

P19-2008-97

А. Н. Степанова*, Н. А. Колтовая

ИНДУКЦИЯ УТРАТЫ ФРАГМЕНТОВ ДНК
ПОД ДЕЙСТВИЕМ УФ-СВЕТА У ДРОЖЖЕЙ
SACCHAROMYCES CEREVISIAE

*E-mail: aleksandras@inbox.ru

Степанова А. Н., Колтовая Н. А.

P19-2008-97

Индукция утраты фрагментов ДНК под действием УФ-света
у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*

В работе изучаются закономерности мутагенного действия УФ-света, обусловленного возникновением двунитевых разрывов (ДНР) ДНК. Следствием репарации ДНР являются делеции и перестройки молекулы ДНК. Полученные данные свидетельствуют об эффективной индукции делеций и перестроек в ДНК под воздействием УФ-света. Анализ эффективности различных типов репарации ДНР ДНК показал, что в растущей культуре гаплоидных штаммов гомологичная рекомбинация между повторами происходит более эффективно, чем негомологичное воссоединение разорванных концов.

Работа выполнена в Лаборатории радиационной биологии ОИЯИ.

Сообщение Объединенного института ядерных исследований. Дубна, 2008

Stepanova A. N., Koltovaya N. A.

P19-2008-97

Induction of DNA Deletions after UV-Light Irradiation
in Yeast *Saccharomyces cerevisiae*

We study mutagenic action of such a damaging agent as UV light, which can lead to DNA double-strand breaks (DSB). DNA deletions and gross rearrangements occur in process of DSB repair. We show that UV light induces deletion and rearrangement very efficiently. Analysis of efficacy of different types of repair shows that cell tries to repair DSBs with a combination of both homologous recombination (HR) and nonhomologous end joining (NHEJ) if available and that DSB repair by HR is more effective than by NHEJ in growing culture of haploid yeast.

The investigation has been performed at the Laboratory of Radiation Biology, JINR.

Communication of the Joint Institute for Nuclear Research. Dubna, 2008

В последнее время активно изучается действие УФ-света на живые организмы. Наиболее эффективно УФ-свет индуцирует димеры тимина, возникающие в результате связывания двух соседних оснований одной полинуклеотидной цепи ДНК [1]. УФ-свет также индуцирует, хотя и менее эффективно, разрывы нитей ДНК и сшивки ДНК–белок [2]. Наиболее тяжелые последствия имеют ДНР ДНК [3], репарация которых осуществляется несколькими механизмами, в частности путем гомологичной рекомбинации (*homologous recombination* — HR) и путем воссоединения негомологичных концов (*non-homologous end joining* — NHEJ). Последний процесс может сопровождаться утратой фрагментов ДНК [4]. Регуляция выбора механизма репарации слабо изучена.

В данной работе изучаются количественные закономерности возникновения ДНР ДНК под действием УФ-света и эффективность их репарации путем HR и NHEJ. Для этого использовали специальные генетические системы, позволяющие тестировать делеции, возникающие в результате различных механизмов репарации ДНР ДНК. Хромосомная генетическая система, имеющая протяженные участки гомологии, позволяет тестировать события репарации путем HR [5]. Она основана на инвертированных повторах, локализованных на II хромосоме, способных индуцировать делеции и рекомбинацию. Для характеристики NHEJ использовали плазмидную систему, позволяющую тестировать события репарации ДНР, сопровождающиеся возникновением делеций [6]. Плазида представляет собой искусственно сконструированную, автономно поддерживающуюся структуру ДНК, в состав которой входят несколько генов. Структура плазмиды позволяет осуществлять селекцию делеций в плазмидной ДНК и анализ размера утраченного фрагмента в контролируемом участке плазмидной ДНК.

Плазмидная система позволяет осуществлять прямую селекцию делеционных мутантов. Центромеросодержащая плазида YCpL2 [ARS1 CEN3 URA3 TRP1 LEU2 CAN1 CYH2] длиной 13,8 тпн была любезно предоставлена нам проф. Х. Икедой (Токийский университет, Япония). Нарработку плазмидной ДНК осуществляли в бактериальном штамме *E. coli* TG1 [7]. В исследовании использовали штаммы дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* R1-1, R1-2 и R2-1 (*MAT α ade 2-1 ura 3-1 trp1-1 his 3-11,15 leu2-3,112 can 1-100 cyh 2*). Селекцию делеций в плазмидной ДНК проводили согласно методике [6].

В гаплоидные штаммы, несущие мутации устойчивости к антибиотикам, ввели плазмиду с нормальными аллелями этих генов, придающую трансформированным штаммам чувствительность к антибиотикам. Клетки реципиентных штаммов дрожжей трансформировали плазмидой YCrL2 с помощью «литиевой» методики [8] и отбирали трансформанты как Ura^+ -колонии на селективной среде $MM_{300-ura}$ [9]. Трансформанты при высеве клеток на селективную среду с добавлением двух антибиотиков канаванина и циклогексимида $MM_{300} + can + suh$ не образуют колонии. В случае возникновения на плазмиде делеции, перекрывающей участок генов устойчивости к антибиотикам *CAN1* и *CYH2*, клетки становятся резистентными к обоим антибиотикам. Поэтому селекцию делеций осуществляли путем посева трансформантов на селективную среду с добавлением антибиотиков.

Исследована индукция делеций в плазмидной ДНК под действием УФ-света на клетки дрожжей. Для этого ночную культуру, выращенную в 5 мл стандартной среды YPD [9] в условиях интенсивной аэрации при 30 °С, после соответствующего разведения в воде рассеивали на чашки Петри с полной питательной средой БС [9] для определения выживаемости (из расчета 100 выживших клеток на чашку), а также на селективную среду $MM_{300} + can + suh$ для селекции делеционных мутантов (не более $5 \cdot 10^7$ клеток на чашку для образования монослоя на поверхности агаризованной среды). Открытые чашки Петри облучали УФ-светом (лампа ДБ-30, 0,28 Дж/м²·с). Во избежание фотореактивации облучение проводили в темноте. Затем чашки помещали в металлический пенал и инкубировали в течение 4–5 дней при 30 °С.

На рис. 1, а приведена усредненная кривая выживаемости для трех трансформантов (R1-1, R1-2 и R2-1) после УФ-облучения и средние квадратичные ошибки. Кривые выживания имеют сигмоидную форму, характерную для гаплоидных штаммов после облучения УФ-светом. При максимальном флюэнсе

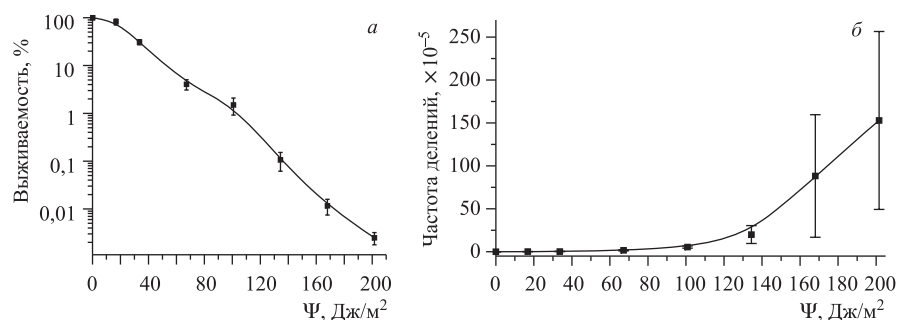


Рис. 1. Кривые выживаемости (а) и частота делеционных мутантов (б) после УФ-облучения гаплоидных штаммов R1-1, R1-2 и R2-1

энергии 201,6 Дж/м² выживаемость снижалась до 0,001 %. Темп возникновения спонтанных делеционных мутаций составлял $(5,8 \pm 1,1) \cdot 10^{-8}$, что хорошо согласуется с данными литературы [6]. Частота спонтанных мутантов в популяции облучаемых нами культур составляла $(1,2 \pm 0,2) \cdot 10^{-6}$. При относительно малых Ψ (до 100 Дж/м²) и выживаемости вплоть до 1 % делеционные мутанты индуцировались УФ-светом с низкой частотой (рис. 1, б). С последующим увеличением дозы частота делеционных мутантов быстро возрастала и при флюенсе энергии 201,6 Дж/м² и выживаемости 0,002 % она увеличивалась до $(2,5 \pm 0,6) \cdot 10^{-3}$. Таким образом, УФ-свет эффективно индуцировал делеции в ДНК, и наблюдалась степенная зависимость индукции делеций от дозы воздействия. Как было показано в работе Х. Икеды [6], такие делеции образуются в процессе репарации ДНР ДНК путем NHEJ.

Для изучения внутрихромосомной гомологичной рекомбинации использовали гаплоидные штаммы дрожжей ALE1000 и ALE1001, содержащие два повтора последовательности *lys2* во II хромосоме [5]. Штаммы ALE1000 и ALE1001 (*MAT α ade5-1 his2-3,112 trp1-289 ura3-52 lys2- Δ 5' lys2::HS-D*) любезно предоставлены нам д-ром Д. А. Гордениным (National Institute of Environmental Health Sciences, NC). Последовательность *lys2::HS-D* содержит в *BamHI* сайте гена *LYS2* клонированную в плазмиде pPD39 вставку прямого повтора двух консенсусных последовательностей *Ale* длиной 658 пн. Усеченный по 5'-концу ген *lys2- Δ 5'* и ген *LEU2* интегрированы во II хромосому как прямой повтор с аллелью *lys2::HS-D*. Интеграция плазмиды в локус *LYS2* на II хромосоме создает внутрихромосомные повторы *lys2*, разделенные геном *LEU2*. Рекомбинация между повторами *lys2* происходит в результате конверсии, которая может сопровождаться кроссинговером. В противном случае образуется делеция, которую идентифицируют по утрате локуса *LEU2*.

На рис. 2 приведены усредненные данные для двух штаммов ALE1000 и ALE1001 (по три повторности для каждого) и средние квадратичные ошибки. Кривые выживания имели характерную сигмоидную форму (рис. 2, а) и совпадали с выживаемостью ранее упомянутых штаммов. Частоту возникновения внутрихромосомной рекомбинации в облученной культуре определяли, рассеивая культуры клеток на селективную среду MM₃₀₀-*lys* и инкубируя при температуре 30 °С в течение 5 суток. По данным литературы, частота спонтанной внутрихромосомной рекомбинации составляла $1,4 \cdot 10^{-5}$ [5].

УФ-свет эффективно индуцировал гомологичную рекомбинацию: при $\Psi = 100$ Дж/м² частота рекомбинантов достигала $5 \cdot 10^{-2}$, а частота делеционных мутантов — $4 \cdot 10^{-2}$ (рис. 2, б). Для негомологичной рекомбинации при таком же значении флюенса энергии УФ-излучения частота делеционных мутантов находилась на уровне $5,5 \cdot 10^{-5}$. Можно предполагать, что эти типы репарации конкурируют за мишень, в данном случае за ДНР ДНК.

Из полученных результатов видно, что в культурах гаплоидных штаммов дрожжей в экспоненциальной фазе роста гомологичная рекомбинация между

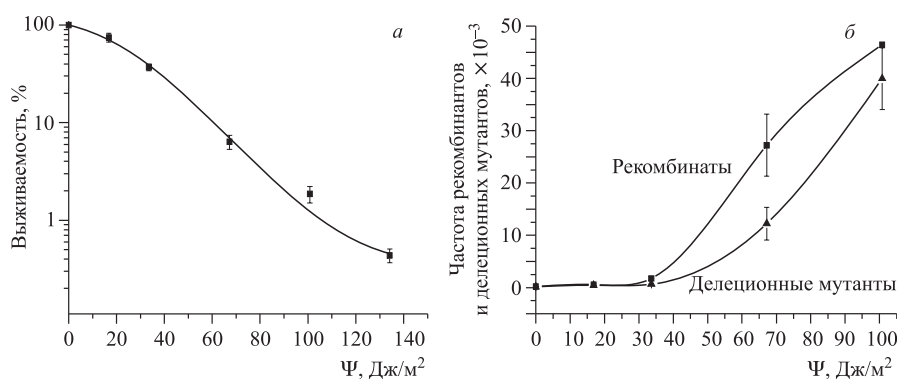


Рис. 2. Кривые выживаемости (а) и частота рекомбинантов и делеционных мутантов (б) после УФ-облучения гаплоидных штаммов ALE1000 и ALE1001

повторами идет с большей эффективностью, чем негомологичное воссоединение концов. Используемая в наших экспериментах культура представляет собой смешанную популяцию клеток в различных фазах клеточного цикла. Известно, что эффективность разных путей репарации в них различается [10]. В связи с этим несомненный интерес представляет в дальнейшем изучение эффективности индукции делеций и функционирования различных путей репарации в культурах клеток дрожжей, синхронизированных в различных стадиях клеточного цикла. Эти вопросы явятся предметом наших дальнейших исследований.

ЛИТЕРАТУРА

1. Friedberg E. C., Walker G. C., Siede W. DNA repair and mutagenesis. Washington. DC:ASM Press. 2nd edition. 1995.
2. Rosenstein B. S., Ducore J. M. Induction of DNA strand breaks in normal human fibroblasts exposed to monochromic ultraviolet and visible wavelengths in the 240–546 nm range // Photochem. Photobiol. 1983. V. 38. P. 51–55.
3. Газиев А. И. Повреждения ДНК в клетках под действием ионизирующей радиации // Радиационная биология. Радиоэкология. 1999. Т. 39, № 6. С. 630–638.
4. Глазер В. М., Глазунов А. В. Молекулярно-генетический анализ репарации двуни-тевых разрывов ДНК у дрожжей-сахаромицетов // Генетика. 1999. Т. 35, № 11. С. 1449–1469.

5. Jin Y. H., Obert R., Burgers P. M., Kunkel T. A., Resnick M. A., Gordenin D. A. The 3'–5' exonuclease of DNA polymerase δ can substitute for the 5' flap endonuclease Rad 27/Fen1 in processing Okazaki fragments and preventing genome instability // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2001. V. 98, No. 9. P. 5122–5127.
6. Tsukamoto Y., Kato J., Ikeda H. Effects of mutation of *RAD50*, *RAD51*, *RAD52*, and related genes on illegitimate recombination in *Saccharomyces cerevisiae* // Genetics. 1996. V. 142. P. 383–391.
7. Maniatis T., Fritsch E. F., Sambrook J. Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory. New York. 1982. 545 p.
8. Ito H., Fukuda Y., Murata K., Kimura A. Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations // J. Bacteriol. 1983. V. 153. P. 2570–2580.
9. Devin A. B., Prosvirova T. Yu., Peshekhonov V. T. et al. The start gene *CDC28* and the genetic stability of yeast // Yeast. 1990. V. 6, No. 3. P. 231–243.
10. Королев В. Г. Молекулярные механизмы репарации двунитевых разрывов ДНК у эукариот // Радиационная биология. Радиоэкология. 2007. Т. 47, № 4. С. 389–401.

Получено 2 июля 2008 г.

Редактор *М. И. Зарубина*

Подписано в печать 17.09.2008.

Формат 60 × 90/16. Бумага офсетная. Печать офсетная.

Усл. печ. л. 0,5. Уч.-изд. л. 0,59. Тираж 220 экз. Заказ № 56309.

Издательский отдел Объединенного института ядерных исследований
141980, г. Дубна, Московская обл., ул. Жолио-Кюри, 6.

E-mail: publish@jinr.ru

www.jinr.ru/publish/