.А., Кожина Т.Н., Федорова И.В. (1984) Сборник методик по генетике дрожжей-сахаромицетов. Л.: Наука.
3. Ильина В.Л., Корогодина В.И. (1987) Доказательство реальности увеличения частоты возникновения реверсов у гаплоидных дрожжей при уменьшении содержания аденина в среде. Генетика, 23,630-636.
4. Ильина В.Л., Корогодина В.И., Файси Ч. (1985) Влияние содержания аденина в питательной среде на частоту возникновения реверсов у гаплоидных дрожжей. Генетика, 21,1643-1649.
5. Ильина В.Л., Корогодина В.И., Файси Ч. (1987) Зависимость частоты образования реверсов разных типов у ауксотрофных по аденину дрожжей от содержания аденина в среде. Генетика, 23,637-642.
6. Керкис Ю.Я. (1939) Влияние температуры ниже 0° на мутационный процесс и некоторые соображения о причинах спонтанного мутационного процесса. Доклады АН СССР, 24,388-390.
7. Керкис Ю.Я. (1940) Физиологические изменения в клетке как причина мутационного процесса. Успехи совр. биол., 12,143-159.
8. 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. (1988) Спонтанный мутагенез и условия культивирования клеток. Препринт ОИЯИ, Р19-88-351, Дубна. (Направлено в сборник: "Онтогенез, эволюция, биосфера", Наука).
- 8а. Корогодина В.Л., Колтовая Н.А., Любимова К.А., Корогодина В.И., Файси Ч. (1988) Оценка вклада двойных мутантов в регистрируемый спектр реверсов, возникающих у ауксотрофных дрожжей. Сообщение ОИЯИ, Р19-88-835, Дубна.
- 8б. Корогодина В.Л., Корогодина В.И., Файси Ч. (1988) Динамика выявления локусных и супрессорных реверсов при инкубации ауксотрофных по аденину дрожжей на селективной среде. Сообщение ОИЯИ, Р19-88-766, Дубна.
9. Лобашев Н.Е. (1947) Физиологическая (паранекротическая) гипотеза мутационного процесса. Вестник Ленинградского ун-та, No. 8, 10-29.
10. Преображенская О.В., Карпов В.Л., Нагорская Т.В., Мирзабеков А.Д. (1984) Структура хроматина, активного в транскрипции. Молекулярная биология, 18,8-20.
11. Хромов-Борисов Н.Н. (1973) - В кн.: Конференция по генетике промышленных микроорганизмов. Шахкадзор. Тез. докладов. М., Наука, с. 35.
12. Чепурной А.И., Михова-Ценова Н. (1988) Закономерности выявления мутантов на селективных средах. Генетика, 24,1572-1578.
13. Andreadis A., Hsu Y.-P., Hermodson M., Kohlhaw G., Schimmel P. (1984) Yeast LEU2. Repression of mRNA levels by leucine and primary structure of the gene product. J. Biol. Chem., 259,8059-8062.
14. Bakayev V.V., Schmatchenko V.V., Georgiev G.P. (1979) Subnucleosome particles containing high mobility group proteins HMG-E and HMG-G originate from transcriptionally active protein. Nucleic Acids Res., 7,1525-1540.
15. Bornschein H., Dittrich W., Hühne G. (1951) Zur Entstehung der Chemoresistenz bei Bakterien. Naturwissenschaften, 38,383.
16. Brendel M. (1985) Mutation induction by excess deoxyribonucleotides. In: de Serres F.J. (ed) Genetic consequences of nucleotide pool imbalance. Plenum Press, New York, p. 425-434.
17. Bresler S., Mosevitsky M., Vyacheslavov L. (1973) Mutations as possible replication errors in bacteria growing under conditions of thymine deficiency. Mutation Res., 19,281-293.
18. Brock R.D. (1971) Differential mutation of the β -galactosidase gene of *Escherichia coli*. Mutation Res., 11,181-186.
19. Cairns J., Overbaugh J., Miller S. (1988) The origin of mutants. Nature, 335,142-145.
20. Clavilier L., Luzzati M., Slonimski P.P. (1960) Sur la conversion du gène *ad3* chez la levure. Compt. Rend. Soc. Biol. (Paris), 154,1970-1974.
21. Coughlin A., Adelberg E.A. (1956) Bacterial mutation induced by thymine starvation. Nature, 178,531-532.
22. Dean A.C.R., Hinshelwood C.N. (1951) Induced and other variations in bacterial cultures. J. Chem. Soc., 1157.
23. Eckardt F., Kunz B.A., Haynes R.H. (1983) Variation of mutation and recombination frequencies over a range of thymidylate concentrations in a diploid thymidylate auxotroph. Current Genetics, 7,399-402.
24. Fox M.S. (1955) Mutation rates of bacteria in steady-state populations. J. Gen. Physiol., 39,267-278.

25. Gazit B., Cedar H., Lerer I., Voss R. (1982) Active genes are sensitive to deoxyribonuclease I during metaphase. *Science*, 217,648-650.
26. Gazit B., Panet A., Cedar H. (1980) Reconstitution of a deoxyribonuclease I-sensitive structure on active genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77,1787-1790.
27. de Serres F.J. (Editor) (1985) Genetic consequences of nucleotide pool imbalance. Plenum Press, New York.
28. Weinberg R., Latham A.B. (1956) Apparent mutagenic effect of thymine deficiency for a thymine-requiring strain of *Escherichia coli*. *J. Bact.*, 72,570-572.
29. Gottschevsky G. (1934) Untersuchungen an *Drosophila melanogaster*. Über die Umstimmbarkeit des Phänotypus und Genotypus durch Temperatureinfluss. *Ztschr. ind. Abst.- u. Vererbungsl.*, 67,477-528.
30. Gross T.S., Woods R.A. (1972) Regulation of *de novo* purine nucleotide synthesis by enzyme repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Heredity*, 28,275.
31. Haynes R.H. (1985) Molecular mechanisms in genetic stability and change: The role of deoxyribonucleotide pool balance. In: de Serres (ed) Genetic consequences of nucleotide pool imbalance. Plenum Press, New York, p. 1-23.
32. Herman R.K., Dworkin N.B. (1971) Effect of gene induction on the rate of mutagenesis by ICR-191 in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 106,543-550.
33. Hinshelwood C.N. (1950) Chemistry and bacteria. *Nature*, 166,1089.
34. Ilyina V.L., Korogodin V.I., Fajsz Cs.: Dependence of spontaneous reversion frequencies in haploid yeasts of different genotypes on the concentration of adenine in the medium and on the age of the culture. *Mutation Res.*, 174, 189-194.
35. Kölsch E., Starlinger F. (1965) A difference in UV-sensitivity between genes in the repressed and genes in the de-repressed state. *Z. Vererbungsl.*, 96,297-303.
36. Kölsch E., Starlinger F. (1965) A difference in the photoreactivation of UV-damage between genes in the repressed and genes in the de-repressed state. *Z. Vererbungsl.*, 96,304-306.
37. Kubitschek H.E., Bendigkeit H.E. (1964) Mutation in continuous cultures. I. Dependence of mutational response upon growth limiting factors. *Mutation Res.*, 1,113-120.
38. Kunz R.A. (1982) Genetic effects of deoxyribonucleotide pool imbalances. *Environmental Mutagenesis*, 4,695-725.
39. Lancillotti F., Lopez M.C., Aniss P., Alonso C. (1987) Z-DNA in transcriptionally active chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84,1560-1564.
40. Lederberg J., Lederberg E.M. (1952) Replica plating and indirect selection of bacterial mutants. *J. Bacteriol.*, 63,399-406.
41. Lipschutz R., Falk R., Avigad C. (1965) Mutation rates of the induced and repressed locus of alkaline phosphatase in *Escherichia coli*. *Israel J. Medical Sci.*, 1,323-324.
42. Luria S.E., Delbrück H. (1943) Mutations of bacteria from virus sensitivity to virus resistance. *Genetics*, 28,491-511.
43. Madhani H.D., Bohr V.A., Hanawalt P.C. (1986) Differential DNA repair in transcriptionally active and inactive proto-oncogenes: c-abl and c-mos. *Cell*, 45,417-423.
44. Mellon I., Bohr V.A., Smith C.A., Hanawalt P.C. (1986) Preferential DNA repair of an active gene in human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83,8878-8882.
45. Mellon I., Spivak G., Hanawalt P.C. (1987) Selective removal of transcription-blocking DNA damage from the transcribed strand of the mammalian DHFR gene. *Cell*, 51, 241-249.
46. Muller H.J., Altenburg E. (1919) The rate of change of hereditary factors in *Drosophila*. *Proc. Soc. exp. Biol. and Med.*, 17,10-13.
47. Novick A., Szilard L. (1951) Experiments on spontaneous and chemically induced mutations of bacteria growing in the chemostat. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 16,337-343.
48. Novick A., Szilard L. (1950) Experiments with the chemostat on spontaneous mutations of bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 36,708-719.
49. Partridge L., Morgan M. (1988) Is bacterial evolution random or selective? (Correspondence). *Nature*, 336,22.
50. Ryan F.J. (1952) Adaptation to use lactose in *Escherichia coli*. *J. gen. Microbiol.*, 7,69-88.
51. Ryan F.J. (1952) Distribution of numbers of mutant bacteria in replicate cultures. *Nature*, 168,882-883.
52. Savič D.J., Kanazir D.T. (1972) The effect of a histidine operator-constitutive mutation on UV-induced mutability within the histidine operon of *Salmonella typhimurium*. *Molec. gen. Genet.*, 118,45-50.

53. Timofeeff-Ressovsky N.W., Zimmer K.G., Delbrück M. (1935) Über die Natur der Genmutation und der Genstruktur. Nachr. Ges. Wiss. Göttingen, Math.-Physik. Klasse, Fachgr. 6, Biol., 1, 189-245.
54. Weisbrod S., Weintraub H. (1979) Isolation of a subclass of nuclear proteins responsible for conferring a DNase I-sensitive structure on globin protein. Proc. Natl. Acad. Sci., 76, 630-634.
55. Williamson D.H., Scopes A.W. (1962) A rapid method for synchronizing division in the yeast *Saccharomyces*. Nature, 193, 256-257.

Рукопись поступила в издательский отдел
3 апреля 1989 года.