

А. Б. ДЕВИН

О НЕСТАБИЛЬНОСТИ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ДРОЖЖЕВЫХ КЛЕТОК К ДЕЙСТВИЮ АЗОТИСТОЙ КИСЛОТЫ

(Представлено академиком Д. К. Беляевым 18 XII 1975)

Ранее нами было показано, что контроль чувствительности дрожжевых клеток к летальному действию азотистой кислоты (АК) осуществляется несколькими генетическими факторами ⁽¹⁾, которые оказывают влияние также и на закономерности мутагенеза при действии АК ⁽²⁾. Последнее обстоятельство позволило предположить, что эти факторы, скорее всего, суть ядерные гены, контролирующие этапы репарации генетических повреждений, вызванных действием АК. Делая это предположение, мы опирались на представления о роли репарационных процессов в жизнедеятельности клетки, возникшие в результате многочисленных исследований генетического контроля радиочувствительности у бактерий ⁽³⁾, а также у других объектов, в частности дрожжей ⁽⁴⁾.

При дальнейшем изучении закономерностей инактивирующего действия АК на дрожжевые клетки мы столкнулись с сильным варьированием получаемых результатов. При тщательной стандартизации условий эксперимента обработка АК клеток одного и того же штамма дает значения выживаемости, которые могут различаться от эксперимента к эксперименту в несколько раз, а иногда и в десятки раз. Проведя значительное количество таких стандартных экспериментов и проанализировав накопленные данные, мы пришли к выводу, что поведение генетических факторов, определяющих чувствительность дрожжевых клеток к АК, по-видимому, существенно отличается от поведения обычных ядерных генов, например генов, контролирующих радиочувствительность у тех же дрожжей. Результаты этого анализа и обсуждение возможной природы детерминантов АК-чувствительности излагаются ниже.

Гаплоидный штамм дикого типа X2180-1A, любезно предоставленный проф. В. И. Корогодиным, был нами дважды последовательно клонирован перед введением в работу. Каждая из культур, использованных в экспериментах, была выращена из отдельной колонии. В первых опытах для засева культур брали колонии, представляющие собой субклоны одного и того же выбранного для работы клона. В дальнейшем источником колоний для засева культур служила чашка Петри, на которую в опыте высевали необработанную суспензию (контроль) и после трехдневной инкубации при 30° С помещали в холодильник. Приблизительно через каждые два месяца чашку заменяли на свежую. Выращивание культур, мутагенная обработка, рассев, выращивание и просмотр колоний уже были описаны ⁽⁵⁾.

Были проведены 52 повторности стандартного опыта по обработке АК дрожжевых клеток. Время обработки колебалось от 418 до 454 сек., что соответствует среднему значению 436,4 сек. и стандартному отклонению 8,7 сек. В каждом опыте учитывали выживаемость, общую частоту мутаций в локусах *ade₁* и *ade₂* и соотношение полных и мозаичных мутантов суммарно по этим локусам.

В табл. 1 приведено распределение значений выживаемости, полученных в этих опытах. Это распределение достоверно отличается от нормального по критерию симметричности ⁽⁵⁾: $\chi^2=3,03$; $P<0,005$.

Отличие распределения значений выживаемости от нормального говорит о том, что действие неконтролируемых в опыте факторов, влияющих на выживаемость, обуславливает расслоение накопленных экспериментальных данных на несколько групп, различия между которыми выходят за рамки случайных флуктуаций.

К тому же выводу приводят и данные, представленные на рис. 1. Они говорят о том, что мутагенное действие АК также по-разному проявляется в разных группах опытов. Именно, как общая частота мутаций, так и доля полных мутантов колеблются в зависимости от выживаемости, причем

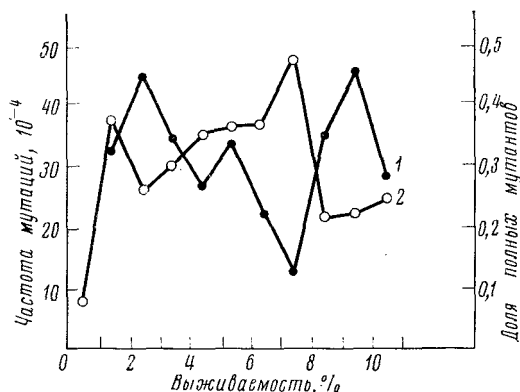


Рис. 1. Зависимость общей частоты индуцированных мутаций в локусах ade_1 и ade_2 (1) и доли полных мутантов (2) от выживаемости дрожжевых клеток, обработанных азотистой кислотой в течение $436,4 \pm 8,7$ сек.

колебания этих двух величин находятся в противофазе. Так, в интервале выживаемости от 2 до 3% средняя общая частота мутаций значимо меньше, чем в интервале от 4 до 8% ($\chi^2=6,60$; $P=0,01$), а в интервале от 4 до 8% она достоверно выше, чем в интервале от 8 до 10% ($\chi^2=6,62$; $P=0,01$). Средняя доля полных мутантов в интервале от 4 до 8% достоверно ниже, чем в интервалах от 2 до 3% ($\chi^2=9,28$; $P<0,005$) и от 8 до 10% ($\chi^2=7,54$; $P<0,01$).

Если считать, что три величины — выживаемость, общая частота мутаций и доля полных мутантов — характеризуют уровень чувствительности клеток, используемых в эксперименте, к действию АК, то легко видеть, что сово-

купность наших данных относится, по крайней мере, к трем достаточно различным уровням чувствительности. Чем же вызваны регистрируемые нами различия между уровнями чувствительности клеток к АК?

Поскольку в настоящей работе выращивание клеток и все последующие методические операции были по возможности стандартизованы, очень трудно предполагать, что выполнение этих простых процедур само по себе способно приводить к резко различным результатам. По всей вероятности, обнаруженные различия были присущи уже клонам, использованным для выращивания соответствующих культур. Следует также полагать, что эти различия между клонами, образованными вегетативными потомками одной и той же клетки, носят наследственный характер, поскольку они сохраняются при выращивании культур.

Что же лежит в основе этих наследственных различий? Как хорошо известно, различия в чувствительности к летальному и мутагенному действию разных агентов могут быть вызваны мутациями в менделирующих генах, которые контролируют уровень этой чувствительности. Спонтанное возникновение подобных мутаций является, видимо, довольно редким событием, поскольку даже при использовании сильных мутагенов для их индукции один мутант приходится обычно на несколько сотен, а иногда и тысяч выживших клеток (^{7, 8}). Иными словами, различия в чувствительности, определяемые соответствующими генами, являются достаточно стабильными, поскольку стабильны сами гены. Мы же наблюдаем в опыте нестабильность уровня чувствительности к АК. Можно было бы предположить, что использованный нами штамм несет утративший стабильность ген (гены), который определяет чувствительность клеток к АК. Мы располагаем, однако, данными анализа чувствительности к АК у выборки гаплоидных потомков от скрещивания двух изогенных петергофских генетических линий, совершенно не связанных происхождением со штаммом X2180-1A, и эти

Таблица 1

Распределение значений выживаемости в 52 стандартных опытах по обработке дрожжевых клеток азотистой кислотой

Выживаемость, %	Число опытов *	Число просмотренных колоний в соответствующих опытах	Выживаемость, %	Число опытов *	Число просмотренных колоний в соответствующих опытах
0-1	4	1330	6-7	4	17 338
1-2	14	14 774	7-8	1	4761
2-3	11	27 158	8-9	2	16 094
3-4	9	25 375	9-10	2	21 050
4-5	3	10 738	10-11	1	7240
5-6	1	3330			

* Указано число опытов, в которых наблюдалась соответствующая выживаемость.

данные показывают, что и здесь распределение значений выживаемости при стандартной обработке отличается от нормального. Следовательно, и в этом случае, скорее всего, имеется нестабильность уровня чувствительности к АК, которую опять приходится предположительно объяснять присутствием нестабильных генов, контролирующих АК-чувствительность.

Если предположение о нестабильных генах справедливо, то отсутствие связи в происхождении упомянутых линий заставляет констатировать, что нестабильность, видимо, является регулярным свойством генов, контролирующих АК-чувствительность.

Рассмотрим теперь возможные в рамках современных генетических представлений механизмы такой нестабильности.

I. Мутационная нестабильность ядерных генов, вызванная действием гена-мутатора, едва ли может служить универсальным объяснением, поскольку гены-мутаторы встречаются не слишком часто.

II. Автономная нестабильность ядерных генов. Несколькими авторами исследовалась так называемая «реплицирующая нестабильность» дрожжевых клеток (⁹⁻¹¹), механизмы которой пока не вполне ясны. Возможно, что наши наблюдения относятся к сходному явлению, хотя то обстоятельство, что состояние «реплицирующей нестабильности» возникает в клетке, видимо, в результате мутагенной обработки, снижает вероятность наличия такого состояния у клеток дикого типа.

В последнее время появились данные о наличии эписом у дрожжей (¹²). Интеграция эписом в геном и элиминация их из генома, видимо, могли бы происходить гораздо чаще, чем точковые спонтанные мутации в том же самом участке генома. Можно представить себе, что нестабильность уровня АК-чувствительности обусловлена взаимодействием генома и эписом, регулярно присутствующих в дрожжевых клетках и имеющих сродство к соответствующим участкам генома.

III. Нестабильность цитоплазматических генов. У дрожжей, как и у многих других эукариотических организмов, наследственные детерминанты обнаружены не только в ядре, но и в цитоплазматических органеллах. Так, например, митохондрии дрожжей содержат ДНК, несущую генетическую информацию (¹³). Цитоплазматические гены способны мутировать, и их изменения могут происходить с гораздо большими вероятностями, чем мутации ядерных генов. Можно предположить, что определенные изменения цитоплазматических генов, происходящие с высокой частотой, могут влиять на АК-чувствительность клеток.

Варианты II и III, как нам кажется, исчерпывают возможные простые генетические механизмы вариаций АК-чувствительности дрожжей. Не ис-

ключено, что в основе этих вариаций лежат более сложные генетические механизмы, но их обсуждение представляется преждевременным ввиду отсутствия конкретных данных. Наконец, в основе неустойчивости АК-чувствительности дрожжей могут лежать и так называемые эпигенетические события ⁽¹⁴⁾, однако для соображений относительно конкретного характера соответствующих изменений пока нет даже самых косвенных данных.

Таким образом, в настоящей работе показано, что уровень чувствительности дрожжевых клеток к летальному и мутагенному действию АК может проявлять заметную неустойчивость. Предполагается, что эта неустойчивость уровня чувствительности отражает неустойчивость соответствующих генетических факторов, природа которых нуждается в дальнейшем исследовании.

Автор выражает благодарность проф. Н. И. Шапиро за критическое прочтение рукописи и Г. В. Ксенофонтовой за техническую помощь.

Институт атомной энергии
им. И. В. Курчатова
Москва

Поступило
18 XII 1975

ЛИТЕРАТУРА

- ¹ И. П. Арман, А. Б. Девин, Т. А. Дугова, Генетика, т. 10, № 1, 112 (1974).
² А. Б. Девин, Канд. дисс., МГУ, 1972. ³ E. M. Witkin, Ann. Rev. Gen., v. 3, 525 (1969). ⁴ И. А. Захаров, А. С. Кривиский, Радиационная генетика микроорганизмов, М., Атомиздат, 1972, стр. 86. ⁵ А. Б. Девин, ДАН, т. 223, № 4 (1975).
⁶ Дж. У. Снедекор, Статистические методы в применении к исследованиям в сельском хозяйстве и биологии, М., Сельхозгиз, 1961, стр. 194. ⁷ S. Nakai, Sh. Matsumoto, Mutation Res., v. 4, 129 (1967). ⁸ B. S. Cox, J. M. Parry, Mutation Res., v. 6, 37 (1968). ⁹ A. Nasim, Mutation Res., v. 4, 753 (1967). ¹⁰ N. Loprieno, A. Abbondandolo et al., Gen. Res., v. 12, 45 (1968). ¹¹ N. P. Dubinin, O. N. Kurennaya et al., Mutation Res., v. 16, 249 (1972). ¹² M. Guerinneau, P. P. Slonimski, P. R. Avner, Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 61, 462 (1974). ¹³ Р. Сэджер, Цитоплазматические гены и органеллы, М., «Мир», 1975, стр. 43. ¹⁴ Г. Харрис, Ядро и цитоплазма, М., «Мир», 1973, стр. 178.