

4. Reed S. I., Hadwiger J. A. and Lörincz A. T. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v2, 4055, 1985.

5. Homan B. C., Cramer J. M., Rownd R. H. Gene, 26, 2, 223, 1983.

6. Stinchcomb D., Mann C. and Davis R. W. J. Mol. Biol., 158, 157, 1982.

7. Fitzgerald-Hayes M., Buhler J. M., Cooper T. G. and Gordon J. Mol. Cell Biol., 2, 82, 1982.

Поступило 26.VI 1989 г.

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

УДК 575.224.582.282.23

ДРОЖЖИ КАК МОДЕЛЬ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ МУТАГЕНОВ

Ю. И. ПАВЛОВ, О. В. ТАРУНИНА

Ленинградский государственный университет, кафедра генетики и селекции

Երևանում արված է մամանտիակից մոտեցումների անալիզ՝ մուտագենների մարկայլար սպեցիֆիկության ուսումնասիրման համար խմորանկների բջիչների պտտադրմամբ, ինչպես նաև բերված են սեփական փորձերի տվյալները ըստ խմորանկի LYS2 գենում մուտագենների անալիզի:

Analysis of modern approaches for the study of mutagenesis molecular specificity by yeasts use is given in the article, as well as data of own experiments according to mutations analysis in LYS2 gene of the yeasts are stated.

Одним из наиболее плодотворных современных подходов в исследовании механизмов мутагенеза является молекулярно-генетический анализ мутаций методами геной инженерии. Знание типов и распределения изменений нуклеотидных последовательностей позволяет выяснить механизм действия мутагенов, прогнозировать степень их генетической опасности, сферу их применения в качестве инструментов генетического анализа.

Сахаромицеты позволяют анализировать природу мутаций на генно-инженерном уровне. Эти низшие эукариотические микроорганизмы обладают ядром с хромосомами, напоминающими хромосомы высших эукариот, являются популярным объектом для анализа мутагенеза у эукариот [16]. Дрожжи, прекрасно изученные генетически и биохимически [2], являются одним из наиболее разработанных генно-инженерных объектов [23]. В отношении дрожжей-сахаромицетов разработаны методы не только отбора мутантов в определенных генах, но и их тонкого внутригенного картирования и анализа нуклеотидных последовательностей мутантных аллелей, что позволяет прямо изучать молекулярную специфичность мутагенов [10,17]

Принадлежность дрожжей к эукариотам позволяет соотносить данные, полученные на них с результатами работ по высшим эукариотам.

Молекулярная специфичность мутагенеза—общие принципы анализа

Для успеха при анализе специфичности мутагенеза важен удачный выбор гена, в котором изучают мутации. Долгое время, в эпоху «до

Сокращения: ЭМС—этилметансульфонат; ГАП—гидроксиламинопурин.

сиквенирования: практически единственным таким геном был ген *SUS1*, так как в этой системе были разработаны и селективные методы получения мутантов, и методы анализа их по изучению последовательности довольно короткого белка — продукта гена [16, 21]. Увеличило число генов, в которых можно изучить природу мутаций, помогли современные методы сиквенирования ДНК. Основные требования к современным системам анализа генов специфичности следующие:

- легкость отбора мутантов (наиболее удобны селективные методы отбора, например в гене *URA3* или *LYS2*) [7, 8];
- наличие плазмид с клонированным геном;
- знание нуклеотидной последовательности гена;
- возможность перевода мутантных аллелей в форму, в которой можно определять их нуклеотидную последовательность.

Последнее требование определяет успех всей работы, поэтому мы считаем необходимым рассмотреть этот этап подробнее. Принципы методов, разработанных на дрожжах, могут быть применены и к другим объектам.

Методы клонирования и сиквенирования аллелей генов дрожжей.

Невысокая сложность генома дрожжей позволяет исследовать нуклеотидные последовательности небольших генов, например, генов тРНК, прямо на хромосомной ДНК, при использовании меченых олигонуклеотидных праймеров [14]. Этот метод не нашел пока широкого применения на дрожжах из-за плохой воспроизводимости и того, что он применим не для всех генов. У высших эукариот для прямого анализа генов с успехом применяют технику энзиматической амплификации заданных участков ДНК цепными реакциями ДНК-полимеразы [22]. В отношении дрожжей пока неясно, что проще: подобный подход или использование методов клонирования мутаций в бактериальные векторы, о которых речь пойдет ниже.

Переклонирование мутантных аллелей с хромосомы на бактериальный вектор.

Легче всего определить нуклеотидную последовательность ДНК в составе специальных векторов — однонитчатых или двунитчатых [9, 18]. У дрожжей разработаны быстрые методы клонирования хромосомных аллелей в такие векторы.

Наиболее прямой подход — прямое клонирование, т. е. создание мини-библиотеки генома из фрагментов ДНК генома заданного размера на бактериальном векторе. В результате лишь малая доля рекомбинантных векторов несет нужный фрагмент. Эти единственные плазмиды находят, исключая поиск гомологичной последовательности *in vitro* меченым фрагментом ДНК того гена, аллель которого надо выделить. Так изучали мутации в супрессорном гене тРНК, индуцированные ICR—170 [12]. При отлаженной технике клонирования этот путь наиболее быстрый, так как не требует предварительного конструирования специальных штаммов. Но его вряд ли можно рекомендовать во всех случаях, так как он требует очень хороших ферментов и реактивов и ювелирной техники молекулярного клонирования.

Более остроумным является метод «выселения» мутантной последовательности, в котором для ее поиска в геноме также используют гомологичный ген дикого типа, но в условиях *in vivo*, при этом вектор оказывается связанным с нужной последовательностью в результате гомологичной рекомбинации [25] (рис. 1). Ген дикого типа на плазмиде становится «проводником» вектора к мутантной аллели. Теперь подобранные рестриктазы будут вырезать из геномной ДНК штамма мутан-

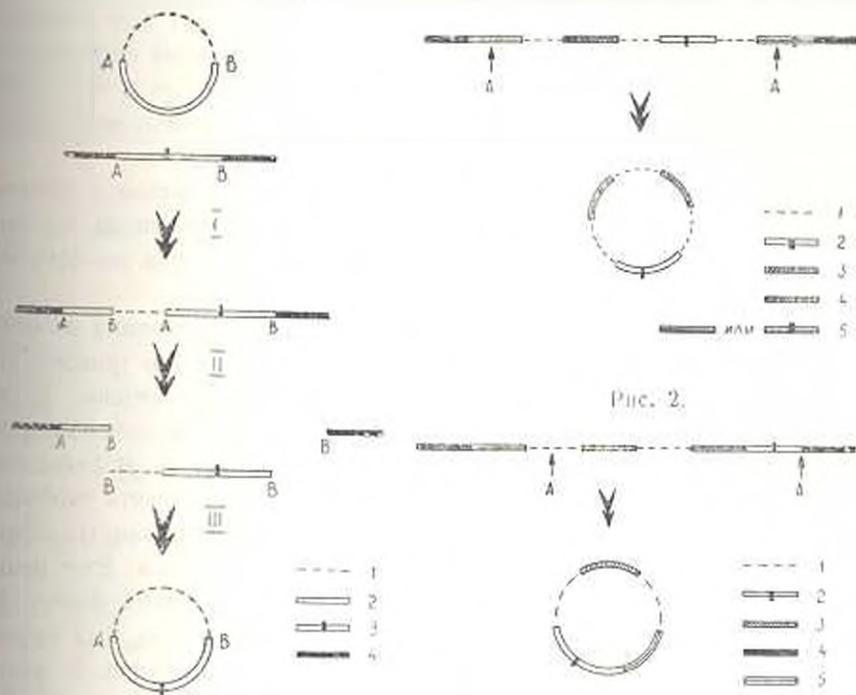


Рис. 1.

Рис. 3.

Рис. 1. «Выселение» мутантной последовательности из хромосомы на интегративную плазмиду. А, В—сайты узнавания рестриктаз. I—интеграция плазмиды в хромосому при трансформации, II—разрезание хромосомной ДНК интегранта рестриктазой «В», III—лигирование. 1—последовательность бактериального вектора, 2—изучаемый ген, аллель дикого типа, 3—этот же ген, мутантная аллель, 4—прочая хромосомная ДНК дрожжей. Рис. 2. Структура интегранта трехмаркерной плазмидой и «выселение» мутантного гена. «А»—сайты узнавания рестриктаз. 1, 4—см. подпись к рис. 1. 2—мутантная аллель изучаемого гена, 3—аллели гена, по которому проводили интеграцию.

Рис. 3. Структура интегранта при интеграции по гомологии с фрагментом ДНК, прилегающим к изучаемому гену, и результат «выселения». «А», 1, 4—см. подпись к рис. 1. 2—изучаемая мутантная аллель, 3—дрожжевой селективный маркер, 5—участок дрожжевой ДНК, прилегающий к исследуемому гену.

тную аллель вместе с вектором и закольцованные лигазой фрагменты с вектором смогут трансформировать бактерии. Недостатком этого метода является необходимость для каждой новой мутации проводить трансформацию дрожжей и генетически и биохимически охарактеризовывать трансформант. Кроме того, в зависимости от места «кроссовера» при интеграции тип рестриктазы, вырезающей нужную плазмиду, будет разным.

Развитием этой идеи является получение штаммов, у которых вторичная плаزمиды постоянно интегрирована в геном и ассоциирована с последовательностью изучаемого гена. У таких штаммов получают мутации и сразу же проводят серию «выселения».

В одном из вариантов этой техники исследуемый ген вводят в штамм с делецией исходной копии гена в составе интегративной трехмаркерной плазмиды по гомологии с каким-нибудь дрожжевым маркером плазмиды [17] (рис. 2). Третий маркер служит для генетического контроля структуры интегратов. С помощью такой системы был исследован УФ-индуцированный и спонтанный мутагенез в гене *URA1* [17]. Недостатком является необычное положение исследуемого гена в геноме.

В другом варианте специальные вектора вводят рядом с резидентным геном по гомологии с фрагментом ДНК, примыкающим к этому гену [12] (рис. 3). Это наиболее удачное решение, так как ген остается на своем «законном» месте.

Принципиально иная идея клонирования также основана на феномене гомологичной рекомбинации — геномной конверсии. При трансформации дрожжей репликативной плазмидой с двушнтовой брешью происходит застройка этой брешли с использованием в качестве донора информации хромосомной гомологичной аллели [19] (рис. 4). В результате автономно реплицирующаяся плазмиды *in vivo* «клонировать» необходимый фрагмент и может быть легко извлечена из дрожжей при трансформации препаратом их тотальной ДНК кишечной палочки. Этот метод позволяет клонировать и точковые и структурные мутации, вплоть до инсерции транспозона [6]. Для того, чтобы этот метод был эффективным, необходимы плазмиды с делецией тех рестрикционных фрагментов, которые предполагается клонировать. Привлекательность этого метода в минимуме биохимических манипуляций.

Мутагенез на плазмидных генах.

Всех этапов клонирования, приведенных в предыдущем разделе можно избежать, изучая мутации в гене, находящемся на плазмиде. На такой системе изучены спонтанные и УФ-индуцированные мутации в гене одной из *t*-РНК дрожжей [15,20].

По данным этих авторов, до крайней мере спонтанные мутации в плазмидной системе получают такие же, как и на хромосоме. В то же время есть данные о том, что индуцированный мутагенез в генах на плаزمиде может существенно отличаться от мутагенеза на хромосоме [1].

Особенности мутагенеза у дрожжей.

С помощью методов, описанных выше, у дрожжей изучены спонтанные и индуцированные ICR—170 и УФ-светом мутации. Оказалось, что ICR—170 индуцирует в основном вставки пар оснований в мосты монотонных повторов и тех участков ДНК, которые могут образовывать «шпильки» за счет несовершенных повторов [10, 12]. Это показывает важность вторичной структуры ДНК, определяемой, в свою оче-

вид. первичной структурой, в детерминации специфичности и интенсивности мутационного процесса у эукариот.

Мутации при действии УФ-света у дрожжей происходят в основном в тех сайтах, где возникают циклобутановые димеры и 6—4 фотопродукты, что показано также для бактерий и клеток человека [13].

Типы возникающих мутаций позволяют проследить и схожесть и особенности механизма мутагенеза у дрожжей и у бактерий [17]. К сожалению, некоторые гены одного организма по типам мутаций могут отличаться сильнее, чем гены двух разных организмов, что затрудняет интерпретацию результатов. Мы попытались связать распределение

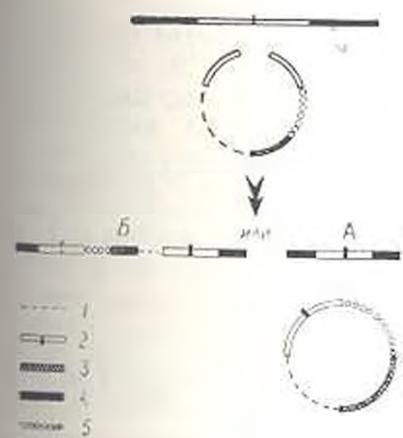


Рис. 4.

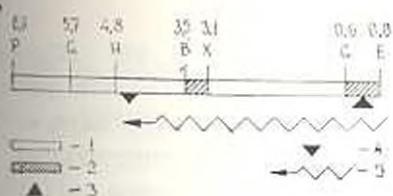


Рис. 5.

Рис. 4. Конверсия хромосомной аллели на плазмиду. «А»—конверсия на плазмиду, «Б»—интеграция плазмиды (нежелательный для данного метода исход). 1, 2, 4, см. подпись к рис. 3. 3—селективный дрожжевой маркер плазмиды, 5—репликатор плазмиды.

Рис. 5. Физическая карта гена *LYS2*. Обозначения рестриктаз: E—EcoRI, G—BglII, X—XhoI, B—BamHI, H—HindIII, P—PstI. Цифры над рестриктазами—координаты расстояний в тыс. нукл. пар. 1—ген *LYS2*, 2—сиквенированные районы гена, 3—точка начала трансляции гена, 4—точка терминации трансляции, 5—транскрипт гена.

Рис. 6. Плазмиды, применяемые для изучения мутантов по гену *LYS2*. Обозначения рестриктаз такие же, как и на рис. 5. 1—ген *LYS2*, 2—ген *LEU2*, 3—ген *ADE2*, 4—фрагмент двухмикроспиральной плазмиды дрожжей, 5—последовательность бактериального вектора, обуславливающая устойчивость к тетрациклину, 6—то же, но к ампициллину.

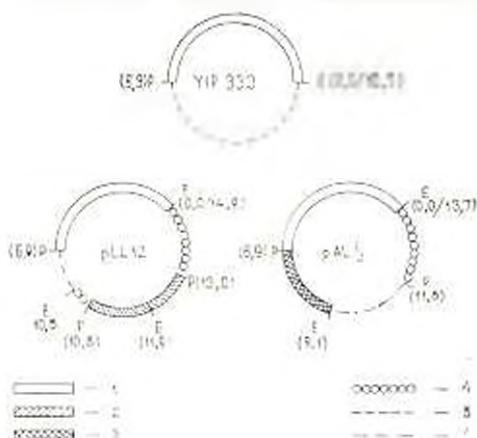


Рис. 6.

мутаций в гене *LIRAZ* с особенностями его хроматина, так как известна «фазировка» нуклеосом в этом гене [24]. Оказалось, что частота возникновения мутаций в линкерных и нуклеосомных реакциях неодинакова ($P > 0,05$). Так что по крайней мере при данной выборке мутантов, полученных в работе [17], не удастся связать специфику мутагенеза у высших эукариот с нуклеосомами.

Нуклеотидные последовательности мутаций в гене

Объект, му- таген (ме- год клони- рования)	Синквиен- русский уча- сток	Исходные и мутантные нуклеотидные последовательности
дрожжи, ге- таген (ме- год клони- рования)	ген LYS 2, район E-G	ACA TAT TCG TTA CAG — — > ACA TAT TAG TTA CAG Thr Tyr Ser Leu Gln — — > Thr Tyr .3. Leu Gln
дрожжи, ге- таген (ме- год клони- рования)	ген LYS 2, район E-G	AGT GTA TGG GGT GCA — — > AGT GTA TGA GGT GCA Ser Val Trp Ala Ala — — > Ser Val .2. Ala Ala
дрожжи, ге- таген (ме- год клони- рования)	ген LYS 2, район X-B	GTT ACC GGT GCT ACA — — > GTT ACC GAT GTC ACA Val Thr Gly Ala Thr — — > Val Thr Asp Ala Thr
дрожжи, ге- таген (ме- год клони- рования)	ген LYS 2, район X-B	GTC ACA GGA TTT CTG — — > GTC ACA GAA TTT CTG Val Thr Gly Phe Leu — — > Val Thr Glu Phe Leu
дрожжи, ге- таген (ме- год клони- рования)	ген LYS 2, район X-B	GTT CAC TGG GTT TAT — — > GTT CAC TAG GTT TAT Val His Thr Val Tyr — — > Val His .3. Val Tyr
E. coli (3)	ген lacZ	GTT AAC CAA CTT AAT — — > GTT ACC TAA CTT AA Val Thr Glu Leu Asn — — > Val Thr .1. Leu Asn
E. coli (3)		CGC CCT TCC CAA CAG — — > CGC CCT TTC CAA CAG Arg Pro Ser Gln Gln — — > Arg Pro Phe Gln Gln

Применение: 1; 2; и 3. обозначают nonsense кодоны «окр», «ония» и «самбер» со-
ответственно. Методы клонирования: 1—репарация бреши, 2—«выселение», 3—получе-
ние мутантов на плазмидном гене.

Изучение мутаций в гене LYS 2.

Мы разработали систему для анализа мутаций в гене дрожжей LYS 2 [4, 5] (рис. 5). Для клонирования мутаций мы применяли (рис. 6) и метод «выселения» (при использовании плазмиды YIP333, и метод конверсии на репликативную плазмиду pL12, и получение мутаций в плазмидном гене (плаزمиды pAL11). Результаты анализа мутантов, индуцированных ЭМС и ГАП, приведены в таблице. Для сравнения мы привели последовательности двух мутаций, индуцированных ГАП у кишечной палочки в гене lacZ. Существенным, на наш взгляд, является то, что трансзионы при действии этих мутагенов (относимых к мутагенам «репликативного» типа) возникают в тех сайтах, где есть повторы 2—3 GC-пар. Эти сугубо предварительные данные все же позволяют коэффантазировать. По-видимому, ДНК-полимеразы испытывают «неудобства» при копировании таких повторов и ошибаются. Репликативному мутагенезу в этом случае и эволюции отводится роль разрушителя монотонных повторов. Если коррекция гетеродуплексов при взаимодействии несовершенных повторов восстанавливает повторы [3], то можно полагать, что репликативный мутагенез и рекомбинационно-репарационный мутагенез являются антагонистами.

ЛИТЕРАТУРА

1. Грачева Л. М., Касинова Г. В., Королев В. Г. и др. Генетика, 24, 1178, 1988.
2. Инге-Вечтомов С. Г. Итоги науки и техники. Серия «Общие проблемы биологии», 1, 148, 1982.
3. Колчанов Н. А. Докт. дисс., 542, Новосибирск, 1988.
4. Павлов Ю. И., Носков В. Н., Тюлякова Т. С. и др. В сб.: Чувствительность организмов к мутагенным факторам и возникновение мутаций. 5б, Вильнюс, 1986.

5. Тарутина М. Г., Янушка А. П., Павлов Ю. И. В сб.: Использование биосферных и модельных объектов для генетического мониторинга загрязнителей окружающей среды. 103. Ереван, 1987.
6. Чернов Ю. О., Горденин Д. А. Генетика, 23, 30, 1987.
7. Boeki J. M., LaCroute F., Fink G. R. Mol. Gen. Genet., 197, 345, 1981.
8. Chatoov B. V., Sherman F., Azubalis D. et al. Genetres, 93, 51, 1979.
9. Chen E. Y., Seeburg P. H. DNA, 4, 165, 1985.
10. Ernst J. F., Hampsey D. M., Sherman F. Genetics, 111, 231, 1985a.
11. Ernst J. F., Hampsey D. M., Stewart J. W. et al. J. Biol. Chem., 260, 13225, 1985b.
12. Hampsey D. M., Hosht R. A., Sherman F. Mol. Cell. Biol., 6, 4425, 1986.
13. Hsia M. C., Lebkowski V. S., Leong P. et al. J. Mol. Biol., 205, 103, 1989.
14. Hulbregtse J., Engelke D. R. Gene, 14, 151, 1986.
15. Kunz B. A., Pierce M. K., Mis J. R. et al. Mutagenesis, 2, 445, 1987.
16. Lawrence C. W. Adv. Genet., 21, 173, 1982.
17. Lee G.-S., Savage E. A., Ritzel R. G. et al. Mol. Gen. Genet., 214, 396, 1988.
18. Messing J. Meth. Enzymol., 101, 26, 1983.
19. Orr-Weaver T. L., Szostak J. W. Proc. Natl. Acad. Sci., 81, 4117, 1984.
20. Pierce M. K., Gilman C. V., Kunz B. A. Mutation Res., 182, 65, 1987.
21. Prakash L., Sherman F. J. Mol. Biol., 79, 65, 1973.
22. Salk R. K., Gelfand D. H., Stoffel S. et al. Science., 39, 487, 1988.
23. Struhl K. Nature, 305, 391, 1983.
24. Thomas F. J. Mol. Biol., 199, 177, 1986.
25. Winston F., Forrest C., Fink G. R. Met. Enzymol., 101, 111, 1983.

Поступило 31.V 1989 г.

АНТРОПОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПОТОМКОВ ВЫХОДЦЕВ С ТЕРРИТОРИИ ИСТОРИЧЕСКОЙ АРМЕНИИ. БАЯЗЕТ (ЖИТЕЛИ с. НОРАДУЗ РАЙОНА им. КАМО)

Р. М. АРУТЮНЯН, Г. С. ШИРИНЯН, К. Ю. МАРТИРОСЯН,
Н. Р. КОЧАР, А. А. КАЗАРЯН

Ереванский государственный университет,
Институт археологии и этнографии АН АрмянСР, Ереван

Վատական Հայաստանի՝ Բայազետի չրջանից Արևելյան Հայաստան տեղափոխված և ՀայկեՍՍՀ-ի կամոյի շրջանի նորագույն գյուղում բնակվող զարթածների ժառանգորդների որոշ անտրոպոգենետիկական ցուցանիշների սասամնասիրությունը ցույց է տվել, որ սերնդի ժամանակաշրջանի սեռոպոթյունը հավասար է մոտափոքրապես 21 տարեկանի, օպորոգուկտիվ շրջանի սոցիալապես պայմանավորված սահմանները միջինում կազմել են 21,10—38,02 տարեկան, ուպորոգուկտիվ շրջանը՝ 20,6 տարեկան, ֆենիթիփոմիզայնոյի Նկատմամբ զգայունության գնահատականը եղել է ցածր: Գերմասոգիֆիկական հատկանիշների հաճախականության անույրը ցույց է տվել, որ դրանք պտնվում են հայկական պոպուլյացիայի գերմասոգիֆիկական հատկանիշների փոփոխականության սահմաններում: Ուսումնասիրված խումրն օժտված է անոզալորտիական հատկանիշների կոպյների մարտիմալ արտահայտված գծերով:

The study of some anthropogenetic characters of a group of persons, that live now in the village of Noraduz of the Kamo region of the Armenian SSR and whose great parents had arrived from the region of historical Armenia—Bayazet (territory of modern Turkey), is presented. It is shown