

О. Н. КУРЕННАЯ, академик Н. П. ДУБИНИН, Л. Д. КУРЛАПОВА,
В. А. ТАРАСОВ

РЕПЛИЦИРУЮЩАЯСЯ НЕСТАБИЛЬНОСТЬ В РЯДУ КЛЕТОЧНЫХ ПОКОЛЕНИЙ НА ПРИМЕРЕ ДРОЖЖЕЙ *SCHIZOSACCHAROMYCES ROMBE*

Явление реплицирующейся нестабильности ⁽¹⁾ представляет собой, по-видимому, один из случаев так называемого продленного мутагенеза ⁽²⁾. Это явление характеризуется тем, что изменение в хромосоме, первоначально индуцированное мутагеном, существует в скрытой форме, реплицируется, переходя в дочерние клетки, и приводит к возникновению мутаций через десятки и сотни клеточных поколений.

Реплицирующаяся нестабильность обнаружена на разных объектах ^(1, 3-8). Наиболее плодотворны исследования по изучению природы этого феномена, выполненные на гаплоидных дрожжах *Schizosaccharomyces rombe* ⁽⁹⁻¹³⁾. В этих исследованиях установлено, что мутации в клетках-потомках из одной обработанной мутагеном несущей нестабильность родительской клетки локализуются всегда в одном и том же сайте гена. Однако молекулярная природа повреждений, лежащих в основе явления реплицирующейся нестабильности, и механизмы перехода этих повреждений в мутации остаются неясными.

Мы предприняли попытку количественно изучить динамику мутагенеза в условиях существования реплицирующейся нестабильности, а также определенные этапы реализации нестабильности в мутации, в частности зависимость этого процесса от некоторых этапов темновой репарации.

Работа проводилась на гаплоидных делящихся дрожжах *Schizosaccharomyces rombe* на системе адениновых мутантов. В штаммах *ad-7.407.h⁻* и *uvr-1*, колонии которых окрашены в красный цвет ^(14, 15), у.-ф. излучением индуцировались полные и мозаичные мутации. Полные мутации образуют колонии полностью белого фенотипа, мозаичные мутации дают колонии, состоящие из красного и белого секторов вследствие реализации индуцированного повреждения в мутацию спустя несколько клеточных делений. Белая окраска мутантов определяется прямой мутацией в исходном штамме по одному из адениновых локусов, предшествующих седьмому на пути синтеза аденина (*ад-1*, *ад-3*, *ад-4*, *ад-5* и *ад-9*). Анализировались мозаичные колонии, клетки которых дают новые мозаики во вторичных пересевах. Рассевы инкубировались на синтетической среде ⁽¹⁵⁾ с добавкой аденина 7,5 мг/л при 30° в течение 7—10 суток. Кофеин вносился в твердые среды в концентрации 0,5 г/л и сроки инкубации при 30° увеличивались до 20 суток.

В независимо поставленных экспериментах проверялся выход мозаицизма для 10 первичных мозаичных колоний, относящихся к четырем аденинзависимым локусам (*ад-1*, *ад-3*, *ад-4* и *ад-5*), в течение 10 последовательных пересевов. В каждом пассаже снималось не менее 50 красных мозаик из предварительного посева и выборка из полученной суспензии клеток рассевалась далее.

В табл. 1 и на рис. 1 представлены полученные результаты, которые говорят о том, что, во-первых, в облученных у.-ф. клетках исходной культуры возникает нестабильность, приводящая к появлению мутаций в клетках-

Таблица 1

Динамика проявления мозаицизма по локусам в ряду клеточных поколений

Пересевы	ад-1			ад-3			ад-4			ад-5		
	всего просмотрено колоний	уровень белого мозаицизма	уровень и число красного мозаицизма *	всего просмотрено колоний	уровень белого мозаицизма	уровень и число красного мозаицизма *	всего просмотрено колоний	уровень белого мозаицизма	уровень и число красного мозаицизма *	всего просмотрено колоний	уровень белого мозаицизма	уровень и число красного мозаицизма *
I	14 535	0,69	$\frac{4,89}{519}$	4403	0,05	$\frac{15,1}{27}$	2437	1,06	$\frac{10,0}{237}$	14 843	0,12	$\frac{4,52}{163}$
II	21 159	1,43	$\frac{12,23}{1907}$	6063	0,81	$\frac{2,86}{127}$	5784	2,3	$\frac{7,4}{337}$	12 461	0,87	$\frac{10,2}{734}$
III	29 467	1,16	$\frac{6,48}{1366}$	5972	1,58	$\frac{6,13}{176}$	2846	1,0	$\frac{5,3}{257}$	13 736	1,01	$\frac{5,3}{357}$
IV	3991	0,9	$\frac{37,3}{1063}$	914	0,3	$\frac{35,3}{78}$	452	0,0	$\frac{29,7}{60}$	1440	0,6	$\frac{36,3}{155}$
V	9884	1,2	$\frac{30,2}{2617}$	816	1,3	$\frac{25,3}{187}$	1495	0,75	$\frac{21,6}{295}$	3401	2,0	$\frac{22,2}{634}$
VI	4652	0,58	$\frac{30,3}{1218}$	1529	2,7	$\frac{19,5}{244}$	825	1,07	$\frac{38,0}{242}$	2687	1,6	$\frac{28,1}{582}$
VII	6497	0,95	$\frac{42,1}{2369}$	2042	1,0	$\frac{34,1}{664}$	1504	4,3	$\frac{20,8}{289}$	3568	2,8	$\frac{39,4}{1459}$
VIII	13 952	4,28	$\frac{51,4}{5926}$	2797	10,4	$\frac{23,1}{626}$	3415	11,8	$\frac{16,5}{534}$	8419	6,0	$\frac{19,3}{1491}$
IX	11 777	2,1	$\frac{68,9}{4794}$	2922	2,5	$\frac{29,4}{799}$	3331	1,3	$\frac{26,3}{700}$	5265	3,9	$\frac{36,8}{1606}$
X	8 216	2,7	$\frac{75,9}{4664}$	2510	2,2	$\frac{41}{814}$	1830	3,3	$\frac{38,7}{595}$	4206	2,6	$\frac{48}{1592}$
XI	15 328	1,1	$\frac{56,6}{5154}$	Пересевы не делались								
XII	1 496	1,9	$\frac{73,5}{777}$	Пересевы не делались								

* Числа над чертой — уровень красного мозаицизма, под чертой — число красных мозаик.

потомках на протяжении 270 изученных клеточных поколений; во-вторых, выход мутаций в течение этих поколений изменяется идентично для всех исследованных локусов; в-третьих, частота мутаций не остается постоянной, а при увеличении количества генераций с 60 до 90 статистически значимо возрастает с 10 до 40—60% и в дальнейшем существенно не меняется. Таким образом, нестабильное состояние гена является, по-видимому, динамическим, в результате чего в ряду клеточных поколений происходит изменение вероятности реализации нестабильности, что и ведет к изменению выхода мутаций.

Было проведено сравнительное изучение выхода вторичного мозаицизма среди первично индуцированных мозаик штаммов нормальной и повышенной чувствительности к у.-ф. (ad-7.407.h⁻ и uvs-1, соответственно). Оказалось, что в штамме, дефектном по определенным этапам репарационного процесса, уровень реализации нестабильности в мутации ниже (всего просмотрено колоний во вторичном расщепе 13325, полное число мозаик 52, уровень общего мозаицизма 0,39% ± 0,05) по сравнению со штаммом нормальной чувствительности (всего колоний 49976, полное число мозаик 2734, уровень общего мозаицизма 5,5% ± 0,1). Этот результат указывает на возможную роль определенных этапов процессов репарации в реализации нестабильности.

Рассев независимо индуцированных мозаик на среды с кофеином и без него (среднее из пяти опытов)

	Всего просмотрено колоний	Красные колонии, %	Белые колонии, %	Мозаики
Среда без кофеина	$\frac{15625}{11722}$	$\frac{71,4 \pm 0,46}{2,5 \pm 0,15}$	$\frac{15,8 \pm 0,41}{97,4 \pm 0,15}$	$\frac{12,8 \pm 0,29}{0,1 \pm 0,31}$
Среда с кофеином	$\frac{13604}{9689}$	$\frac{84,6 \pm 0,28}{2,8 \pm 0,17}$	$\frac{15,3 \pm 0,27}{97,2 \pm 0,17}$	$\frac{0,14 \pm 0,31}{0,02 \pm 0,014}$
<i>t</i>	—	$\frac{5,7}{0,07}$	$\frac{0,43}{0,7}$	$\frac{19,8}{1,23}$

Примечание. Числа над чертой — данные для красной части, под чертой — для белой части мозаики.

В связи с этими данными представлялось интересным изучить влияние кофеина, являющегося ингибитором некоторых этапов темновой репарации у бактерий и дрожжей (¹⁶⁻¹⁹). Опыты проводились по следующей схеме: предварительно подрощенные клетки первичной мозаики из белого и красного секторов отдельно высевались на твердые среды для инкубации с кофеином и без него. В пяти независимых опытах учитывался уровень вторичного мозаицизма при пересевах пяти первичных индуцированных мозаик. Как видно из табл. 2, присутствие в среде кофеина резко подавляет уровень вторичного мозаицизма, уменьшая его с 12,8 до 0,14% для клеток из красного сектора. В отношении клеток из белого сектора сказать что-либо определенное трудно, поскольку как на среде с кофеином, так и на среде без него, уровень мозаицизма низок. Однако тенденция к уменьшению мозаицизма на средах с кофеином сохраняется и в этом случае.

Неясным оставался вопрос, приводит ли культивирование на среде с кофеином к полному исчезновению нестабильного состояния, или кофеин подавляет лишь процесс перехода нестабильности в мутации.

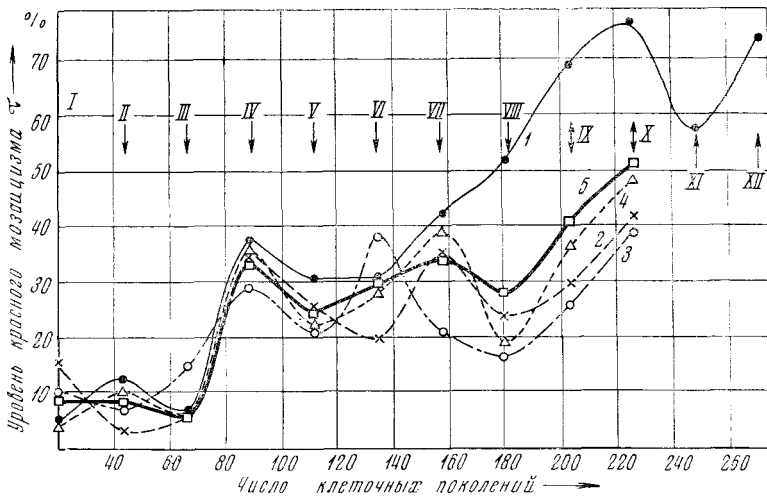


Рис. 1. Динамика проявления красного мозаицизма в ряду клеточных поколений. Уровень красного мозаицизма по локусу ад-1 (1); ад-3 (2), ад-4 (3), ад-5 (4), суммарный уровень красного мозаицизма по всем четырем локусам (5). Уровень красного мозаицизма равен числу красных мозаик $\times 100$, деленному на число красных мозаик + число красных колоний. I — XII — пересевы

Рассев красных колоний, собранных со среды с кофеином
в предыдущем опыте (среднее из трех опытов)

	Всего просмотрено колоний	Красные колонии, %	Белые колонии, %	Мозаика
Среда без кофеина	11999	$63,8 \pm 0,8$	$1,9 \pm 0,29$	$34,3 \pm 0,8$
Среда с кофеином	2565	$97,9 \pm 0,4$	$1,5 \pm 0,3$	$0,6 \pm 0,3$
<i>t</i>	—	16,3	1,46	60,5

В этой связи принципиальный интерес имеют данные по выходу мозаик в рассеве клеток из красных колоний, выращенных на среде с кофеином из выше описанного опыта (табл. 3). Оказалось, что в отсутствие кофеина высокий уровень мутабельности в рассеве восстанавливается и составляет 34,3%, тогда как в параллельном рассеве на среде с кофеином он по-прежнему низок и равен 0,6%. Это свидетельствует в пользу того, что репликация нестабильности в присутствии кофеина происходит нормально, тогда как проявление ее в мутации подавляется.

Институт общей генетики
Академии наук СССР
Москва

Поступило
9 VIII 1971

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ C. Averbach, Proc. Roy. Soc. (Edinburg), **13**, 62, 211 (1946). ² Н. П. Дубинин, Генетика, **2**, № 7 (1967). ³ А. П. Акифьев, В. А. Макаров и др., Генетика, **5**, № 3, 49 (1965). ⁴ M. Buiatti, V. M. Ronchi, Genetical Today, Proc. XI Intern. Congr. Genetics, **49** (1964). ⁵ Н. П. Дубинин, Е. Г. Сапрыкина, ДАН, **158**, 956 (1964). ⁶ N. P. Dubinin, V. A. Tarasov, Atomic Energy Review, **6**, 3, I. A. E. A., Vienna, 101 (1968). ⁷ Н. П. Дубинин, А. П. Акифьев, Т. А. Виштынецкая, Генетика, **7**, № 6 (1971). ⁸ H. T. Evans, D. Scott, Genetics, **49** (1964). ⁹ A. Abbondandolo, S. Bonatti et al., Microbiol. Genet. Bull., **20**, 3 (1967). ¹⁰ N. Loprieno, A. Abbondandolo et al., Genet. Res., **12**, 1, 45 (1968). ¹¹ A. Nasim, Mut. Res., **4**, 753 (1967). ¹² A. Nasim, Genetics, **60**, Part 2, 206 (1968). ¹³ A. Nasim, Genetics, **59**, 327 (1968). ¹⁴ H. Heslot, Abhandl. Deut. Akad. Wiss. Berlin, Kl. Med., **98** (1960). ¹⁵ U. Leupold, Arch. Julius Klaus-Stift, Vererbungsforsch. Sozialanthropol. Rassenhyg., **30**, 506 (1955). ¹⁶ W. Harm, Photochem. Photobiol., **5**, 747 (1966). ¹⁷ K. Metzger, Biochem. Biophys. Res. Commun., **15**, 101 (1964). ¹⁸ W. Sauerbier, Biochem. Biophys. Res. Commun., **14**, 340 (1964). ¹⁹ C. H. Clarke, Mutation Res., **5**, 1, 33 (1968).