

А. Б. ДЕВИН

РЕПАРАЦИОННАЯ ГИПОТЕЗА И ВЛИЯНИЕ КОФЕИНА НА ИНДУКЦИЮ ПОЛНЫХ МУТАНТОВ У ДРОЖЖЕЙ

(Представлено академиком Д. К. Беляевым 9 IV 1975)

Универсальной закономерностью индуцированного мутационного процесса у различных организмов является возникновение двух классов мутантов: полных и мозаичных. Вегетативное размножение клеток непосредственно после возникновения в них полных мутаций приводит к образованию чистых мутантных клонов; мозаичные мутанты в аналогичных условиях образуют клоны, состоящие из мутантных и немутантных секторов.

Возникновение мозаичных мутантов представляется вполне естественным ввиду хорошо известной способности большинства мутантов взаимодействовать с отдельными нитями ДНК. Образование полных мутантов нуждается в специальном объяснении, и это обстоятельство способствовало появлению на свет нескольких гипотез (¹).

Последующие работы (²⁻⁴) привели к тому, что из всех этих гипотез наиболее приемлемой в настоящее время представляется одна — репарационная. Она рассматривает появление полных мутантов как результат ферментативной гомозиготизации мутационных гетерозигот в процессе репарации летальных повреждений или в ходе коррекции молекулярных гетеродуплексов ДНК. Коррекцию молекулярных гетеродуплексов тоже можно рассматривать как репаративный процесс, восстанавливающий вторичную структуру ДНК, но способный при этом вносить локальные изменения в ее первичную структуру. Корреляция, очевидно, может происходить в двух противоположных направлениях и должна приводить к появлению как мутантных, так и нормальных молекулярных гомозигот. Таким образом, коррекция включает в себя репарацию мутационных повреждений. Репарационная гипотеза опирается на экспериментальные данные, довольно многочисленные, хотя и носящие более или менее косвенный характер (⁵⁻⁷).

Репарационная гипотеза, очевидно, может претендовать на объяснение соответствующего явления только в самых общих чертах. Разнообразие и разветвленность путей репарации у разных объектов и при разных экспериментальных воздействиях, с одной стороны, и универсальность самого феномена образования полных мутантов, с другой стороны, вызывают ряд вопросов, делающих оправданным детальное исследование происхождения полных мутантов. Одним из экспериментальных подходов при этом является поиск и использование возможностей модифицировать выход полных мутантов.

Изучая закономерности образования полных мутантов у дрожжей-сахаромицетов (мутации в локусах *ade₁* и *ade₂*, приводящие к накоплению клетками красного пигмента) под действием азотистой кислоты (АК), мы ранее обнаружили возможность генотипической модификации доли полных мутантов (д. п. м.). Мутация *xrs₁* (*rad 54*), повышающая чувствительность клеток к летальному действию ионизирующей радиации, сопровождается увеличением выхода полных мутантов под действием АК (⁸). Репарационная гипотеза, как нам кажется, не может дать удовлетворительного объяс-

кования этому явлению, природа его не ясна. Для ее выяснения представлялось целесообразным установить, какие внешние воздействия на клетки способны изменять д. п. м. В настоящей работе обнаружено, что кофеин — один из наиболее широко используемых ингибиторов репарации ⁽⁹⁾ — способен модифицировать выход полных мутантов, индуцированных АК. Однако, как будет видно дальше, закономерности этой модификации находятся в противоречии с репарационной гипотезой.

В работе использован гаплоидный штамм дикого типа X2180-1A (тип спаривания а), полученный проф. В. И. Корогодиным от д-ра Р. К. Мортимера (Беркли, США) и любезно предоставленный нам. Культуры клеток этого штамма выращивали при постоянной аэрации в течение 4 суток при температуре 32° в минимальной среде, содержащей на 1 л дистиллированной воды 10 г глюкозы, 5 г сульфата аммония, 0,5 г ацетата натрия, 3 мг однозамещенного фосфата натрия, а также хлориды калия, кальция и магния, витамины и микроэлементы.

Процедура мутагенной обработки в основном сходна с описанной Аббонданоло и Бонатти ⁽²⁾. Выращенную культуру отмывали от среды, суспендировали в буфере рН 3,0 (лимонная кислота, цитрат натрия). К 9 объемам суспензии, термостатируемой при 25°, приливали 1 объем водного свежеприготовленного 0,17 М раствора нитрита натрия. Продолжительность обработки была выбрана такой, чтобы полные и мозаичные мутанты возникали примерно с одинаковой частотой. Во время обработки суспензия постоянно перемешивалась. Обработку АК прекращали 50–100-кратным разведением отобранной пробы в буфере рН 7,4 (борная кислота, бура). После разведения нейтрализованной суспензии в цитратном буфере рН 4,5 производили рассев на среды БС (0,5% дрожжевого экстракта,

Таблица 1

Влияние кофеина на соотношение полных и мозаичных ade_1 - и ade_2 -мутантов, индуцированных азотистой кислотой *

№ опыта	Выживаемость, %		Просмотрено число колоний		Полные/мозаичные мутанты	
	БС **	БСК ***	БС	БСК	БС	БСК
1-я серия опытов ****						
1	5,4	5,4	11400	14975	21/24	23/44
2	2,0	2,1	8918	28023	16/17	30/64
3	4,2	3,9	15063	12128	23/25	12/34
Всего	—	—	35381	55126	60/66	65/142
2-я серия опытов ****						
4	1,6	1,6	4675	4382	8/6	3/9
5	2,2	2,2	7385	66384	10/9	6/10
6	3,0	3,1	12360	12618	22/25	15/19
7	2,9	2,6	14640	14805	20/27	19/36
Всего	—	—	39060	38190	60/67	43/84
Итого	3,0±0,5	3,0±0,5	74441	93316	120/133	108/226

* Время обработки фиксировано.

** Полноценная питательная среда.

*** БС + 0,5 г/л кофеина.

**** Вероятность тождественности отношений полные/мозаичные мутанты на разных средах в 1-й серии опытов: $<0,005$, $\chi^2=8,1$; во 2-й серии опытов: $<0,05$, $\chi^2=4,1$; в итоге: $<0,001$, $\chi^2=13,1$.

Влияние кофеина на суммарные частоты ade_1^- и ade_2^- -мутаций, индуцированных азотистой кислотой

Серия опытов	Частота полных мутантов		Частота мозаичных мутантов		Общая частота мутаций		Доля полных мутантов	
	БС	БСК	БС	БСК	БС	БСК	БС	БСК
1	17,0	11,8	18,7	25,8	35,6	37,6	0,48	0,31
2	15,4	11,3	17,2	22,0	32,6	33,2	0,47	0,34
1+2	16,1	11,6	17,9	24,2	34,0	35,8	0,47	0,32

Примечание. Приведены величины частот, умноженные на 10^4 .

0,5% пептона, 2% глюкозы, 2% агара) и БСК (БС+0,5 г/л кофеина). Чашки просматривали после 10 дней инкубации при 30° .

Результаты двух серий опытов приведены в табл. 1 и 2. Из табл. 1 можно видеть, что присутствие кофеина в среде, не отражаясь на выживаемости клеток, обработанных АК, достоверно изменяет соотношение полных и мозаичных мутантов. Как можно видеть из табл. 2, присутствие кофеина в среде уменьшает д.п.м. за счет одновременного увеличения частоты мозаичных мутантов и снижения частоты полных мутантов. Общая же частота мутаций не претерпевает при этом сколько-нибудь существенных изменений.

С точки зрения репарационной гипотезы, д.п.м. должна зависеть от интенсивности соответствующих репаративных процессов. Снижение д.п.м. в присутствии ингибитора репарации, каковым во многих случаях является кофеин, казалось бы, вполне укладывается в рамки этой гипотезы. Однако, как видно из представленных данных, в изученном нами случае кофеин, по всей вероятности, не влияет на репарацию летальных (не меняется выживаемость) и мутационных (практически постоянна общая частота мутаций) повреждений. Полученные результаты позволяют сформулировать следующий вывод: в случае мутагенеза под действием АК в образовании полных мутантов у дрожжей играют заметную роль процессы, подавляемые кофеином и, по-видимому, не связанные с репарацией летальных и мутационных повреждений, вызванных действием АК. Природа этих процессов нуждается в исследовании.

Автор приносит благодарность проф. Н. И. Шапиро за интерес к работе и критическое прочтение рукописи и Э. И. Хмызовой за безукоризненную техническую помощь.

Институт атомной энергии
им. И. В. Курчатова
Москва

Поступило
9 IV 1975

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ A. Nasim, Ch. Auerbach, Mutation Res., v. 4, № 1 (1967). ² A. Abbondandolo, S. Bonatti, Mutation Res., v. 9, 59 (1970). ³ V. E. A. Russo, M. M. Stahl, F. W. Stahl, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., v. 65, 363 (1970). ⁴ И. П. Арман, А. Б. Девин, Генетика, т. 5, № 9, 129 (1969). ⁵ J. W. Drake, The molecular basis of mutation. Holden-Day, San Francisco, 1970, p. 186. ⁶ В. В. Кушев, Механизмы генетической рекомбинации, JL, «Наука», 1971, стр. 220. ⁷ Ch. Auerbach, B. J. Kilbey, In: Annual Review of Genetics, v. 5, Palo Alto, 1971, p. 163. ⁸ И. П. Арман, А. Б. Девин, Т. А. Дутова, Генетика, т. 8, № 12, 174 (1972). ⁹ B. Kihlman, Mutation Res., v. 26, 53 (1974).