

6. Anderson S., Bankier A. T., Barrell B. C., de Bruijn M. L. H., Coulson A. R., Drouin J., Eperon I. C., Nierlich D. P., Roe B. A., Sanger F., Schreier R. H., Smith A. J. H., Staden B., Young I. D. Nature, 290, 457, 1981.
7. Blbb M. J., Van Elten R. A., Wright C. T., Walberg M. W., Clayton D. A. Cell, 26, 167, 1981.
8. Brock Ch. R., Walker J. E. Biochemistry, 19, 2873, 1980.
9. Chomlin A., Cleer M. W. J., Ragan C. I., Riley M., Doolittle R. F. Science, 234, 614, 1986.
10. Chomlin A., Ragen C. I., Matsun—Yagi A., Hatefi Y., Doolittle R. F., Attardi G. Nature, 314, 592, 1985.
11. Cleary D. O., Wolstenbalme D. R. J. of Molecular evol., 22, 252, 1985.
12. Cole S. T. Eur. J. Biochem., 122, 479, 1982.
13. Cole S. S., Grundström T., Jaurin B., Robinson J. J., Weiner J. H. Eur. J. Biochem., 126, 211, 1982.
14. Commak R. Chemica scripta, 21, 87, 1983.
15. Dayhoff M. O., Barker W. C., Hunt L. T. In: "Methods in Enzymology, *AP*, 524, New York, 1983.
16. Dikerson R. E., Yimkovich R., Alanassy R. J. J. Mol. Biol., 100, 473, 1976.
17. Feaster W., Kwok L., Epstein Ch. Amer. J. Human Genet., 29, 563, 1977.
18. Harris J. I., Auffret A. D., Northop P. D., Walker J. E. Eur. J. Biochem. 106, 297, 1980.
19. Jabach I. R., Farh D. J., Kerschenshteiner D. A., Deutch H. V. Biochemistry, 19, 2310, 1980.
20. Roe B. A., Ma D.—P., Wilson R. K., Wong F.—H. J. Biol. Chem., 260, 9759, 1985.
21. Steinman H. M. J. Biochem., 253, 8708, 1978.
22. Steinman H. M., Hill R. L. PNAS USA, 70, 3725, 1973.
23. Voordouw G., Brenner S. Eur. J. Biochem., 159, 347, 1986.
24. Wakabayashi S., Matsubara H., Kin Ch. H., Kawai K., King T. E. Bioch. Biop^h. Res. Communication, 97, 1548, 1980.
25. Yong I. E., Roger B. L., Campbell H. D., Jaworsky A., Shau D. C. Eur. J. Biochem., 116, 165, 1981.

Поступило 26.VI 1989 г.

Биолог. ж. Армении, № 9—10. (42). 1989 г.

УДК 575.224:582.282.23

ВЛИЯНИЕ СОСТАВА СРЕДЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ НА ЧАСТОТУ СПОНТАННОГО МУТИРОВАНИЯ ДРОЖЖЕЙ

В. Л. КОРОГОДИНА, В. И. КОРОГОДИН, Н. В. СИМОНЯН*, Ч. ФАЯСИ**

Объединенный институт ядерных исследований, Дубна,

* Ереванский физический институт, ГКАЗ СССР, Ереван,

** Институт биофизики АН ВНР, г. Сегед

Քայլ է արված, որ տարբեր միջավայրերի *Saccharomyces cerevisiae* խմորանկերի ուներսիան դեպի պրոտրոֆություն տեղի է ունենում տարբեր արագություններով: Մենդամիջավայրում անհրաժեշտ մետաբոլիտի կոնցենտրացիայի փոքրացմանը զուգընթաց մեծանում է ուներսիայի հաճախականությունը ըստ տվյալ զեննի: Այդ փոփոխությունը լոկուսային ուներսիայի համար ավելի է արտահայտված, քան՝ սուպրաոտրային:

It was shown that in *Saccharomyces cerevisiae* yeasts reversions to prototrophy occur with different rates on different media. With a decrease

of the concentration of the necessary metabolite in the medium, the frequency of reversion of the corresponding gene increases. This dependence is more pronounced for locus revertants than for suppressors.

Гипотеза о том, что мутабельность—величина переменная и зависит от условий внешней среды, Лобашев сформулировал еще сорок лет назад [8]. Систематические исследования таких явлений начали появляться лет 15 назад в работах, посвященных дисбалансу пулов нуклеотидов [19, 27].

Эксперименты *in vitro* показали, что точность репликации зависит от баланса пулов нуклеотидов [25, 26].

Отклонение от равновесия концентрации одного из нуклеотидов вызывает изменение пулов других нуклеотидов путем влияния на ферменты путей биосинтеза [31, 32, 35].

Дисбаланс приводит к разнообразным эффектам, в том числе к повышению мутабельности генов [12—14, 16, 27, 38].

Исследования некоторых авторов показали генную специфичность феномена повышения мутабельности при дисбалансе [12, 13, 17].

Основные результаты были получены на бактериях при лимите тимину и тимидину [1, 13, 14, 16, 22]. На дрожжах-сахаромицетах исследования проводились по дисбалансу тимина в среде [11, 12, 17, 27].

Целью нашей работы было исследование зависимости спонтанной мутабельности дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* от содержания аденина в среде культивирования.

Материал и методика. Опыты были поставлены на гаплоидных ауксотрофных по аденину дрожжах *Saccharomyces cerevisiae* штамма P-192 (a ade 2-192). Среда культивирования даны в работах [2, 3]. Среди реверсий к прототрофности мы наблюдали два типа мутаций: «локусные»—мутации в гене *ade 2*, и супрессорные, влияющие на биосинтез не только аденина, но и других метаболитов. Схема методики регистрации мутантов приведена на рис. 1. Клетки высевали с помощью инокулятора на ядерные

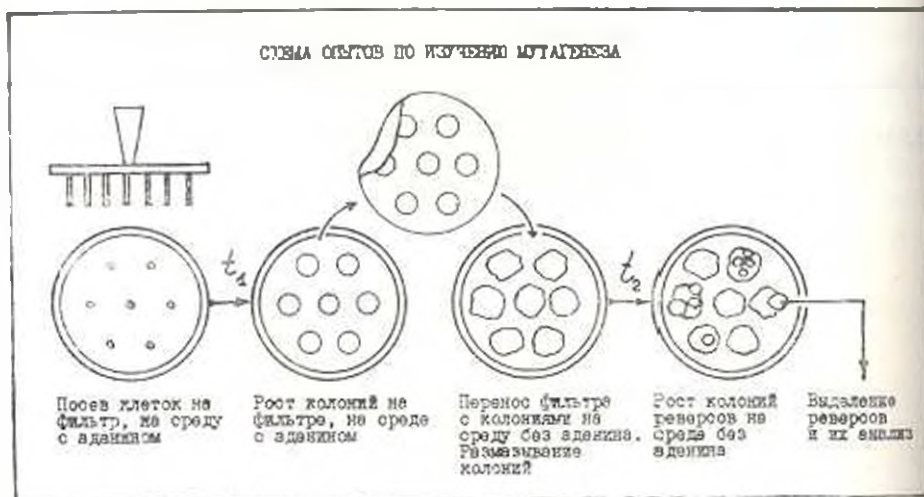


Рис. 1. Схема опытов по изучению мутагенеза.

фильтры, покрывающие агаризованную питательную среду. После инкубации в течение требуемого времени фильтры переносили в чашки Петри на селективную среду, содержащую аденин, а выросшие колонии растирали. Во время культивирования на

селективной среде (10—14 суток) на мазках появлялись колонии реверсов—либо группами («множественные реверсы соответствующие мутациям, произошедшим до переноса фильтров на селективную среду»), либо поодиночке («единичные», соответствующие реверсам, возникающим во время остаточного роста колоний) [7]. Регистрируя множественные и единичные реверсы во времени и определяя их фенотип (окраску колоний и потребность в метаболитах) и генотип, можно подсчитывать количество локусных и супрессорных реверсов, возникающих на исходной и селективной средах. Генетический анализ показал, что определяемый нашими методиками фенотип реверсов хорошо соответствует их генотипу (на бедных средах колонии локусных реверсов белые, а супрессорных, как и исходного штамма, розовые) [6]. Это позволяет определять выход локусных и супрессорных реверсов и их соотношение при заданных условиях культивирования в любой период роста культуры. Определив прирост клеток исходного штамма в колониях, можно рассчитать частоту ревертирования в этом интервале времени. Количество реверсов каждой выделяемой группы в наших опытах составляло, по меньшей мере, несколько десятков, а ошибки опытов—не больше 10—20%.

Результаты и обсуждение. При культивировании клеток штамма Р-192 (ade2-192) на средах, содержащих 1, 10 и 100 мг/л аденина, получены кривые роста этих клеток (рис. 2). Первая точка для анализа

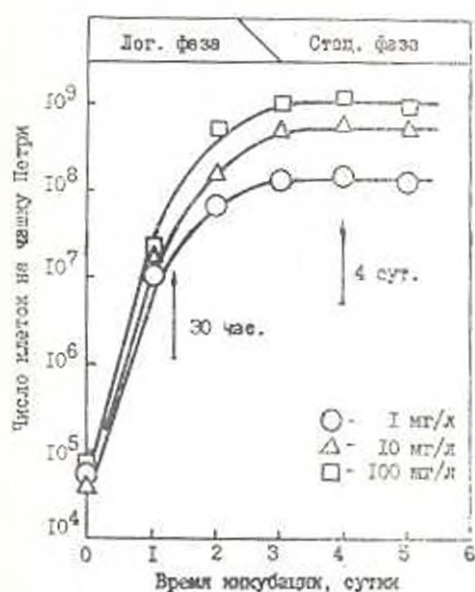


Рис. 2. Кривые роста дрожжей на средах с разным содержанием аденина

мутационности была взята в логарифмической фазе роста культур (30—40 ч), когда аденина в среде достаточно (колонии исходного штамма—белые). Следующая точка—ранняя стационарная фаза (4 сут), когда на средах с 1 и 10 мг/л аденина он истощился (колонии покраснели), а на среде с 100 мг/л аденина по-прежнему его достаточно (колонии—белые).

В экспериментах, поставленных по представленной схеме, регистрировали локусные и супрессорные мутации.

На рис. 3А приведены частоты возникновения супрессорных реверсов в логарифмической и стационарной фазах роста культур как на исходных средах, так и после перенесения на селективную среду без аде-

нина. Видно, что частоты мутирования в генах-супрессорах близки для всех условий культивирования.

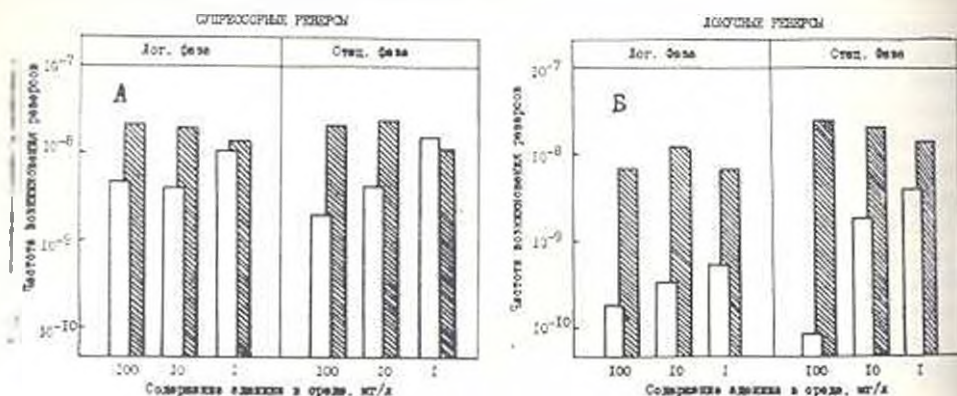


Рис. 3. Частота возникновения супрессорных (А) и локусных (Б) реверсов в логарифмической и стационарной фазах роста (светлые столбики) и при остаточном росте на селективной среде (темные столбики).

Иная картина наблюдается для локусных реверсов (рис. 3Б). В логарифмической фазе роста культур, когда аденина в среде достаточно, частоты на всех трех средах культивирования примерно совпадают. В стационарной фазе роста на среде с избытком аденина (100 мг/л) частота локусных реверсий остается прежней. На средах с 1 и 10 мг/л аденина истощается, а частота реверсий повышается на порядок и более. На селективной среде частота реверсий примерно одинакова и в период роста, и в стационарной фазе независимо от среды культивиро-

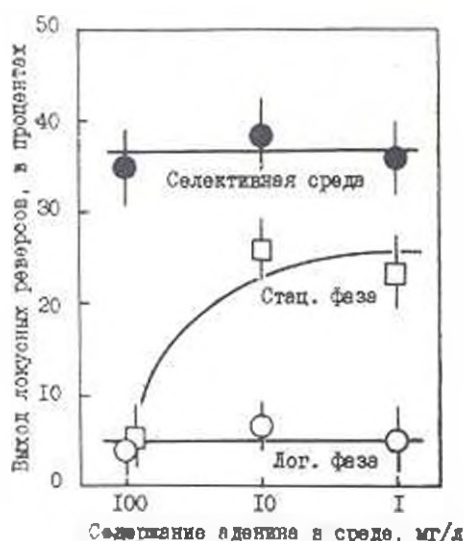


Рис. 4.

Влияние содержания аденина в среде и условий культивирования на относительный выход локусных реверсов.

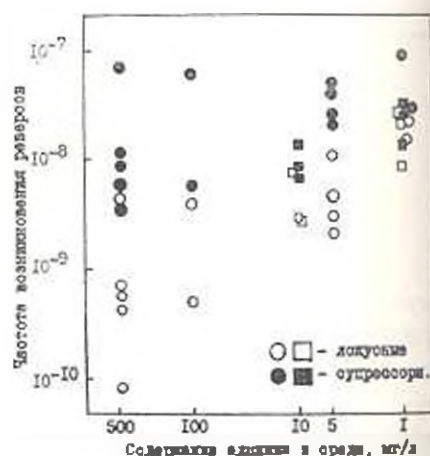


Рис. 5

Зависимость выхода локусных и супрессорных реверсов от содержания аденина в среде для дрожжей штамма ДК769-127 (круглые символы) и штамма 769-р192-15В-п4 (квадратные символы).

нения, и лишь немого превышает частоты при истощении аденина в средах с 1 и 10 мг/л его.

Эти же закономерности наблюдаются при рассмотрении соотношения локусных и супрессорных реверсов, $L/L+S$. На рис. 4 видно изменение этого соотношения в зависимости от содержания аденина в среде. В логарифмической фазе, когда аденина в среде достаточно, $L/L+S$ составляет несколько процентов. При переходе в стационарную фазу на среде с 100 мг/л аденина это соотношение не изменяется, а на средах с 1 и 10 мг/л аденин исчерпывается, и величина $L/L+S$ повышается до 25%. На селективной среде без аденина $L/L+S$ равно 40—50% при всех условиях предварительного культивирования.

С этими данными согласуются результаты опытов и на других штаммах дрожжей—769-P192-15B-114 и ДК 769-172, ауксотрофных по аденину и лизину. На рис. 5 приведены частоты возникновения локусных и супрессорных реверсов, наблюдаемые в разных опытах на этих штаммах в зависимости от содержания аденина в среде культивирования во время стационарной фазы роста. Видно, что частота мутирования генов-супрессоров почти не изменяется, а для локусных реверсов на средах с высокими концентрациями аденина она существенно меньше, чем на средах с низким содержанием его.

Из представленных данных видно, что на мутирование аденинового гена и генов-супрессоров содержание аденина в среде влияет по-разному. Частота мутирования аденинового гена при резком лимите по аденину увеличивается в 100—200 раз, а мутирование генов-супрессоров незначительно зависит от его содержания в среде.

Аналогичные данные получили Чепурной и Михова-Ценова [10]. При лимитировании лейцина в среде они наблюдали увеличение частоты локусного ревергирования лейцинового гена и постоянство ревергирования лизинового гена.

В последнем случае явно нет никакого дисбаланса пулов нуклеотидов. Это говорит о том, что наши данные также не обязательно трактовать в терминах дисбаланса.

Известно, что регуляция генов аденинового пути биосинтеза осуществляется конечным продуктом [20, 36]. Это позволяет предположить, что ген *ade2* «работает» только при лимите по аденину.

Чтобы объяснить повышение мутабельности аденинового гена при лимите по аденину, мы предложили гипотезу о связи мутабельности гена с его функциональной активностью [4, 5]. Из литературы можно привести много примеров, свидетельствующих о связи между активностью гена и его концентрацией [9, 29, 39] и стабильностью [18, 23, 24, 33, 34], а также о повышенной индуцированной мутабельности активно работающих генов [15, 21, 30, 37].

Мы предполагаем, что активные гены, вследствие их измененной конформации, обладают более высокой мутабельностью. Тогда наши наблюдения объясняются тем, что при достаточной концентрации аденина в питательной среде ген *ade2* не работает, и его мутабельность невысокая. При исчерпании аденина в среде ген *ade2* начинает активно функционировать, и его мутабельность возрастает. Можно пред-

положить также, что супрессорные гены работают одинаково независимо от присутствия или отсутствия в среде аденина. Поэтому их мутабельность тоже не очень зависит от концентрации аденина. В случаях наличия такой зависимости это можно отнести к ошибкам включения оснований в ДНК, что может быть действительно следствием дисбаланса пулов нуклеотидов.

Генная специфичность дисбаланса может проявляться также из-за того, что недостаток или избыток какого-то нуклеотида может регулировать активность генов, причастных к его синтезу или использованию, и тем самым изменять мутабельность этих генов.

Авторы благодарят Н. О. Абетян, Н. Л. Джанполадян, К. А. Любимову и Нгуен Тхи Нго за помощь в проведении экспериментов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Вячеславов Л. Г. Автореф. канд. дисс. М., 22, 1973.
2. Девин А. Б. Генетика, 223, 992, 1975.
3. Захаров Н. А., Кожин С. А., Кожина Т. Н., Федорова Н. В. Сб. методик по генетике дрожжей-сахаромицетов. Л., 1984.
4. Илькина В. Л., Корогодина В. И., Файси Ч. Генетика, 23, 637, 1987.
5. Корогодина В. И., Абетян Н. О., Брунцковс Х., Джанполадян Н. Л., Корогодина В. Л., Михова-Ценова Н., Симонян Н. В., Файси Ч., Чепурной А. И. Сообщ. ОИЯИ, P19-88-351, Дубна, 1988.
6. Корогодина В. Л., Колтаева Н. А., Любимов К. А., Корогодина В. И., Файси Ч. Сообщ. ОИЯИ, P19-88-835, Дубна, 1988.
7. Корогодина В. Л., Корогодина В. И., Файси Ч. Сообщ. ОИЯИ, P19-88-766, Дубна, 1988.
8. Лобашев М. Е. Вестн. Ленингр. ун-та, 8, 10, 1947.
9. Преображенская О. В., Карпов В. Л., Нагорская Т. В., Мирзабеков Ф. Д. Мол. биол., 18, 8, 1984.
10. Чепурной А. И., Михова-Ценова Н. Сообщ. ОИЯИ, P19-88-333, Дубна, 1988.
11. Barclay B. J., Little J. G. Molec. gen. Genet., 160, 33—40, 1978.
12. Brendel M. In: Genetic consequences of nucleotide pool imbalance. (Ed. P. J. de Serres), Plenum, New York, 425—434, 1985.
13. Bresler S. E., Mosevitsky A. I., Vyacheslavov L. Nature, 125, 764—766, 1970.
14. Bresler S. E., Mosevitsky A. I., Vyacheslavov L. Mutation Res., 19, 261—263, 1973.
15. Freck R. E. Mutation Res., 11, 161—166, 1971.
16. Coughlin C. A., Adeltger R. A. Nature, 178, 531—532, 1956.
17. Eckardt F., Kunz B. A., Launis R. H. Syntet. Genet., 7, 399—402, 1983.
18. Gatti L., Cisar H., Leri J., Vass R. Science 217, 648—650, 1982.
19. Genetic consequences of nucleotide pool imbalance. (Ed. P. J. de Serres), Plenum Publ. Corp., New York, 1985.
20. Gross T. S., Woods R. A. Heredity, 18, 2, 275, 1972.
21. Herman R. K., Luerkin N. B. J. Bacteriol., 110, 533—550, 1971.
22. Leimis A. J., Eisenstark A. Mutation Res., 5, 15—21, 1968.
23. Kim S. H., Ryu D. Biotechnol. Bioeng., 26, 497—502, 1984.
24. Kalsch E., Starlinger E. Z. Vergleichsb., 16, 297—300, 1965.
25. Kunkel T. A., Loh L. A. J. Biol. Chem., 255, 5941—5946, 1980.
26. Kunkel T. A., Silber J. R., Loh L. A. Mutation Res., 93, 411—419, 1982.
27. Kunz B. A. Environmental Mutagenesis, 4, 695—726, 1982.
28. Lammers M., Fallman H. Eur. J. Biochem., 140, 261—267, 1984.
29. Lanctotti F., Lopez A. C., Arias P., Alonso C. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 1560—1564, 1987.
30. Lipschutz R., Falk R., Arad C. Israel J. Medical Sci., 1, 323—324, 1965.

31. Luzzo J. K., Brox L., Henderson J. F. *Cancer Res.*, 37, 736—743, 1977.
32. Maybaum K., Cohen M. B., Sadee W. J. *Biol. Chem.*, 256, 2126—2130, 1981.
33. Mellon I., Bohr V. A., Smith C. A., Hanawalt P. C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 8878—8882, 1986.
34. Mellon I., Spivak G., Hanawalt P. C. *Cell*, 51, 241—249, 1987.
35. Ross D. D., Akman S. A., Schrecher A. W., Bachur N. R. *Cancer Res.*, 41, 4493—4498, 1981.
36. Satyanarayan T., Kaplan J. G. *Arch. Biochem. Biophys.*, 142, 40—47, 1971.
37. Savic D. J., Kanazir D. T. *Molec. gen. Genet.*, 118, 45—50, 1972.
38. Weinberg G., Ullman B., Martin D. W. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78, 2447—2451, 1981.
39. Weisbrod S. *Nature*, 297, 289—295, 1982.

Поступило 26.VI 1989 г.

Общаял. ж. Армения, № 9—10.(42).1989 г.

УДК 575.11:582.282.23

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДЕТЕРМИНАЦИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ МОДИФИКАЦИИ РАДИОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ КЛЕТОК

В. Г. ПЕТИИ

НИИ радиологии АМН СССР, г. Обнинск

Приведены дополнительные данные, подтверждающие генетическую детерминацию эффективности модификации радиочувствительности клеток. Показано, что эффективность модификации радиочувствительности клеток зависит от способности клеток к восстановлению после облучения. Показано, что эффективность модификации радиочувствительности клеток зависит от способности клеток к восстановлению после облучения. Показано, что эффективность модификации радиочувствительности клеток зависит от способности клеток к восстановлению после облучения.

Some additional data are presented to demonstrate genetic determination of yeast cells radiosensitivity modification. It was shown that the effectiveness of this modification was dependent of cell ability to postradiation recovery controlling by cell genotype. The following exogenous factors we have used in this paper to modificate cell radiosensitivity: densely ionizing radiation, well-known radioprotector (cysteamin), hypoxic radiosensitizers (metronidazole and misonidazole), oxygen or argon during the irradiation. Comparing findings of this paper with those published in literatures it was concluded the general importance of cell genotype in the effectiveness of cell radiosensitivity modification.

Генетическому контролю модификации радиочувствительности посвящены многие работы [1—7]. Однако интерес к этим исследованиям не ослабевает ввиду фундаментальной и практической значимости получаемых результатов. Детерминация эффективности модификации ра-

Сокращения: ЛПЭ—линейная передача энергии; ОБЭ—относительная биологическая эффективность; ККУ—коэффициент кислородного усилителя.