

УДК 575.224:582.282.23

ИНДУКЦИЯ МУТАЦИЙ РАЗЛИЧНОЙ ПРИРОДЫ У ДРОЖЖЕЙ *Saccharomyces cerevisiae* ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ γ -ИЗЛУЧЕНИЯ

К. А. Любимова, Н. В. Шванева, Н. А. Колтовая

Объединенный институт ядерных исследований, Дубна

В работе приводятся результаты по индукции γ -излучением мутационных изменений определенной генетической природы у одноклеточного эукариотического организма дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Используются различные тестерные системы, позволяющие определять потерю целой хромосомы, крупные перестройки генома (митотический кроссинговер) и точечные мутации (сдвиг рамки считывания, замена пар оснований ДНК). Изучив широкий спектр генетических изменений, вызванных γ -излучением, мы определили, что наиболее эффективно индуцируются крупные перестройки, а зависимость частоты точечных мутаций от дозы носит линейный характер. Рассмотрены количественные стороны мутагенеза, показано, что используемые нами генетические системы не являются специфическими. Планируется использовать данные системы для изучения мутагенного действия ионизирующих излучений с различными физическими характеристиками.

Several tester systems were used to study a wide spectrum of genetic changes induced by γ -radiation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. The tester systems allow one to identify a loss of chromosomes, recombination (crossing over) and point mutations (frameshifts and base-pair substitutions). Large genome changes were induced by γ -rays more efficiently than the point mutations. The dose dependence of the point mutations frequency was linear. Spontaneous and induced mutation rates per base pair corresponded with the known literature data for the same tester systems. Our finding shows that the used tester systems are not specific. They are useful for further study of mutations induced by ionizing radiation with various physical characteristics.

Действие ионизирующей радиации на живые организмы вызывает различные последствия. Наиболее существенными из них являются гибель клеток и возникновение мутаций. В данной работе представлены результаты изучения индукции широкого спектра генетических изменений под действием γ -излучения. В качестве модельной системы мы использовали дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*, представляющие собой эукариотический одноклеточный организм. В силу консервативности основных клеточных процессов и простоты обращения с ними, дрожжи широко используются в качестве модельной системы для изучения процессов, происходящих в клетках эукариот.

Хорошо разработаны генетические системы по тестированию крупных изменений, труднее определить молекулярную природу локальных мутационных событий, затрагивающих один или несколько нуклеотидов. В немногочисленных ранних работах для определения природы мутаций использовались косвенные методы. Например, индуцированный излучением мутагенез в гене *CYC1*, кодирующем белок изо-1-цитохром *c*, изучался с помощью заранее полученной коллекции мутантов известного генотипа. Об эффективности индукции замены определенных пар оснований и о спектре γ -индуцированных мутаций

можно судить по частоте ревертирования под действием γ -излучения у полученных мутантов [1]. Природа реверсий мутаций *cus1-9 (ochre)* и *cus1-179 (amber)* под действием рентгеновского излучения и α -частиц определялась по изменениям непосредственно в аминокислотной последовательности белка изо-1-цитохром *c* [2]. В этих работах показано, что рентгеновское излучение и α -частицы в основном индуцировали замены пар оснований; были зарегистрированы микроделеции и комплексные повреждения.

Анализ прямых мутаций в гене *ADE2* с помощью межallelной комплементации и последующей способности полученных мутантов ревертировать под действием специфических мутагенов позволял косвенно определять молекулярную природу индуцированных излучением мутантов [3]. Среди отобранных мутантов, индуцированных УФ-светом и γ -радиацией, более 90 % составляли замены пар оснований и 6–8 % — сдвиг рамки считывания; делеции не обнаружены. В спектре замен пар оснований преобладали транзиции ГЦ–АТ. Авторы предполагают, что γ -излучение вызывает спектр мутаций, близкий к теоретически ожидаемому для неспецифического мутагена, а УФ-свет индуцирует повышенное количество ГЦ–АТ транзиций, что объясняется его избирательным действием на пиримидиновые основания.

В конце 80-х годов были разработаны методы, позволяющие непосредственно определять молекулярную природу мутаций, используя секвенирование нуклеотидной последовательности ДНК. С помощью генетических систем *URA3* и *SUP4-o* были изучены спектры мутаций, вызываемые некоторыми химическими агентами и УФ-светом. Так, путем отбора прямых мутаций в гене *URA3* и последующего его секвенирования были определены горячие точки и спектры мутаций [4]. Большинство мутаций, индуцированных УФ-светом, возникали в районе пиримидиновых димеров ТТ и ТЦ, в спектре преобладали транзиции АТ–ГЦ. Интересные результаты были получены при использовании помещенного на плазмиду гена *SUP4-o*, супрессирующего *ochre*-мутации [5]. Прямые мутации в этом гене отбирались по исчезновению способности супрессировать *ochre*-мутации одновременно в нескольких генах. Секвенирование нуклеотидной последовательности мутантов по гену *SUP4-o* показало, что, в отличие от спонтанного мутагенеза, где преобладали трансверсии, при УФ-облучении индуцировались в основном транзиции ГЦ–АТ. Для определения спектра мутаций, возникающего под действием ионизирующей радиации, тестерные системы *URA3* и *SUP4-o* не использовались.

Несмотря на то, что методы прямого секвенирования являются наиболее точными и информативными для изучения молекулярной природы мутаций, они остаются дорогостоящими и трудоемкими. Поэтому для изучения мутагенного действия ионизирующей радиации мы использовали генетические системы, позволяющие определять природу мутационного события, не прибегая к молекулярным методам.

1. РЕЗУЛЬТАТЫ

В данной работе представлены результаты изучения индукции под действием γ -излучения мутаций разной природы. Для этой цели мы использовали различные тестерные системы дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, характеристики которых приведены в табл. 1. Облучение дрожжевых клеток проводили на установке «Свет», в качестве источника γ -излучения использовался ^{137}Cs (мощность дозы 25 Гр/мин). Клетки ресуспендировали в воде, облучали при 0 °С и затем рассеивали на питательные среды [6, 7].

Таблица 1. Штаммы дрожжей *S. cerevisiae*, используемые в работе

Штамм	Генотип	Источник
D1, D2	<i>MATa/MATα srm1/SRM1 ade2-192/ ade2-G45 (IV)</i>	Сконструирован Н. А. Колтовой (ОИЯИ, Дубна) и А. Б. Девиным (ИМГ, Москва)
CO1/5–CO1/8	<i>MATa/MATα ade2-192/ade2-G45 lys5-1/LYS5 met13-1/MET13 cyh2/CYH2 leu1-1/leu1-12 ade6/ADE6</i>	
RKY3023	<i>MATa his3Δ200 ura3-52 leu2Δ1 trp1Δ63 ade2Δ1 ade8 hom3-10 lys2ΔBgl</i>	Предоставлен профессором Р. Д. Колоднером (Лаборатория генетики Ун-та Висконсина, США)
YMH1	<i>MATα CYC1 cyc7-67 ura3-52 leu2-3,112 cyh2</i>	Предоставлены профессором М. Хемпси (Медицинский центр Ун-та Луизианы, США)
YMH2–YMH7	<i>MATα cycl1-i* cyc7-67 ura3-52 leu2-3,112 cyh2</i>	
YMH51	<i>MATα/MATa CYC1/cycl1-1 cyc7-67/cyc7-67 ura3-52/ura3-52 leu2-3,112/LEU2 HIS1/his1-1 CAN1/ can1-100 cyh2/CYH2</i>	
YMH52–YMH57	<i>MATα/MATa cycl1-i*/cycl1-1 cyc7-67/cyc7-67 ura3-52/ura3-52 leu2-3,112/LEU2 HIS1/his1-1 CAN1/can1-100 cyh2/CYH2</i>	

**cycl1-i*, *i* = 2–7, подробнее описание мутации дано в табл. 2.

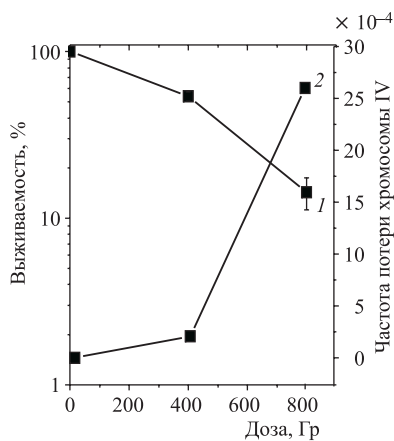


Рис. 1. Выживаемость (1) и зависимость частоты потери VI хромосомы (2) от дозы γ -излучения у дисомиков по VI хромосоме. Приведены результаты усреднения двух экспериментов и стандартные ошибки

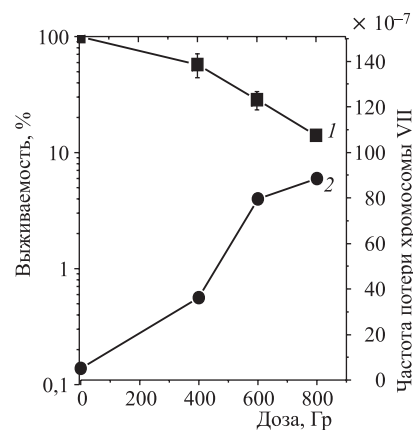


Рис. 2. Выживаемость (1) и зависимость частоты потери VII хромосомы (2) от дозы γ -излучения у диплоидов CO1–CO4. Приведены результаты усреднения двух экспериментов и стандартные ошибки

1.1. Потеря хромосом. Дрожжи являются удобным объектом для изучения стабильности хромосом. Они толерантны к дисомии и потере хромосомы диплоидной клеткой. Мы анализировали потерю IV хромосомы у дисомиков по изменению пигментации и VII хромосомы у диплоидов по проявлению рецессивных маркеров. Стабильность хромосом различна, у дисомиков лишняя хромосома утрачивается с высокой частотой ($7 \cdot 10^{-4}$). В диплоидных клетках хромосомы более стабильны, VII хромосома утрачивается с частотой $1,4 \cdot 10^{-7}$. Гамма-излучение при дозе 800 Гр повышает частоту потери хромосом до $3 \cdot 10^{-3}$ и $9 \cdot 10^{-6}$ соответственно (рис. 1, 2; табл. 2).

1.2. Крупные перестройки генома. Для определения крупных перестроек генома использовалась генетическая система, позволяющая тестировать рекомбинационные события. Частота митотического кроссинговера учитывалась у гетероаллельных диплоидов *ade2-192/ade2-G45*, прототрофных вследствие комплементации мутантных аллелей *ade2*. Митотический кроссинговер между центромерой хромосомы XV и локусом *ADE2* и последующая гомозиготизация приводят к появлению аденинзависимых колоний и накоплению пигмента в дрожжевых клетках: колонии с генотипом *ade2-192/ade2-192* имеют красную окраску, *ade2-G45/ade2-G45* — розовую.

Частоту спонтанной митотической рекомбинации определяли, рассеивая культуры клеток CO1–CO4 на полную питательную среду и определяя долю красно-розовых мозаичных колоний. Частота спонтанной митотической рекомбинации, усредненная для четырех линий, составляла $(1,43 \pm 1,08) \cdot 10^{-5}$.

Гамма-лучи эффективно индуцировали митотическую рекомбинацию. На рис. 3 представлены кривые индукции митотического кроссинговера. Зависимость выхода межгенной рекомбинации от дозы облучения имела сложный характер — при малых дозах кривая линейна, а затем выходит на плато. При выживаемости 20% доля рекомбинантных клонов составляла несколько процентов от выживших клеток.

1.3. Внутригенные мутации. Для анализа внутригенных мутаций различной природы использовали прямые мутации резистентности к канаванину $\text{Can}^S \rightarrow \text{Can}^R$ в гене *CAN1*. Известно, что мутации Can^R локализованы в единственном локусе *CAN1*, кодирующем структурный ген аргининспецифичной пермиазы. Резистентность к канаванину может быть вызвана различными молекулярными событиями. В Лаборатории генетики Университета штата Висконсин, США, под руководством проф. Р. Д. Колоднера показано, что при спонтанном мутагезе в гене *CAN1* преобладали замены пар оснований, наблюдались также сдвиг рамки считывания и комплексные мутации [8].

В данной работе для индукции мутаций в гене *CAN1* использовали γ -излучение в пределах доз до 100 Гр. После облучения клетки дрожжей высевали на минимальную среду без аргинина, с добавлением канаванина (60 мг/л), на которой были способны расти только устойчивые к канаванину мутанты, и на полную среду БС для определения количества выживших клеток. Из рис. 4 видно, что суммарная частота мутаций в гене *CAN1* имела линейную зависимость от дозы и достигала $6 \cdot 10^{-5}$ при дозе 100 Гр, при этом выживаемость составляла около 20%.

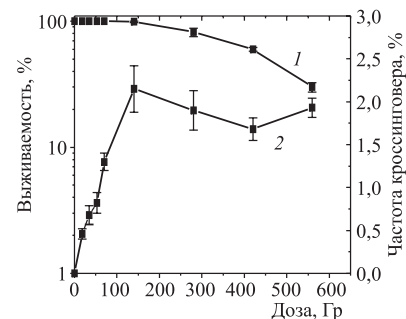


Рис. 3. Выживаемость (1) и зависимость частоты митотического кроссинговера (2) от дозы γ -излучения у диплоидов CO1–CO4. Приведены результаты усреднения трех экспериментов и стандартные ошибки

Таблица 2. Спонтанный и γ -индуцированный мутагенез для различных генетических систем у дрожжей *S. cerevisiae*

Генетическая система	Мутационное событие	Размер участка мутирования	Спонтанные мутации		γ -индуцированные мутации (доза 100 Гр)	
			Спектр	Частота	Частота на 1 нуклеотид	Частота
IV (n + 1) VII (2n)	Потеря IV хромосомы Потеря VII хромосомы	1554 тпн 1091 тпн		7 · 10 ⁻⁴ 1,4 · 10 ⁻⁷		3 · 10 ⁻³ (800 Гр) 9 · 10 ⁻⁶ (800 Гр)
CENXV-ADE2	Ade ⁻ → Ade ⁺ ade2-192/ade2-G45 → ade2-192/ade2-192 ade2-G45/ade2-G45	Расстояние между геном ADE2 и центроммерой 237,8 тпн	Митотический кроссинговер	1,1 · 10 ⁻⁴		1,75 · 10 ⁻²
CANI	Can ^s → Can ^r	1800 пн	ЗПО (65%) СРС (25%) К (25%)	2,8 · 10 ⁻⁷	1,5 · 10 ⁻¹⁰	5,8 · 10 ⁻⁵ 2,9 · 10 ⁻⁸
LYS2	Lys ⁻ → Lys ⁺ lys2-Bgl → LYS2 +4bp → +3bp	143 пн (длина гена 4179 пн)	ЗПО (0%) СРС (75%) К (25%)	1,4 · 10 ⁻⁸	0,9 · 10 ⁻¹⁰	1,0 · 10 ⁻⁶ 0,7 · 10 ⁻⁸
HOM3	Hom ⁻ → Hom ⁺ hom3-10 → HOM3 +8bp → +7bp	7 пн (длина гена 1584 пн)	ЗПО (0%) СРС (88%) К (12%)	1,0 · 10 ⁻⁸	1,4 · 10 ⁻⁹	1,6 · 10 ⁻⁷ 1,6 · 10 ⁻⁸
СУС1	Cys ⁻ → Cys ⁺	1 пн	ЗПО (100%)			
Диплоиды suc1-2 suc1-3 suc1-4 suc1-5 suc1-6 suc1-7	ГЦ → АГ АГ → ТА ГЦ → ТА ГЦ → ЦГ АТ → ЦГ АТ → ГЦ			1,3 · 10 ⁻⁹ 0,3 · 10 ⁻⁹ 1,0 · 10 ⁻⁹ 0,1 · 10 ⁻⁹ 0,3 · 10 ⁻⁹ 0,3 · 10 ⁻⁹	1,3 · 10 ⁻⁹ 0,3 · 10 ⁻⁹ 1,0 · 10 ⁻⁹ 0,1 · 10 ⁻⁹ 0,3 · 10 ⁻⁹ 0,3 · 10 ⁻⁹	(1,2 ± 0,1) · 10 ⁻⁷ (0,8 ± 0,1) · 10 ⁻⁷ (0,4 ± 0,04) · 10 ⁻⁷ (0,4 ± 0,04) · 10 ⁻⁷ (0,2 ± 0,04) · 10 ⁻⁷ (0,3 ± 0,1) · 10 ⁻⁷
ADE1, ADE2*	Ade ⁺ → Ade ⁻	920 пн, 1715 пн				6 · 10 ^{-5**} 2,3 · 10 ^{-8**}

Примечание: пн — пар нуклеотидов; тпн — тысяча пар нуклеотидов; ЗПО — замена пар оснований; СРС — сдвиг рамки считывания; К — комплексные мутации.

* Усреднение по всем нуклеотидам.

** По данным Е. А. Иванова с соавторами [3].

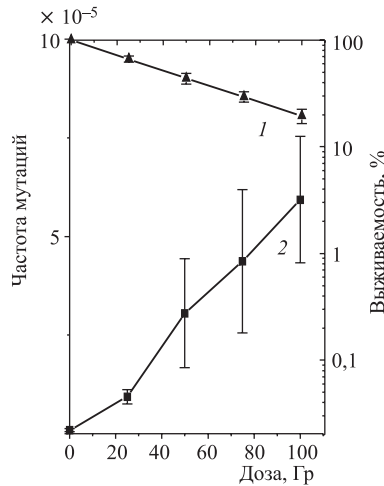


Рис. 4. Выживаемость (1) и зависимость частоты мутаций $\text{Can}^S \rightarrow \text{Can}^R$ (2) от дозы для тестерного гаплоидного штамма RKY3023. Приведены результаты усреднения трех экспериментов и стандартные ошибки

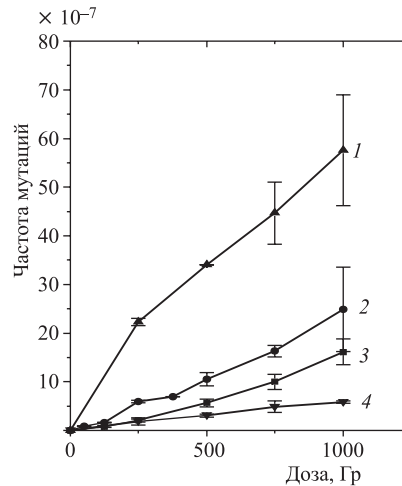


Рис. 5. Зависимость частоты сдвига рамки считывания $\text{Lys}^- \rightarrow \text{Lys}^+$ (1) и $\text{Hom}^- \rightarrow \text{Hom}^+$ (2), а также замены пар оснований в результате трансверсии АТ-ТА $\text{Cys}^- \rightarrow \text{Cys}^+$ от дозы γ -излучения для тестерных диплоидных (3) и гаплоидных (4) штаммов. Приведены результаты усреднения шести экспериментов и стандартные ошибки

1.4. Мутации сдвига рамки считывания. Удобная тестерная система, позволяющая определять мутации сдвига рамки считывания, была любезно предоставлена нам проф. Р. Д. Колоднером. Характеристика используемого штамма RKY2672 представлена в табл. 1. Для анализа внутригенных микроделеций использовали мутации сдвига рамки считывания за счет вставки размером четыре нуклеотида в гене *LYS2* и одного тимина в последовательности из 6Т в гене *HOM3* [8]. При спонтанном ревертировании этих генов к дикому типу подавляющее большинство мутационных событий представляет собой делецию одного нуклеотида, причем в гене *HOM3* делеция практически всегда располагается в мононуклеотидном треке, состоящем из 7 тиминовых оснований, а в гене *LYS2* — на участке размером 143 нп.

Индукцию мутаций сдвига рамки считывания в генах *LYS2* и *HOM3* под действием γ -излучения изучали в широком диапазоне доз — до 1000 Гр (рис. 5). Облученную культуру клеток RKY2672 рассеивали на минимальной среде без лизина и без треонина для мутантов *lys2* и *hom3* соответственно. Частота реверсий в гене *LYS2* составляла при максимальной используемой дозе $5,8 \cdot 10^{-6}$, в гене *HOM3* — $2,5 \cdot 10^{-7}$. Зависимость частоты ревертирования от дозы имела линейный характер для обоих генов. Частота спонтанных мутаций в этих генах составляла $1,4 \cdot 10^{-8}$ и $1,0 \cdot 10^{-8}$ для генов *LYS2* и *HOM3* соответственно (табл. 2).

1.5. Замена пар оснований. Система штаммов для определения замен пар оснований была разработана и предоставлена нам проф. М. А. Хемпси (Медицинский центр Университета штата Луизиана, США) [9]. В тестерной системе используется ген *CYC1*, кодирующий одну из субъединиц дыхательного фермента цитохром *c*. Мутационные изменения гена приводят к нарушению дыхания, и, вследствие этого, клетки теряют

способность расти на среде с несбраживаемым источником углерода. Таким образом, тестерные штаммы, обладающие Cys^- -фенотипом, дыхательно недостаточны и растут только на среде, содержащей глюкозу в качестве источника углерода.

Тестерная система состоит из шести изогенных штаммов (УМН52–УМН57), имеющих замены пар оснований в кодоне 22 гена *CYC1*, кодирующем цистеин (*Cys22*). Наличие цистеина в положении 22 в белке изо-1-цитохром *c* является критическим, поэтому любая замена приводит к инактивации фермента. Восстановление функциональной активности фермента возможно только за счет истинных реверсий, восстанавливающих кодон цистеина в положении 22. Реверсия каждого штамма представляет одну из шести возможных замен пар оснований: транзицию или трансверсию. Таким образом, если в клетке данного штамма произошла реверсия, можно точно сказать, за счет какого молекулярного события это произошло. Безальтернативность этого заключения достигается вследствие следующих причин: а) любая замена аминокислоты в положении 22 полностью нарушает функциональность белка; б) все используемые мутации являются миссенс-мутациями, что полностью исключает возможность наиболее широко встречающейся супрессии нонсенс-мутаций; в) блокирована рекомбинация с гомологом аллеля *cyc1*, так как *cyc1* находится в гемизиготном состоянии; г) делегирован ген *CYC7*, кодирующий изо-2-цитохром *c*, активность которого могла маскировать проявление истинных реверсов, а также исключена рекомбинация между генами *CYC1* и *CYC7*.

Индукция γ -излучением замен пар оснований изучалась у диплоидных (УМН52–УМН57) и гаплоидных (УМН2–УМН7) штаммов дрожжей. Для определения частоты мутирования клетки рассевали на селективную питательную среду, содержащую глицерин в качестве источника углерода. Частота спонтанных мутаций, определенная в наших экспериментах, у тестерных штаммов низка и колеблется в пределах от $3 \cdot 10^{-10}$ до $1,3 \cdot 10^{-9}$ (табл. 2).

Под действием γ -излучения образуются все типы замен пар оснований (табл. 2). Типичные кривые зависимости частоты индукции реверсов от дозы γ -излучения для диплоидных и гаплоидных клеток представлены на рис. 5. Несмотря на различия абсолютных значений частот мутирования, форма полученных дозовых кривых для гаплоидных штаммов описывается линейной функцией, а для диплоидных — линейно-квадратичной.

Частоты замен пар оснований при дозах 100–1000 Гр составляли от $2 \cdot 10^{-8}$ до $3 \cdot 10^{-6}$, в зависимости от типа реверсий. У диплоидных штаммов при дозах более 250 Гр частота мутирования была выше, чем у соответствующих гаплоидов при тех же дозах, хотя размер мишени один и тот же, поскольку диплоидные штаммы гемизиготны по гену *CYC1*.

2. ОБСУЖДЕНИЕ

Несомненный научный и практический интерес представляет изучение эффективности индукции различных типов мутаций с помощью ионизирующей радиации. В данной работе приводятся результаты по индукции γ -излучением мутационных изменений определенной генетической природы, а именно потерь хромосом, крупных перестроек, микроделетий и замен пар оснований у одноклеточного эукариотического организма дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*.

Ионизирующая радиация вызывает широкий спектр повреждений ДНК. Это одно- и двунитевые разрывы ДНК, поперечные сшивки, разрывы водородных связей между

основаниями, разрушение термолабильного фосфата сахара, повреждение и модификация оснований [10]. Нерепарируемые двунитевые разрывы ДНК вызывают гибель клетки, а в результате репарации двунитевого разрыва могут происходить крупные перестройки генома, такие как кроссинговер и конверсия. Из приведенных данных видно, что гибель клеток при дозах 100 Гр достигает 20 % для диплоидных штаммов. При низких дозах эффективно индуцируются крупные перестройки, частота рекомбинации достигает 2 % (рис. 3).

К наиболее частому типу повреждений относятся модификации оснований, которые можно условно разделить на два класса. К первому классу относятся модификации азотистых оснований, которые не препятствуют образованию водородных связей, вызываемые ими мутации возникают в ходе репликации ДНК по механизму ошибочного спаривания. Ко второму классу относятся некодирующие повреждения, которые изменяют структуру оснований настолько, что комплементарное спаривание оказывается невозможным и запускается сложный клеточный ответ, включающий в себя индукцию высокоошибочной (мутагенной) ветви репарации. Следствием таких повреждений обычно бывают точечные мутации — вставка-выпадение нуклеотида и замена пар оснований [11]. Из табл. 2 видно, что подобные изменения (микроделеции и замены пар оснований) при низких дозах γ -излучения индуцируются менее эффективно, чем крупные перестройки, при более высоких дозах (1000 Гр) частота индукции таких мутаций повышается и составляет 10^{-6} – 10^{-8} (рис. 5).

В большинстве работ, описывающих индукцию прямых и обратных мутаций при воздействии γ -излучением на дрожжевые клетки, выявляются линейные зависимости частоты мутирования от дозы. В изученных нами тестерных системах дрожжей наблюдается, в основном, такая же зависимость. Исключение составляет частота межгенной рекомбинации, которая демонстрирует линейную зависимость только при малых дозах, а затем выходит на плато. По-видимому, линейный участок отражает эффективное функционирование рекомбинационной репарации, а выход на плато свидетельствует о недовыявлении за счет возникновения множественных рекомбинантов и гибели части рекомбинантных клеток.

Частота замен пар оснований в клетках диплоидных штаммов описывается линейно-квадратичной зависимостью от дозы. Известно, что плоидность и тип спаривания могут сильно влиять на спонтанный и индуцированный мутагенез [12]. Поскольку в изучаемой нами тестерной системе мишень в гаплоидных и диплоидных клетках была одинаковой (одна копия гена), можно предположить, что различия в характере индуцированного мутагенеза в штаммах разной плоидности обусловлены особенностями диплоидспецифической репарации.

В различных лабораториях для изучения закономерностей мутагенеза используются многочисленные генетические системы. В данной работе для оценки индукции мутаций различной природы также использовано несколько генетических систем. Представляет интерес оценка специфичности выбранных генетических систем и характерных частот мутирования, рекомбинации и потери хромосом в дрожжевых клетках. Искажение частоты мутагенеза возможно из-за присутствия в генах «горячих точек», в которых количество мутаций может быть повышено в несколько раз по сравнению с окружающими участками [13]. Используемая нами тестерная система на основе гена *НОМ3*, имеющего размер 1584 пар оснований, характеризуется выпадением нуклеотида на участке, который представляет собой последовательность из 7 повторяющихся тиминов, и, сле-

довательно, является примером «горячей точки». С другой стороны, оценка частоты индукции сдвига рамки считывания по фенотипу занижена, поскольку мутации, возникающие в конце кодирующей последовательности, могут не влиять на функциональность продукта. Занижение частоты замен пар оснований происходит также за счет вырожденности кода. На частоту замен пар оснований может оказывать влияние эффект положения основания в контексте нуклеотидной последовательности и пространственное расположение его на хромосоме. Например, частота спонтанной замены оснований ГЦ–АТ может различаться в 2000 раз в пределах одного гена [14]. По нашим данным в кодоне Cys22 гена *CYC1* большая часть замен приходится на первую пару оснований исследуемого триплета. Частота прямых мутаций в гене *CAN1* может быть занижена за счет того, что выявляются только фенотипические мутанты. В связи с этим представляется целесообразным полученную скорость мутирования нормировать на длину участвующего в мутагенезе фрагмента ДНК и сравнить с литературными данными по другим системам.

Профессором Дж. В. Дрейком была проведена работа по оценке скорости спонтанного мутирования у организмов различных таксономических групп [15, 16]. В работе приводятся частоты спонтанного мутирования для нескольких генов дрожжей. Для прямых мутаций в гене *CAN1* размером 1,8 тпн она составляла $1,73 \cdot 10^{-10}$ на один нуклеотид. В гене *SUP4*-о, расположенном на плазмиде и состоящем из экзона 75 пн и интрона 14 пн, средняя частота спонтанного мутирования составляла $7,9 \cdot 10^{-9}$ на один нуклеотид. Спонтанные замены пар оснований в гене *URA3* (804 пн) происходили со скоростью $2,8 \cdot 10^{-10}$ на один нуклеотид. Таким образом, в дрожжевых клетках скорости спонтанных мутаций для разных генетических систем различались на 1–2 порядка.

Были исследованы другие микроорганизмы — бактерии и грибы. Размеры их генома различаются в 6500 раз, а средние скорости мутирования в пересчете на один нуклеотид — в 16 000 раз. Показано, что при нормировке на размер генома значения спонтанных частот мутирования различаются в 2,5 раза и составляют в среднем 0,033 на репликацию. У высших эукариот, если учитывать только работающий геном, соответствующий показатель тоже имеет близкое значение. Дрейк объясняет подобное единообразие тем, что частота мутаций на уровне генома является объектом естественного отбора, в результате которого вырабатываются оптимальные, эволюционно выгодные значения частоты спонтанного мутагенеза.

В сводной табл. 2 приведены полученные нами частоты мутирования, абсолютные и нормированные на одну пару оснований. Видно, что частоты спонтанного мутагенеза различаются на три порядка, при нормировании на один нуклеотид они колеблются от $1 \cdot 10^{-10}$ до $1,4 \cdot 10^{-9}$. Хотя частоты могут сильно различаться, при нормировке на размер генома они сводятся к характерным величинам.

Для внутригенных мутаций различной молекулярной природы, индуцированных γ -излучением, значение частоты колеблется от $5,8 \cdot 10^{-5}$ до $3 \cdot 10^{-8}$ при дозе 100 Гр. При той же дозе частота реверсий в гене *LEU2* составляла $1-2 \cdot 10^{-5}$ [17], а частота прямых мутаций в генах *ADE1* и *ADE2* — суммарно $\sim 6 \cdot 10^{-5}$ [3], что близко к полученной нами частоте прямых мутаций в гене *CAN1*. Более высокая частота мутаций в гене *LYS2*, по сравнению с геном *HOM3*, объясняется, по-видимому, тем, что мутационные события наблюдаются на участке гена, содержащем 143 пары оснований, в то время как во втором случае — на участке из 7 повторяющихся тиминов. При нормировке на один нуклеотид разброс значений частот для γ -индуцированных мутаций, так же, как и для спонтанных, уменьшается и составляет $10^{-8}-10^{-7}$ (табл. 2).

Итак, изучив широкий спектр генетических изменений, вызванных γ -излучением, мы определили, что частоты внутригенных мутаций, нормированные на один нуклеотид, менее вариабельны, чем абсолютные частоты, а зависимость частоты мутирования от дозы носит линейный характер для большинства использованных тестерных систем. Таким образом, выбранные нами генетические системы не являются специфическими и мутируют с характерными частотами. В настоящее время ведется работа по изучению закономерности индукции мутаций различной природы под действием ионизирующих излучений с другими физическими характеристиками.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Prakash L., Sherman F. Mutant of yeast defective in iso-1-cytochrome *c* // *Genetics*. 1973. V. 77. P. 255–284.
2. Das G., Stewart G. W., Sherman F. Mutation alteration induced in yeast by ionizing radiation // *Mutat. Res.* 1986. V. 163. P. 233–245.
3. Иванов Е. Л., Ковальцова С. В., Королев В. Г. Молекулярная природа прямых генных мутаций, индуцированных гамма- и ультрафиолетовым излучением у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* // *Генетика*. 1983. Т. 19, № 7. С. 1063–1069.
4. Lee G. S.-F. et al. The base alteration spectrum of spontaneous and ultraviolet radiation-induced forward mutations in the *URA3* locus of *Saccharomyces cerevisiae* // *Mol. Gen. Genet.* 1988. V. 214. P. 51–59.
5. Pierce M. K., Giroux C. N., Kunz B. A. Development of a yeast system to assay mutational specificity // *Mutat. Res.* 1987. V. 182. P. 65–74.
6. Захаров И. А. и др. Сборник методик по генетике дрожжей-сахаромицетов. Л.: Наука, 1984. 287 с.
7. Любимова К. А. и др. Закономерности индукции точечных мутаций у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* при гамма-облучении // *Генетика*. 1998. Т. 34, № 9. С. 1228–1232.
8. Tishkoff D. X. et al. A novel mutation avoidance mechanism dependent on *S. cerevisiae* *RAD27* is distinct from DNA mismatch repair // *Cell*. 1997. V. 88. P. 253–263.
9. Hampsey M. A. Tester system for detecting each of base pair substitution in *Saccharomyces cerevisiae* by selecting for an essential cysteine in iso-1-cytochrome *c* // *Genetics*. 1991. V. 128. P. 59–67.
10. Окада С. Радиационная биохимия клетки. М.: Мир, 1974. 407 с.
11. Teoule R. Radiation-induced DNA damage and its repair // *Intern. J. Radiat. Biol.* 1986. V. 51. P. 573–589.
12. Taran H. T. et al. Genetic factors affecting the impact of DNA polymerase delta proofreading activity on mutation avoidance in yeast // *Genetics*. 1999. V. 152. P. 47–59.
13. Glickman B. W., Rietved K., Aaron C. S. γ -ray induced mutational spectrum in the *lacI* gene of *Escherichia coli*. Comparison of induced and spontaneous spectra at the molecular level // *Mutat. Res.* 1980. V. 69. P. 1–12.

108 Любимова К. А., Шванева Н. В., Колтовая Н. А.

14. Ronen A., Rahat A. Mutagen specificity and position effects on mutation in T4rII nonsense sites // *Mutat. Res.* 1976. V. 34. P. 21–34.
15. Drake J. W. *et al.* Rates of spontaneous mutation // *Genetics.* 1998. V. 148. P. 1667–1686.
16. Drake J. W. A constant rate of spontaneous mutation in DNA-based microbes // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1991. V. 88. P. 7160–7164.
17. Чепурной А. И., Михова-Ценова Н., Брунцова Х. Закономерности образования гамма-индуцированных мутантов *Saccharomyces cerevisiae* // *Генетика.* 1989. Т. 25. С. 1179–1187.

Получено 25 мая 2004 г.