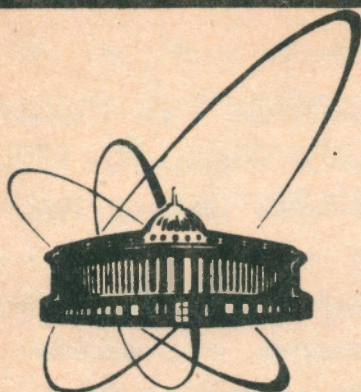


92-421



СООБЩЕНИЯ  
ОБЪЕДИНЕННОГО  
ИНСТИТУТА  
ЯДЕРНЫХ  
ИССЛЕДОВАНИЙ  
ДУБНА

P19-92-421

Н. В. Левкович, А. И. Чепурной

КИНЕТИКА ОБРАЗОВАНИЯ УФ-ИНДУЦИРОВАННЫХ  
РЕВЕРСОВ ПО ГЕНУ *leu2* У ГАПЛОИДНЫХ  
ДРОЖЖЕЙ *Saccharomyces cerevisiae*

1992

Применение новой методики количественного учета мутантов (Чепурной с соавт., 1989), основанной на использовании ядерных фильтров (Флеров, 1984) и знании кинетики выявления мутантов на селективных средах, позволило на примере образования реверсов по гену *leu2* показать, что возникновение  $\gamma$ -индуцированных мутантов не является одномоментным, а растянуто во времени в зависимости от того, в какой фазе клеточного цикла клетки были облучены (Чепурной, Михова-Ценова, 1988). При облучении клеток, находящихся в экспоненциальной фазе роста, возникновение мутантов растягивается до 15 часов, в G<sub>1</sub>-фазе клеточного цикла - до 6 часов, в G<sub>2</sub> - основное количество индуцированных мутантов образуется между 12 и 15 часами пострадиационного инкубирования облученных клеток. В отсутствие репликации ДНК образования  $\gamma$ -индуцированных мутантов не происходит.

Репарационные процессы, обуславливающие возрастание радиорезистентности клеток в G<sub>2</sub>- фазе клеточного цикла по сравнению с G<sub>1</sub>, не изменяют частоту образования  $\gamma$ -индуцированных реверсов. В диапазоне от 24 до 2000 Гр частота индукции реверсий линейно возрастает с увеличением дозы излучения. В опытах с синхронной культурой клеток было обнаружено, что  $\gamma$ -индуцированные реверсы образуются во время первых трех пострадиационных репликаций (Levkovich, Cherpurnoy, 1992). В G<sub>1</sub>- и G<sub>2</sub>- фазах клеточного цикла образования мутантов не происходит. (Чепурной, Михова-Ценова, 1989).

В настоящей работе представлены закономерности образования УФ-индуцированных реверсов посредством анализа кинетики их образования в период пострадиационного инкубирования облученной культуры клеток.

#### Материалы и методы

В работе использовались гаплоидные дрожжевые клетки NA3-24 (a *leu2-1 lys1-1 can1-23 RAD*). В качестве мутантов наблюдались реверсы по гену *leu2*.

Суспензию синхронизированных по методу Williamson and Scores (1962) клеток облучали УФ-излучением (БУФ-30) при мощности дозы  $P \approx 2 \text{ Дж/м}^2 \cdot \text{с}$  и рассеивали методом упорядоченного посева (Von Borstel, 1978) на поверхность твердой питательной среды, покрытой лавсановыми ядерными фильтрами (Флеров, 1984). На одну чашку наносилось 220 инокулюмов. Инокулированные клетки выращивали в термостате при 30°C. По истечении требуемого времени несколько десятков колоний ресуспендировали в воде для микроскопирования с целью определения количества клеток в одной колонии. Почки считали как отдельные клетки. Для оценки содержания мутантов колонии вместе с фильтрами переносили на селективную среду, где мутанты образуют колонии вторичного роста. Число жизнеспособных клеток определяли по количеству выросших колоний при посеве на полную среду П (Захаров, 1984).

В качестве ростовой питательной среды использовали минимальную среду ММ<sub>300</sub> (Захаров, 1984) с добавками лизина (30 мг/л) и лейцина (30 мг/л). В качестве селективной среды для выявления реверсов по гену *leu2* - среду ММ<sub>300</sub> с лизином.

Количественную оценку мутантов в культуре в момент переноса клеток на селективную среду производили по их числу в первой волне кривой выявления по методике, подробно описанной ранее (Чепурной, Михова-Ценова, 1988).

Расчет частоты мутирования производили по формуле:

$$R = \frac{1}{n} \cdot \ln \frac{N}{N_0}, \quad (1)$$

где  $n$  - число клеток в одной колонии,  $N$  - общее число колоний,  $N_0 = (N-M)$  - число колоний без мутантов,  $M$  - число колоний с мутантами.

## Результаты

Данные, отражающие кинетику образования УФ-индуцированных реверсов в облученной в G<sub>1</sub>-фазе клеточного цикла синхронизированной культуре клеток в течение первых четырех генераций после облучения, представлены на рис.1. Следует обратить внимание, что УФ-индуцированные реверсы возникают сразу же после облучения культуры и во время первых двух пострadiационных репликаций ДНК.

Не исключено, что индуцированные ультрафиолетом реверсы образуются и после второй генерации клеточной культуры, но их число находится в пределах ошибки эксперимента и при помощи

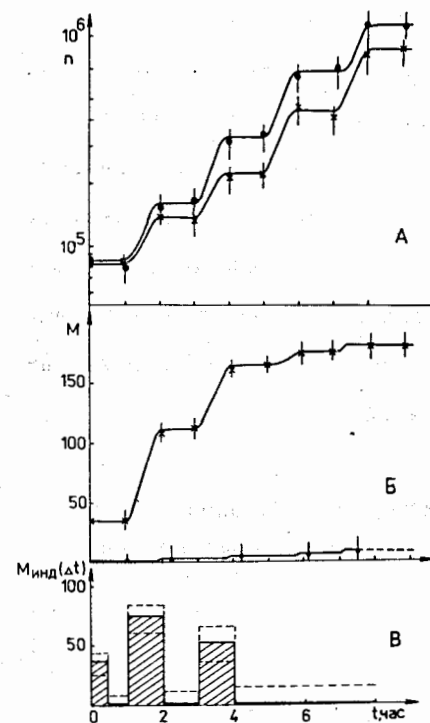


Рис. 1. Спонтанный и УФ-индуцированный мутагенез в клетках штамма NA3-24 в течение первых четырех генераций после облучения в G<sub>1</sub>-фазе клеточного цикла в дозе 10 Дж/м<sup>2</sup>. А - число клеток в одной колонии в необлученной (●) и облученной (×) культурах. Б - количество колоний с реверсами по гену *leu2* в выборках из N=660. В - прирост числа колоний с УФ-индуцированными реверсами за промежутки времени.

данной методики учесть их число не представляется возможным. Образование индуцированных реверсов во второй и, может быть, в третьей после облучения фазах репликации ДНК является, на наш взгляд, следствием возможности сохранения в клетках премутационных повреждений без реализации их в мутации в течение нескольких делений. Другое объяснение, что повреждения ДНК задерживают рост клеток на период, пока

клетки с неповрежденной ДНК успеют совершить 2 или 3 генерации, маловероятно, т.к. в такой ситуации следовало бы ожидать монотонного, а не дискретного образования УФ-индуцированных реверсов вследствие дисперсии задержки деления у получивших повреждения клеток. Если воспользоваться вероятностью  $r$  возникновения мутаций в  $i$ -й генерации, то при сравнении кинетик образования реверсов, полученных при разных дозах, можно заметить, что доза облучения не влияет на характер изменения  $r$  во времени (рис.2).

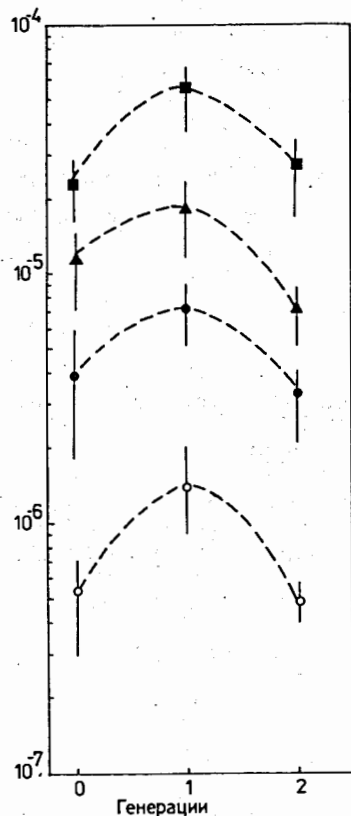


Рис.2. Вероятность возникновения УФ-индуцированных реверсов в период пострadiационного инкубирования при облучении в дозах 10 Дж/м<sup>2</sup> (○), 20 Дж/м<sup>2</sup> (●), 40 Дж/м<sup>2</sup> (▲) и 80 Дж/м<sup>2</sup> (■).

В табл.1 приведены данные, отражающие долю мутантов, возникающих в каждой генерации для разных доз УФ-излучения.

Одинаковый характер кривых  $r(t)$  позволяет провести усреднение, в результате которого получаем, что сразу после облучения возникает 23±8%, во время первой пострadiационной репликации - 48±3% и во время второй - 29±10% реверсов от общего количества УФ-индуцированных реверсов.

Таблица 1  
Доля реверсов, образующихся в период пострadiационного инкубирования после УФ-облучения клеток штамма НАЗ-24

Доза, Дж/м <sup>2</sup>	Всего	% от общего количества реверсов		
		без деления	в первой репликации	во второй репликации
10	100%	16	49	35
20	100%	27	49	24
40	100%	32	51	17
80	100%	18	44	38
Средние значения	100%	23±8	44±3	29±10

На рис.3 представлена зависимость суммарной частоты возникновения УФ-индуцированных реверсов по гену *leu2* от дозы УФ-излучения.

В рассматриваемом диапазоне доз УФ-излучения кривая имеет вид квадратичной функции. Существует несколько различных гипотез для объяснения квадратичной зависимости индукции мутаций УФ-лучами. Одна из них - двухударный механизм, т.е. необходимость взаимодействия двух повреждений для образования мутации (Бреслер, 1980).

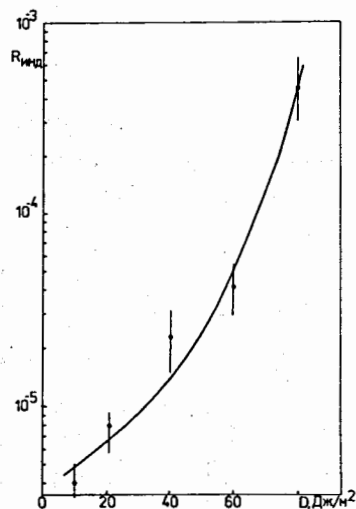


Рис. 3. Зависимость частоты образования реверсов по гену *leu2* от дозы УФ-излучения

На основе полученных данных можно в качестве нулевого варианта предложить следующий возможный механизм возникновения УФ-индуцированных мутаций, объясняющий возрастающе-убывающий характер зависимости  $r$  от времени пострадиационного инкубирования.

Пусть два премутационных повреждения расположены в области гена *leu2* на разных нитях ДНК. Если репарация эксцизионного типа началась одновременно на двух нитях, это с

большой вероятностью может привести к возникновению двунитевого разрыва, а следовательно, и к летали. Т.к. после облучения выживаемость клеток высока, то можно допустить, что премутационные повреждения репарируются не одновременно.

Рассмотрим случай, когда первым начинает репарироваться повреждение, расположенное на транскрибируемой нити ДНК гена *leu2* (рис. 4).

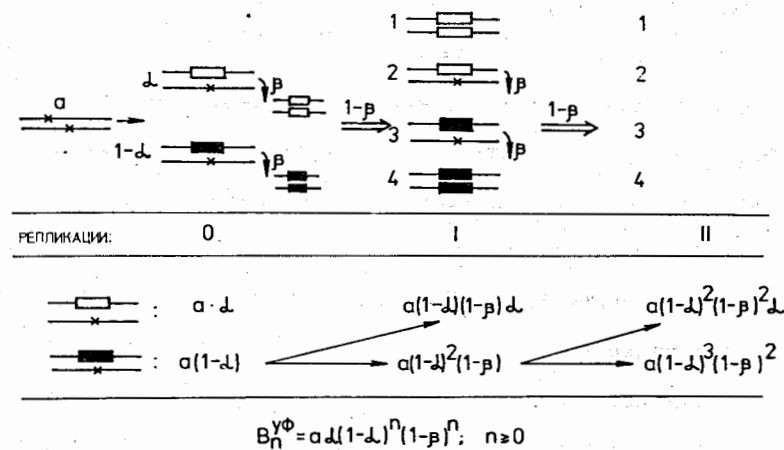


Рис. 4. Возможная схема образования УФ-индуцированных мутаций в случае, если в первую очередь репарируется основание, расположенное на транскрибируемой нити ДНК гена *leu2* (объяснение в тексте)

Тогда во время репарации с вероятностью  $\alpha$  напротив повреждения в другой нити ДНК появится основание, которое приведет к образованию реверса. Образование мутантов во время следующих репликаций возможно за счет подстановки необходимых

для реверсии оснований напротив других повреждений в нетранскрибируемой нити ДНК гена *leu2*, еще не реализовавшихся в мутации и оставшихся неотрепарированными к моменту следующей репликации. Таким образом, если первым начинает репарироваться повреждение, расположенное на кодирующей нити, число возникающих реверсов будет описываться выражением:

$$B_n^{y\Phi} = a \cdot \alpha (1-\alpha)^n (1-\beta)^n, \quad n \geq 0;$$

где  $a$  - число повреждений в нити ДНК, противоположной кодирующему участку гена *leu2*,  $\alpha$  - вероятность, с которой напротив повреждения может появиться основание, которое приведет к образованию реверса,  $\beta$  - вероятность, с которой повреждение может быть отрепарировано к моменту S-фазы следующего клеточного цикла,  $n$  - число генераций.

Если репарация эксцизионного типа началась раньше на нити, противоположной транскрибируемому участку ДНК, то во время достраивания расчищенного участка, напротив оставшегося на противоположной нити повреждения может оказаться основание, приводящее после комплементарного отображения к реверсии (рис. 5).

В рассматриваемом случае реверсы образуются в результате репарации повреждений в кодирующем участке по комплементарной ему отрепарированной нити или в последующих репликациях ДНК. Число реверсов, возникающих в результате репарации в промежутках от  $n$  до  $n+1$ -й S-фазы пострadiационного инкубирования будет:

$$B_{n \rightarrow n+1}^{y\Phi} = a \cdot \alpha \beta (1-\alpha)^n (1-\beta)^n, \quad n \geq 0.$$

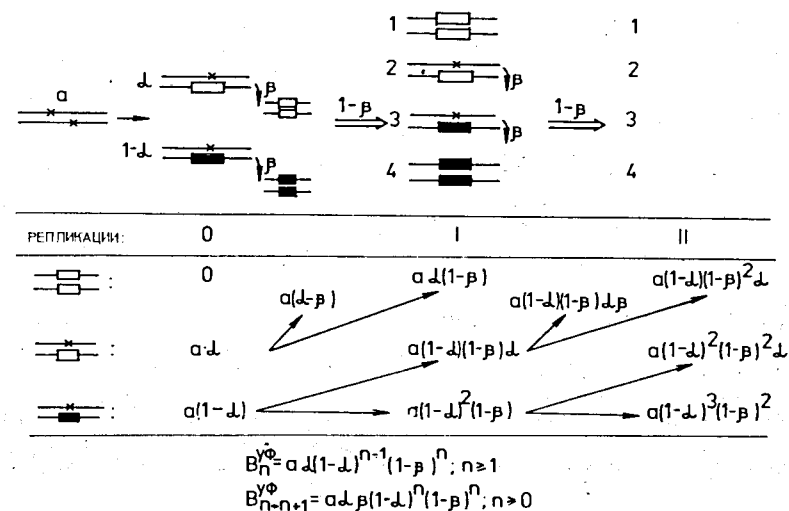


Рис. 5. Возможная схема образования УФ-индуцированных мутаций для случая, если премутационное повреждение, находящееся напротив кодирующего участка ДНК гена *leu2*, репарировается в первую очередь

Число мутантов, образовавшихся во время пострadiационных репликаций ДНК:

$$B_n^{y\Phi} = a \cdot \alpha \beta (1-\alpha)^n (1-\beta)^n, \quad n \geq 1.$$

Все зависимости  $B(n)$  имеют ниспадающий характер, но при суммировании дают возрастающе-убывающую зависимость прироста числа УФ-индуцированных реверсов. Сопоставляя предложенное описание с экспериментальными данными, получаем:  $\alpha = 0.3 \pm 0.2$ , т.е. замена одного, максимум двух нуклеотидов приводит к образованию реверса.



## Заключение

Как указывалось выше, целью настоящей работы было изучение мутагенного действия УФ-излучения на гаплоидные дрожевые клетки *Saccharomyces cerevisiae* посредством анализа кинетики образования индуцированных мутантов в период пострадиационного инкубирования. Полученные данные позволяют надеяться, что предложенный подход может оказаться перспективным в плане получения новых сведений о мутационных закономерностях у *Saccharomyces cerevisiae*. Если изучение мутагенеза через анализ зависимости частот мутирования от дозы излучения можно назвать интегральным подходом, то предложенный анализ является как бы дифференциальным, учитывающим более тонкие аспекты индуцированного мутагенеза. Само по себе наблюдение, что образование индуцированных мутантов - процесс длительный, явление чрезвычайно интересное и достойное дальнейшего изучения. Следует сказать, что впервые эту особенность мутагенеза описал Demerec в 1946 году, однако до настоящего времени этот аспект мутагенеза оставался в тени.

Предложенные нами механизмы образования индуцированных реверсов, конечно, не лишены недостатков, но в качестве первой интерпретации - рабочей схемы - они вполне годятся, поскольку объясняют возрастающе-убывающий характер прироста индуцированных реверсов. Проследить дальнейший прирост индуцированных мутантов, к сожалению, не представляется

возможным в рамках использованной методики из-за ошибки эксперимента. Возможно, что эксперименты в жидких питательных средах смогут дать дополнительные сведения на этот счет. Но даже и имеющаяся информация уже позволяет производить определенные рассуждения о путях мутагенеза. В этом плане, конечно, представляется весьма интересным и необходимым получение и изучение аналогичных кинетик у мутантов по генам RAD3, RAD6 и RAD52, причем с использованием тест-систем как по обратным, так и по прямым мутациям.

## Список литературы

1. Бреслер С.Е. - Повреждение и репарация ДНК, Пушино, 1980, с.16-26.
2. Захаров И.А., Кожин С.А., Кожина Т.Н. и Федорова И.В. - Сборник методик по генетике дрожжей-сахаромицетов, Ленинград; Наука, 1984.
3. Флеров Г.Н. - Синтез сверхтяжелых элементов и применение методов ядерной физики в смежных областях. Вестник АН СССР, 1984, №4, с.35-48.
4. Чепурной А.И., Михова-Ценова Н. - Закономерности выявления мутантов на селективных средах, Генетика, 1988, 24, №9, с.1572-1578.

5. Чепурной, А.И., Михова-Ценова Н., Брунцкова Х. -  
Закономерности образования  $\gamma$ -индуцированных мутантов у  
*Saccharomyces cerevisiae*, *Генетика*, 1989, **25**, №7, с.1179-1187.

6. Demerec M. - Induced mutations and possible mechanisms  
of the transmission of heredity in *Escherichia coli*,  
*Proc.N.A.S.*, 1946, **32**, №2, p.36-46.

7. Levkovich N.V., Chepurnoy A.I. - A study of gamma-ray  
mutagenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. Analysis of reversion  
production kinetics in a wild-type haploid strain. Preprint  
of JINR E19-92-257, Dubna, 1992.

8. Von Borstel R.C. - Measuring Spontaneous Mutation Rate  
in Yeast, in: D.M.Prescott (Ed.), *Methods in Cell Biology*,  
Academic Press, 1978, **20**, N.Y., pp.1-24.

9. Williamson, D.H. and A.W.Scopes - A rapid method for  
synchronizing division in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*,  
*Nature*, 1962, **193**, p.256.

Рукопись поступила в издательский отдел  
16 октября 1992 года.

Левкович Н.В., Чепурной А.И. P19-92-421  
Кинетика образования УФ-индуцированных  
реверсов по гену *leu2* у гаплоидных дрожжей  
*Saccharomyces cerevisiae*

Обнаружено, что после облучения синхронизированной культуры  
дрожжевых клеток УФ-лучами в  $G_1$ -фазе клеточного цикла индуци-  
рованные излучением реверсы по гену *leu2* образуются сразу после  
облучения и в двух первых пострadiaционных фазах репликации  
ДНК; в промежутках между двумя фазами репликации ДНК обра-  
зования индуцированных реверсов не наблюдается. Предлагается  
для изучения мутационных процессов использовать, помимо извест-  
ных подходов, еще и анализ пострadiaционной кинетики образования  
индуцированных мутантов. Предложены гипотетические схемы,  
объясняющие возрастающе-убывающий характер образования УФ-  
индуцированных реверсов в период пострadiaционной инкубации  
облученных клеток.

Работа выполнена в Лаборатории ядерных проблем ОИЯИ.

Сообщение Объединенного института ядерных исследований. Дубна 1992

Перевод авторов

Levkovich N.V., Chepurnoi A.I. P19-92-421  
UV-Induced Reversion Production Kinetics  
in Haploid Strain *Saccharomyces cerevisiae*

After UV-irradiation of synchronized yeast culture in  $G_1$ -phase of cell  
cycle, radiation-induced *leu2* reversions are found to be formed immedi-  
ately after irradiation and in the first two post radiation phases of DNA  
replication. In periods between two phases of replication formation of  
induced reversions was not observed. The analysis of post radiation forma-  
tion kinetics of induced mutants is proposed to be used together with  
other known approaches for studying mutation processes. Hypothetical  
schemes are proposed to explain the ascending-descending trend in forma-  
tion of UV-induced reversions during post radiation growth of irradiated  
cells.

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

Communication of the Joint Institute for Nuclear Research. Dubna 1992