

© А. М. Смирнов,
Е. В. Самбук

Санкт-Петербургский государственный университет, кафедра генетики и селекции, Санкт-Петербург

✿ Дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* являются удобным модельным объектом для изучения частоты возникновения спонтанных мутаций под воздействием различных факторов окружающей среды, а также в результате нарушения метаболизма. Одним из необходимых компонентов культуральной среды является неорганический фосфат. Его недостаток влияет на экспрессию многих генов. Система регуляции экспрессии генов фосфатом изучена подробно. В настоящей работе продемонстрирована зависимость стабильности генетического материала клетки от ее метаболического состояния, вызванного мутациями в генах, кодирующих регуляторные белки обмена фосфора.

✿ **Ключевые слова:** *Saccharomyces cerevisiae*; Pho85p; мутабельность; чувствительность к мутагенам

ВЛИЯНИЕ МУТАЦИЙ В РЕГУЛЯТОРНЫХ ГЕНАХ *PHO* НА СТАБИЛЬНОСТЬ ГЕНЕТИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

ВВЕДЕНИЕ

Экспрессия генов, кодирующих ферменты репликации и репарации ДНК, как и любых других генов, зависит от факторов внешней среды и физиологического состояния организма. Анализ данных протеома и транскриптома дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* является подтверждением этого положения (Gasch et al., 2000).

На сегодняшний день геномы живых организмов представляются пластичными структурами, способными отвечать на изменения окружающей среды. Еще в 1990 году было показано, что мутабельность дрожжей зависит не только от генетического фона, но и от фазы роста культуры (стационарная или активно растущая) (Siede a. Friedberg, 1990). Внешние изменения зачастую являются стрессорными для клеток, и все больше данных свидетельствует, что клеточный ответ на стрессорные воздействия, помимо изменений в метаболизме, включает в себя генетические изменения, а именно повышение частоты возникновения мутаций, что потенциально может способствовать эволюционному процессу. Дестабилизация генома, вызванная стрессом, показана для некоторых видов бактерий, дрожжей и раковых клеток человека. Механизм этого процесса не вполне изучен (Galhardo et al., 2007).

В ряде работ продемонстрирована повышенная частота мутаций в генах определенных метаболических путей в ответ на длительное культивирование в условиях низкой концентрации веществ, вовлеченных в эти пути (Hall, 1992, 1998). На среде с низкой концентрацией аденина возрастает частота реверсий Ade⁺ на фоне мутаций *ade2* (Плына et al., 1986). В селективных условиях наблюдаются не только генные мутации, но и хромосомные перестройки. При длительном культивировании в среде с субоптимальной концентрацией глюкозы появляются штаммы с дублированными генами *HXT*, кодирующими транспортеры глюкозы (Brown et al., 1998), на среде без фосфата отобраны дубликации генов *PHO3* и *PHO5*, локализованные в различных хромосомах дрожжей (Hansche, 1975).

Хотя связь физиологического состояния организма и стабильности генома сейчас и является очевидной, регуляторные механизмы этих процессов пока изучены недостаточно.

Дрожжи *S. cerevisiae* — наиболее удобный эукариотический организм, использование которого позволяет продемонстрировать эту связь. Состав питательной среды регулирует рост и размножение микроорганизмов, и голодание по какому-либо из элементов питания является важным селективным фактором, а также стимулирует накопление мутаций.

В настоящей работе был предпринят поиск генетических механизмов, связывающих ответ клетки дрожжей на лимитирующий фактор (в данном случае — фосфор) и стабильность генетического материала. Исследованию этой проблемы способствует хорошая изученность системы регуляции синтеза кислых фосфатаз (КФ) дрожжей (Oshima, 1997).

Фосфор является одним из основных биогенных элементов клетки. В живых организмах фосфор находится в основном в виде ортофосфата (P_i). В метаболизме P_i у дрожжей принимает участие множество ферментов, синтез которых активируется при недостатке фосфата в среде (Ogawa et al., 2000).

Поступила в редакцию 23.09.2008
Принята к публикации 03.10.2008

Таблица 1

Генотипы штаммов, использованных в работе

Штамм	Генотип
1-GRF18	<i>MATa his3-11, 15 leu2-3, 112 pho3</i>
c10-1-GRF18	<i>MATa his3-11, 15 leu2-3, 112 pho3 pho80-10</i>
c3-1-GRF18	<i>MATa his3-11, 15 leu2-3, 112 pho3 pho85-3</i>
c21-1-GRF18	<i>MATa his3-11, 15 leu2-3, 112 pho3 pho85-21</i>
c30-1-GRF18	<i>MATa his3-11, 15 leu2-3, 112 pho3 pho85::LEU2</i>
P4-c21-1-GRF18	<i>MATa his3-11, 15 leu2-3, 112 pho3 pho85-21 pho4-2</i>
RCY-308-2d	<i>MATa hom3-10 leu2-3, 112 his3-11 trp1-1 ura3-1 ade2-1 can1-100</i>
PSY142	<i>MATa lys2-801 leu2-3, 112 ura3</i>
8C-YUNI101	<i>MATa his7-2 leu2-3, 112 ura3Δ bik1::ura3-29RL trp1-1_{UAG} ade2-1_{UAA}</i>
c1-8C-YUNI101	<i>MATa his7-2 leu2-3, 112 ura3Δ bik1::ura3-29RL trp1-1_{UAG} ade2-1_{UAA} pho85::LEU2</i>

Репрессибельная КФ Pho5p синтезируется только при недостатке Φ_{ii} . Согласно современной модели, при недостатке Φ_{ii} в среде начинается синтез репрессибельных КФ и пермеаз с высоким сродством к фосфату. В этих условиях белок Pho4 транспортируется в ядро при помощи кариоферина Pse1p (Kaffman et al., 1998). В ядре димер Pho4p взаимодействует с фосфорилированным Pho2p, который способствует связыванию Pho4p с последовательностями UAS в промоторе гена *PHO5* и активации транскрипции (Barbaric et al., 1998). Следует отметить, что фосфорилирование Pho2p на среде без фосфата осуществляет Cdc28p (Liu et al., 2000). Активность циклин-киназного комплекса Pho80p-Pho85p в этих условиях ингибирована.

При высоких концентрациях Φ_{ii} в среде комплекс Pho80p-Pho85p фосфорилирует Pho4p. Фосфорилированный Pho4p не способен взаимодействовать с белком Pho2p, но взаимодействует с белками Msn5 и RanGTP, которые транспортируют его в цитоплазму. В цитоплазме Pho80p-Pho85p дополнительно фосфорилирует Pho4p и, тем самым, блокирует его проникновение в ядро, вследствие чего не происходит активации транскрипции гена *PHO5*. Таким образом, циклин-киназный комплекс Pho80p-Pho85p является основным посттрансляционным регулятором активатора Pho4p, а следовательно, и экспрессии генов репрессибельных КФ (Schneider, 1994).

Ранее было показано, что мутации в гене *PHO85* приводят к накоплению *ts*, [*rho*⁻] мутаций, а также мутаций в гене *PHO4*. В настоящей работе мы оценивали роль регуляторных генов *PHO80* и *PHO85* в поддержании стабильности генома.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Штаммы

В работе были использованы штаммы дрожжей *S. cerevisiae* лаборатории биохимической генетики

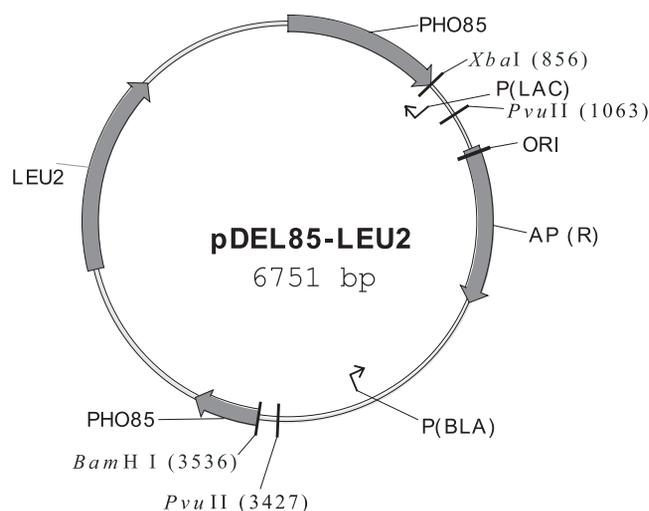


Рис. 1. Схема плазмиды pDEL85-LEU2

БиНИИ СПбГУ, созданные на основе штамма GRF18, любезно предоставленного д-ром А. Хинненом, штаммы Петергофской генетической коллекции, любезно предоставленные д-ром Л. Н. Мироновой, а также штамм 8C-YUNI101, любезно предоставленный д-ром Ю. И. Павловым. Генотипы штаммов представлены в таблице 1.

Обозначения

Обозначения фенотипов: [*rho*⁻] — дыхательная некомпетентность, вызванная нарушениями в митохондриальном геноме; *ts* — отсутствие роста при 37° С; Pho⁺ — наличие активности КФ; Pho⁻ — отсутствие активности КФ; Leu⁺ — способность расти на среде, не содержащей лейцин; Can^R — способность расти на среде с канаванином.

Таблица 2

Последовательности праймеров, использованных в работе

<i>GLN3</i>	прямой	5'-ACGCGTCGACAGTGCACACCAGTGATTGTA-3'
	обратный	5'-CGGGATCCTCATATACCAAATTTAAACCAA-3'
<i>CAN1</i>	прямой	5'-ATGACAAATTCAAAAGAAGACGCC-3'
	обратный	5'-CTATGCTACAACATTCCTCAAATTT-3'

Плазмида

В данной работе использовали плазмиду pDEL85-*LEU2* (схема представлена на рисунке 1), полученную ранее (Попова, 2002). Плазмида содержит ген *PHO85* с интегрированным в него геном *LEU2*. Ген *PHO85* фланкирован сайтами рестрикции для эндонуклеазы PvuII.

Методы

Для получения штамма с дизрупцией гена *PHO85* плазмиду pDEL85-*LEU2* обрабатывали эндонуклеазой PvuII и трансформировали рестрикционной смесью штамм 8С-YUNI101. Отбирали возникшие клоны Leu⁺ Pho⁺.

Для качественной оценки чувствительности штаммов к ультрафиолету (УФ) и метил метан сульфонату (ММС) (Aldrich Chem) суспензии клеток (концентрация приблизительно 10⁷ кл/мл) облучали УФ в течение 1 минуты (35 мВт/м²) или обрабатывали ММС (в концентрации 0,3 %) в течение 20, 40 и 60 минут, а затем переносили при помощи репликатора на полную среду (Hugciw et al., 2002).

Для количественной оценки чувствительности штаммов к ММС к суспензии клеток (концентрация приблизительно 2×10⁶) добавляли ММС в концентрации 0,3 % и высевали на полную среду по 100 мкл 100 и 1000-кратного разведения через 30 минут. Подсчет выживаемости вели относительно контроля, в который не добавляли ММС.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

ПЦР проводили по матрице хромосомной ДНК исследуемых штаммов с использованием праймеров к генам *GLN3* и *CAN1*. Последовательности праймеров представлены в таблице 2. Реакционную смесь для ПЦР объемом 50 мкл готовили в пробирке в ледяной бане. В состав смеси входили: 0,1–1 мкг ДНК-матрицы, 10× буфер для ПЦР, 10×2 мМ раствор дезоксинуклеозидтрифосфатов (концентрация каждого из dNTP в реакционной смеси 0,2 мМ), 10 пмоль праймера I и II, полимеразы Taq (5 ед/мкл) в количестве 1–1,5 единиц, вода. Буфер для ПЦР содержит ионы Mg²⁺ (1–4 мМ MgCl₂) и бычий сывороточный альбумин (BSA, 0,1 мг/мл).

Для проведения ПЦР использовали следующую программу:

1. Предварительный нагрев смеси (начальная денатурация матрицы) — 5 минут при 95° С.
2. 30 циклов по три этапа: денатурация, отжиг праймеров, элонгация.

Этапы цикла для ПЦР с праймерами к гену *GLN3*: денатурация матрицы — 1 минута при 95° С; отжиг праймеров — 1 минута при 43° С; элонгация — 2 минуты при 72° С.

Этапы цикла для ПЦР с праймерами к гену *CAN1*: денатурация матрицы — 1 минута при 95° С; отжиг праймеров — 1 минута при 32° С; элонгация — 1 минута при 72° С.

3. Конечная элонгация — 7 минут при 72° С.

4. Охлаждение до 4° С.

После окончания ПЦР аликвоту смеси с амплифицированной ДНК наносили на электрофорез и оценивали продукт ПЦР по размеру.

Количественная оценка частоты спонтанных мутаций

Для количественной оценки частоты возникновения мутаций устойчивости к канаванину использовали флукуационный тест. Суспензии клеток исследуемых штаммов высевали на полную среду и культивировали в течение 3 дней. Затем 20 одиночных колоний каждого штамма суспендировали в воде (концентрация клеток в суспензии составляла приблизительно (1–3)×10⁷ кл/мл) и высевали на селективную среду с канаванином. Для точной оценки количества клеток в исходной суспензии высевали соответствующее разведение на полную среду. Количество Can^R мутантов учитывали на третий день инкубирования.

Обработку данных флукуационного теста проводили с помощью метода максимального правдоподобия Ма-Сандри-Саркар (MSS maximum likelihood method). Для вычисления доверительного интервала полученных значений *m* использовали модификацию метода Стьюарта (Rocche a. Foster, 2000).

РЕЗУЛЬТАТЫ**Влияние мутаций в гене *PHO85* на уровень спонтанного мутагенеза**

Для оценки частоты спонтанных мутаций в настоящее время широко используется система гена *CAN1*. Прямые мутации в этом гене, приводящие к устойчивости к канаванину, могут возникать за счет различных замен нуклеотидов, сдвигов рамки считывания и более сложных мутаций (Chen et al., 1998).

Для оценки влияния мутаций в гене *PHO85* на уровень спонтанной мутабельности клетки был использо-

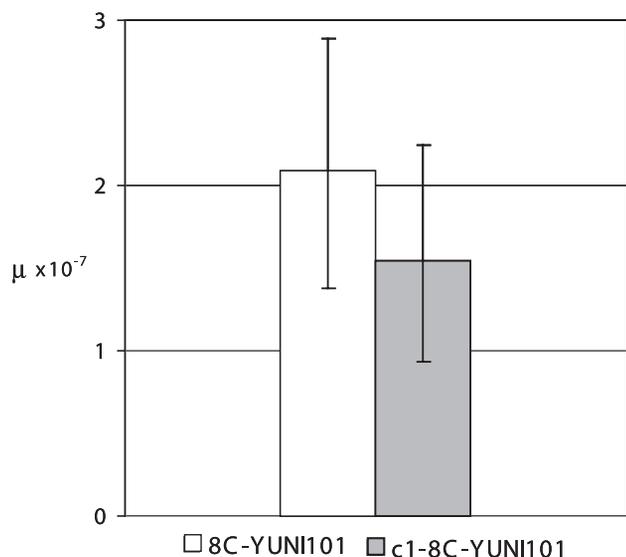


Рис. 2. Частота возникновения мутаций в гене *CAN1* на клетку на поколение (μ) штаммов 8C-YUNI101 и c1-8C-YUNI101

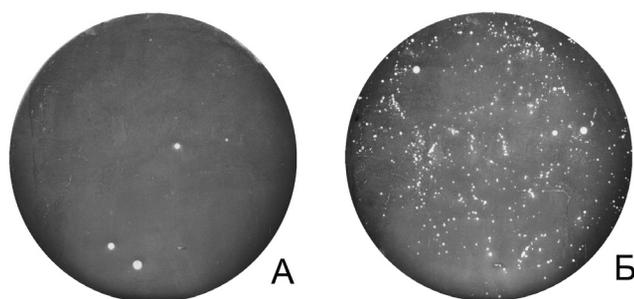


Рис. 3. *Can^R* мутанты, возникшие на 14 день инкубирования на фоне штаммов:

А — 8C-YUNI101;
Б — c1-8C-YUNI101

Суспензии клеток исследуемых штаммов (в концентрации 10^7 клеток на чашку) высевали на соответствующую селективную среду, содержащую канавафин (Sigma) в концентрации 60 мг/л и необходимые аминокислоты. Концентрацию клеток в суспензии подсчитывали в камере Горяева

ван штамм с дизрупцией гена *PHO85* c1-8C-YUNI101 (*PHO85::LEU2*), созданный на основе штамма 8C-YUNI101.

Для количественной оценки частоты возникновения мутаций в гене *CAN1* у штаммов 8C-YUNI101 и c1-8C-YUNI101 был использован флукуационный тест. Результаты представлены на рисунке 2.

Как видно, дизрупция гена *PHO85* не приводит к повышению мутабельности в быстрорастущей культуре. Однако при культивировании на селективной среде штамма c1-8C-YUNI101 в течение 14 дней наблюдали появление большого числа колоний, устойчивых к канавафину (рис. 3).

ПЦР анализ клонов *Can^R*

Таблица 3

DNA ladder high range (Fermentas)	c1-8C-YUNI101				8C-YUNI101		
	<i>CAN1</i>			<i>GLN3</i>	<i>CAN1</i>		<i>GLN3</i>
	№ 3, 4, 7, 8	№ 2	№ 1, 5, 6		№ 1-12, 14	№ 13	
10000 8000 6000 5000 4000 3000 2500 2000 1500							

Для теста на аллелизм было отобрано 150 мутантов *Can^R* штамма c1-8C-YUNI101 и 20 мутантов *Can^R* штамма 8C-YUNI101, с которыми был проведен тест на аллелизм гену *CAN1*. В качестве тестера использовали штаммы RCY-308-2d и PSY142. По результатам теста оказалось, что все они несли рецессивные мутации в гене *CAN1*.

Характеристика мутаций, возникающих в гене *CAN1*

Для того чтобы охарактеризовать типы мутаций *Can^R*, возникших у исследуемых штаммов, проводили анализ продуктов ПЦР.

На фоне штамма c1-8C-YUNI101 было отобрано 23 независимых клонa *Can^R*. Хромосомную ДНК этих клонов использовали в качестве матрицы для ПЦР с праймерами к гену *CAN1*. У 15 мутантов (№№ 3, 4, 7–15, 17, 18, 20, 23) продукт ПЦР соответствовал длине гена *CAN1*, фланкированного использованными праймерами (1,8 т. п. н.), мутации *Can^R* возникли, по-видимому, за счет точковых мутаций или микроделеций. У клонa № 2 продукт ПЦР был несколько меньшего размера (что свидетельствует о делеции внутри гена), а у 7 клонов (№№ 1, 5, 6, 16, 19, 21, 22) продукт ПЦР отсутствовал. Также было проанализировано 20 *Can^R* мутантов, возникших на фоне штамма 8C-YUNI101. Лишь в одном случае (№ 18) отсутствовал продукт ПЦР. В качестве контроля с пробами ДНК проводили ПЦР с праймерами к гену *GLN3* (размер продукта ПЦР составляет 2,7 т. п. н.). Во всех случаях продукт ПЦР был обнаружен. Результаты представлены в таблице 3.

Как видно, на фоне мутации *rho85* у некоторых мутантов *Can^R* фенотип обусловлен потерей гена *CAN1* или его участка, что может свидетельствовать о нестабильности плеча хромосомы V у штаммов с дизрупцией гена *PHO85*. Ген *CAN1* находится в прителомерной области левого плеча хромосомы V дрожжей и может использоваться в качестве маркера хромосомных перестроек,

Таблица 4

Чувствительность различных мутантов *pho* к УФ и ММС

Название штамма	Мутации	Облучение УФ	Рост штаммов, обработанных ММС (0,3 %) в течение следующего времени (мин)		
			20	40	60
1-GRF18	<i>pho3</i>	+	+	+	+/-
c3-1-GRF18	<i>pho3 pho85-3</i>	-	+	+/-	-
c21-1-GRF18	<i>pho3 pho85-21</i>	-	+	+/-	-
c30-1-GRF18	<i>pho3 pho85::LEU2</i>	-	+	+/-	-
c10-1-GRF18	<i>pho3 pho80</i>	-	-	-	-
P4-c21-1-GRF18	<i>pho3 pho85-21 pho4</i>	-	+	+	+/-

Примечание: «+» — есть рост, «+/-» — рост ослаблен; «-» — рост отсутствует

в частности потери участка левого плеча хромосомы V (Hackett et al., 2001; Putnam et al., 2005).

Полученные данные свидетельствуют о различной генетической природе мутаций в гене *CAN1*, возникающих на фоне дизрупции гена *PHO85*.

Определение чувствительности мутантов по генам *PHO* к УФ и ММС

Повышенную мутабельность зачастую связывают с нарушениями в системе репарации ДНК. Мутации в генах, кодирующих ферменты репарации, обычно чувствительны к действию УФ и химических мутагенов.

Для качественного определения чувствительности штаммов 1-GRF18 (*pho3*), c3-1-GRF18 (*pho3 pho85-3*), c21-1-GRF18 (*pho3 pho85-21*), c30-1-GRF18 (*pho3 pho85::LEU2*), c10-1-GRF18 (*pho3 pho80*) и P4-c21-1-GRF18 (*pho3 pho85-21 pho4*) к мутагенам использовали ММС и УФ. Результаты приведены в таблице 4.

Как видно, в отличие от штамма 1-GRF18 все мутанты *pho85*, *pho80* и *pho85pho4* чувствительны к УФ. В то же время чувствительность этих мутантов к ММС отличается у разных штаммов. Штамм c10-1-GRF18 (*pho80*) имеет повышенную чувствительность к ММС. Штаммы c3-, c21, c30-1-GRF18 (*pho85*) также более чувствительны к ММС, по сравнению с 1-GRF18. Интересно, что штамм P4-c21-1-GRF18, несущий мутацию *pho4* в дополнение к *pho85*, менее чувствителен к ММС, чем c21-1-GRF18 и практически не отличается по выживаемости от штамма 1-GRF18.

Для подтверждения полученных результатов проводили количественный тест на чувствительность к ММС штаммов 1-GRF18, c10-1-GRF18. Результаты представлены на рисунке 4. Видно, что мутация в гене *PHO80* приводит к повышенной чувствительности к ММС.

ОБСУЖДЕНИЕ

Жизнь всех живых организмов в той или иной степени зависит от химического состава окружающей среды.

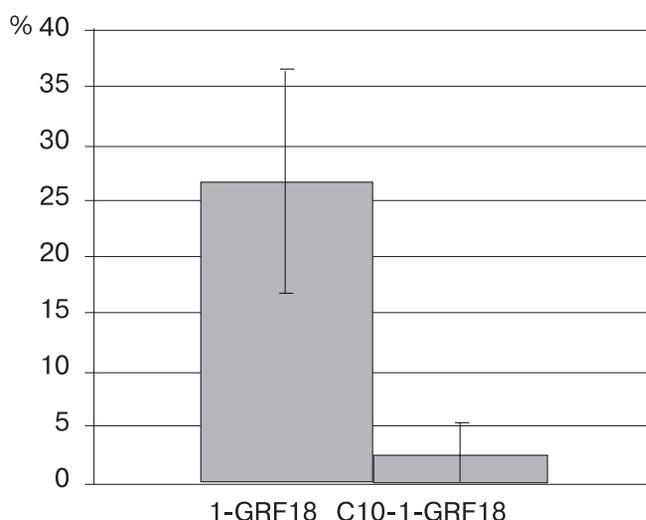


Рис. 4. Чувствительность штаммов 1-GRF18, C10-1-GRF18 к ММС (0,3 %) при 30 минутах воздействия (в процентах выживаемости). Опыт был проведен в трёх повторностях

Особенно это справедливо в отношении бактерий, грибов и растений. В каждый конкретный момент эти организмы испытывают нехватку тех или иных химических соединений, которые в этот момент являются факторами, лимитирующими рост.

Сохранение и поддержание генетического материала в ответ на действие факторов окружающей среды является основой успешности вида. Поддержание стабильности генома определяется активностью специальных систем репарации. Голодание является одним из наиболее часто встречающихся стрессорных факторов, вызывающих такие изменения метаболизма, которые могут приводить к нарушению функционирования репарационных систем.

В настоящее время влияние метаболического состояния клетки на стабильность ядерного генома изучено недостаточно, хотя еще в 1990 году было показано, что

мутабельность дрожжей зависит не только от генетического фона, но и от фазы роста культуры (стационарная или активно растущая) (Siede a. Friedberg, 1990). Все больше данных свидетельствует, что клеточный ответ на стрессорные воздействия, помимо изменений в метаболизме, включает в себя генетические изменения, а именно повышение частоты возникновения мутаций, что потенциально может способствовать эволюционному процессу. Известно, что голодание по гистидину (Vabudri et al., 2001) и аденину (Achilli et al., 2004) приводит к повышению мутабельности. В клетках, испытывающих аминокислотное голодание, также можно наблюдать повышение концентрации внутриклеточных форм активного кислорода, что влечет за собой повышение уровня мутабельности (Eisler et al., 2004).

Таким образом, в клетках дрожжей при стрессе наблюдается комплексный ответ, затрагивающий разные аспекты их жизнедеятельности, в том числе и мутационный процесс. Дестабилизация генома, вызванная стрессом, показана для некоторых видов бактерий, дрожжей и раковых клеток человека. Тем не менее, не существует (или пока не обнаружено) единого универсального молекулярного механизма этого процесса (Galhardo et al., 2007).

Поиск генов и сигнальных путей, вовлеченных как в поддержание стабильности генома дрожжей, так и в регуляцию метаболизма имеет большое значение. Циклин-зависимые киназы представляют в этом отношении огромный интерес. Эти белки являются консервативными и контролируют основные клеточные функции: клеточный цикл, метаболизм, дифференцировку (Hunter a. Plozman, 1997).

У дрожжей *S. cerevisiae* известно шесть циклин-зависимых фосфопроteinкиназ (Cdk): Cdc28p, Srb10p/Cdk8p, Kin28p, Ctk1p, Sgv1/Bur1 и Pho85p (Liu a. Kirgeos, 2000). Для активации Cdk необходимо связывание с белком циклином и фосфорилирование. Циклин-киназные комплексы фосфорилируют ряд специфических субстратов и, таким образом, влияют на их активность (Measday et al., 1997). Киназы Srb10p/Cdk8p, Kin28p, Ctk1p и Sgv1/Bur1 имеют по одному циклиновому партнеру. В то же время, Cdc28p взаимодействует с 9 циклинами, а Pho85p — с 10 (Toh-e a. Nishizawa, 2001). Киназа Cdc28p играет главную роль в регуляции клеточного цикла у дрожжей. Последовательно связываясь с рядом циклинов, Cdc28p контролирует прохождение клеткой всех этапов клеточного цикла (Nurse, 2002). Известно, что Cdc28p фосфорилирует одну из субъединиц ДНК-полимеразы ϵ — Dpb2p. Возможно, существует связь между Cdc28p и ошибками репликативных полимераз (Kesti, 2004).

Киназа Pho85p является гомологом Cdc28p (Toh-e et al., 1988), однако роль Pho85p в регуляции клеточного цикла вторична. Эта киназа играет важную роль в регуляции метаболических процессов, ответе клетки на

стресс, фосфорилировании белков цитоскелета (Huang et al., 1996; Oshima, 1997; Timblin a. Bergman, 1997). Фосфопроteinкиназа Pho85p является функциональным гомологом циклин-зависимой киназы Cdk5 млекопитающих (Huang et al., 1999).

Полученные в нашей работе данные свидетельствуют о том, что отсутствие киназы Pho85p не влияет на частоту спонтанных мутаций в гене *CAN1* в быстрорастущей культуре. Однако при длительном культивировании на среде с канаванином частота мутаций в гене *CAN1* у штамма с дизрупцией гена *PHO85* резко возрастает.

Помимо дестабилизации генетического материала на фоне дизрупции *pho85::LEU2*, мы наблюдали повышенную чувствительность к мутагенным воздействиям штаммов с мутациями в генах *PHO80* и *PHO85*. Это может свидетельствовать о нарушении работы систем репарации поврежденной ДНК у этих штаммов. Известно, что мутации в гене *RAD27*, продукт которого участвует в эксцизионной репарации оснований, приводят к высокой чувствительности к ММС (Wu a. Wang, 1998). Дизрупция гена *PHO85* снижает уровень экспрессии *RAD27* (Ogawa et al., 2000), что может быть одним из возможных объяснений чувствительности к ММС мутантов *pho80* и *pho85*. Наши данные согласуются с результатами, полученными при массовом скрининге коллекций дизруптантов дрожжей *S. cerevisiae* на чувствительность к факторам, повреждающим ДНК. Известно, что мутанты *pho4* особенно чувствительны к УФ (Hanway et al., 2002), а мутанты *pho80* — к ММС (Begley et al., 2002).

Так как циклин Pho80p взаимодействует с единственной киназой Pho85p, именно циклин-киназный комплекс Pho85p-Pho80p может быть вовлечен в регуляцию систем репарации ДНК клетки.

Теоретически возможно предположить несколько механизмов влияния циклин-киназного комплекса Pho85p-Pho80p на стабильность генетического материала:

1. Pho85p может быть частью сигнального пути, который отвечает на повреждения ДНК. Этот сигнал включает остановку клеточного цикла, изменения в экспрессии генов, репарацию поврежденной ДНК. Известно, что киназа Pho85p вовлечена в регуляцию клеточного цикла дрожжей *S. cerevisiae* (Measday et al., 1997), а также является гомологом основной киназы клеточного цикла — Cdc28p (Toh-e et al., 1988).
2. Циклин-киназный комплекс Pho80p-Pho85p может регулировать транскрипцию генов, контролирующих процессы репликации и репарации. По данным Огава с соавторами (Ogawa et al., 2000) у штаммов с делециями генов *PHO85* и *PHO80* снижена экспрессия генов, продукты которых контролируют процессы репликации и репарации ДНК. Более чем в два

раза репрессирован уровень мРНК гена *RAD3*, вовлеченного в эксцизионную репарацию; генов *MSH2*, *MSH6*, вовлеченных в репарацию неспаренных оснований; генов *POL2*, *DPB4*, кодирующих структуру субъединиц ДНК-полимеразы ϵ . Изменение в уровне полимераз также может повлиять на мутабельность, так, снижение уровня ДНК-полимеразы δ приводит к чувствительности к ММС и мутаторному фенотипу (Kokoska et al., 2000). Известно также, что многие гены, активируемые в отсутствие Pho85p, относятся к генам стрессового ответа (Timblin a. Bergman, 1997).

3. Циклин-киназный комплекс Pho80p-Pho85p может фосфорилировать белки, вовлеченные в репарацию и репликацию, и тем самым влиять на их активность. Так, например, Dpb2p — субъединица ДНК-полимеразы ϵ — фосфорилируется циклин-зависимой киназой Cdc28p, гомологичной Pho85p, что усиливает взаимодействие с Pol2p и повышает активность полимеразы (Kesti et al., 2004).

В настоящее время невозможно точно сказать, какой из перечисленных механизмов повышает мутабельность у штаммов с отсутствием киназы Pho85p, но эпистатическое действие мутации *pho4* на *pho85* позволяет предположить, что циклин-киназный комплекс Pho80p-Pho85p влияет на мутабельность, регулируя экспрессию определенных генов, фосфорилируя транскрипционный активатор Pho4p.

Интересно сходство фенотипов мутаций *pho85* и *hsm3*. Hsm3p — это белок с неизвестной функцией, предположительно вовлеченный в процессы репарации ДНК. В работе Федоровой с соавторами было показано, что мутация *hsm3* приводит к повышению мутабельности только в медленно растущей культуре (Fedorova et al., 2004). На основании полученных данных авторы говорят о роли гена *HSM3* в так называемом адаптивном мутагенезе, или мутагенезе стационарной фазы. Возможно, киназа Pho85p участвует в поддержании стабильности генома в условиях ограниченного роста культуры, а ее отсутствие приводит к повышению мутабельности.

Структурно-функциональный анализ мутантов *pho85*, проведенный ранее, а также в данной работе, продемонстрировал важную роль Pho85p в регуляции различных процессов в клетке, таких как формирование нормальной морфологии клетки (Самбук и др., 2005; Huang, 2007; Sambuk et al., 1995), обеспечение стабильности ядерного и митохондриального геномов (Самбук и др., 2003, 2005; данная работа).

Литература

1. Попова Ю. Г., 2002. Исследование роли протеинкиназы Pho85p в регуляции метаболизма дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* и *Pichia pastoris*: Автореф. канд. дис. СПб, 155 с.
2. Самбук Е. В., Попова Ю. Г., Физикова А. Ю. и др., 2003. Генетический анализ плейотропных эффектов мутаций *pho85* у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* // Генетика. Т. 39, № 8. С. 1039–1045.
3. Самбук Е. В., Физикова А. Ю., Захарова К. В. и др., 2005. Отсутствие циклинзависимой фосфопроteinкиназы Pho85p приводит к нарушению распределения митохондриальных нуклеотидов у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* // Цитология. Т. 47, № 10. С. 917–924.
4. Achilli A., Matmati N., Casalone E. et al., 2004. The exceptionally high rate of spontaneous mutations in the polymerase delta proofreading exonuclease-deficient *Saccharomyces cerevisiae* strain starved for adenine // BMC Genetics. Vol. 5. P. 34.
5. Babudri N., Pavlov Y. I., Matmati N. et al., 2001. Stationary-phase mutations in proofreading exonuclease-deficient strains of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* // Mol. Genet. Genomics. Vol. 265. P. 362–366.
6. Barbaric S., Münsterkötter M., Goding C. et al., 1998. Cooperative Pho2-Pho4 interactions at the *PHO5* promoter are critical for binding of Pho4 to UASp1 and for efficient transactivation by Pho4 at UASp2 // Mol. Cell. Biol. Vol. 18, № 5. P. 2629–2639.
7. Begley T. J., Rosenbach A. S., Ideker T. et al., 2002. Damage recover pathways in *Saccharomyces cerevisiae* revealed by genomic phenotyping and interactome mapping // Molecular Cancer Research. Vol. 1. P. 103–112.
8. Brown C. J., Todd K. M., Rosenzweig R. F., 1998. Multiple duplications of yeast hexose transport genes in response to selection in a glucose-limited environment // Mol. Biol. Evol. Vol. 15. P. 931–942.
9. Chen C., Umezumi K., Kolodner R. D., 1998. Chromosomal rearrangements occur in *S. cerevisiae* *rfa1* mutator mutants due to mutagenic lesions processed by double-strand-break repair // Mol. Cell. Vol. 2. P. 9–22.
10. Eisler H., Frohlich K. U., Heidenreich E., 2004. Starvation for an essential amino acid induces apoptosis and oxidative stress in yeast // Exp Cell Res. Vol. 300. P. 345–353.
11. Fedorova I. V., Kovaltzova S. V., Gracheva L. M. et al., 2004. Requirement of *HSM3* gene for spontaneous mutagenesis in *Saccharomyces cerevisiae* // Mutat Res. Vol. 554. P. 67–75.
12. Galhardo R. S., Hastings P. J., Rosenberg S. M., 2007. Mutation as a stress response and the regulation of evolvability // Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology. Vol. 42. P. 399–435.
13. Gasch A. P., Spellman P. T., Kao C. M. et al., 2000. Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes // Mol. Biol. Cell. Vol. 11. P. 4241–4257.

14. Hackett J. A., Feldser D. M., Greider C. W., 2001. Telomere dysfunction increases mutation rate and genomic instability // *Cell*. Vol. 106. P. 275–286.
15. Hall B. G., 1998. Adaptive mutagenesis: a process that generates almost exclusively beneficial mutations // *Genetica*. Vol. 102–103. P. 109–125.
16. Hall B. G., 1992. Selection-induced mutations occur in yeast // *PNAS*. Vol. 89. P. 4300–4303.
17. Hansche P.E., 1975. Gene duplication as a mechanism of genetic adaptation in *Saccharomyces cerevisiae* // *Genetics*. Vol. 79. P. 661–674.
18. Hanway D., Chin J. K., Xia G et al., 2002. Previously uncharacterized genes in UV- and MMS-induced DNA damage response in yeast // *PNAS*. Vol. 99. P. 10605–10610.
19. Hryciw T., Tang M., Fontanie T. et al., 2002. MMS1 protects against replication-dependent FNA damage in *Saccharomyces cerevisiae* // *Mol. Genet. Genomics*. Vol. 266. P. 848–857.
20. Huang D., Farkas I., Roach P. J., 1996. Pho85p, a cyclin-dependent protein kinase, and Snf1p protein kinase act antagonistically to control glycogen accumulation in *Saccharomyces cerevisiae* // *Mol. Cell. Biol.* Vol. 16. P. 4357–4365.
21. Huang D., Friesen H., Andrews B., 2007. Pho85, a multifunctional cyclin-dependent protein kinase in budding yeast // *Molecular Microbiology*. Vol. 66. P. 303–314.
22. Huang D., Patrick G., Moffat J. et al., 1999. Mammalian Cdk5 is a functional homologue of the budding yeast Pho85 cyclin-dependent protein kinase // *PNAS*. Vol. 96, N 25. P. 14445–14450.
23. Hunter T., Plowman G. D., 1997. The protein kinases of budding yeast: six score and more // *Trends Biochem. Sci.* Vol. 22. P. 18–22.
24. Ilyina V. L., Korogodin V. I., Fajsz C., 1986. Dependence of spontaneous reversion frequencies in haploid yeast of different yeast of different genotypes on the concentration of adenine in the medium and on the age of the culture // *Mutation Res.* Vol. 174. P. 189–194.
25. Kaffman A., Rank N. M., O'Shea E. K., 1998. Phosphorylation regulates association of the transcription factor Pho4 with its import receptor Pse/Kap121 // *Genes Dev.* Vol. 12. P. 2673–2683.
26. Kesti T., McDonald W. H., Yates J. R. et al., 2004. Cell cycle-dependent phosphorylation of the DNA polymerase epsilon subunit, Dpb2, by the Cdc28 cyclin-dependent protein kinase // *J. Biol. Chem.* Vol. 279. P. 14245–14255.
27. Kokoska R. J., Stefanovic L., DeMai J. et al., 2000. Increased rates of genomic deletions generated by mutations in the yeast gene encoding DNA polymerase delta or by decreases in the cellular levels of DNA polymerase delta // *Mol. Cell. Biol.* Vol. 20. P. 7490–7504.
28. Liu J., Kipreos E. T., 2000. Evolution of cyclin-dependent kinases (CDKs) and CDK-activating kinases (CAKs): differential conservation of CAKs in yeast and metazoan // *Mol Biol Evol.* Vol. 17. P. 1061–1074.
29. Liu C., Yang Z., Yang J., Xia Z., Ao S., 2000. Regulation of the yeast transcriptional factor PHO2 activity by phosphorylation // *J. Biol. Chem.* Vol. 275. P. 31972–31978.
30. Measday V., Moore L., Retnakaran R. et al., 1997. A Family of cyclin-like proteins that interact with the Pho85 Cyclin-Dependent Kinase // *Mol. and Cel. Biol.* P. 1212–1223.
31. Nurse P. M., 2002. Cyclin Dependent kinases and cell cycle control // *Bioscience Reports*. Vol. 22. Nos. 5, 6.
32. Ogawa N., DeRisi J., Brown P. O., 2000. New components of a system for phosphate accumulation and polyphosphate metabolism in revealed by genomic expression analysis // *Mol. Biol. Cell.* Vol. 11, N 12. P. 4309–4321.
33. Oshima Y., 1997. The phosphatase system in *Saccharomyces cerevisiae* // *Genes. Genet. Syst.* Vol. 72. P. 323–334.
34. Putnam C. D., Pennaneach V., Kolodner R. D., 2005. *Saccharomyces cerevisiae* as a model system to define the chromosomal instability phenotype // *Molecular and Cellular Biology*. Vol. 25. N 16. P. 7226–7238.
35. Rocche W. A., Foster P. L., 2000. Determining mutation rates in bacterial populations // *Methods*. Vol. 20. P. 4–17.
36. Sambuk E. V., Popova J. G., Demberelijn O., Smirnov M. N., 1995. Genetic analysis of suppressors of *pho85* mutations in *Saccharomyces cerevisiae* // 17th Int. Conf. on yeast genetics and molecular biology, Book of abstracts, Lisboa, Portugal p. 89.
37. Schneider K. R., Smith R. L., O'Shea E. K., 1994. Phosphate-regulated inactivation of the kinase PHO80-PHO85 by CDK inhibitor PHO81 // *Science*. Vol. 266. P. 122–126.
38. Siede W., Friedberg E. C., 1990. Influence of DNA repair deficiencies on the UV sensitivity of yeast cells in different cell cycle stages // *Mutat. Res.* Vol. 245. P. 287–292.
39. Timblin B. K., Bergman L. W., 1997. Elevated expression of stress response genes resulting from deletion of the *PHO85* gene // *Mol. Microbiol.* Vol. 26. P. 981–990.
40. Toh-e A., Nishizawa M., 2001. Structure and function of cyclin-dependent Pho85p kinase of *Saccharomyces cerevisiae* // *J. Gen. Appl. Microbiol.* Vol. 47. P. 107–117.
41. Toh-e A., Tanaka K., Uesono Y. et al., 1988. PHO85, a negative regulator of the PHO system, is a homolog of the protein kinase gene, CDC28, of *Saccharomyces cerevisiae* // *Mol. Gen. Genet.* Vol. 214. P. 162–164.

42. Wu X., Wang Z., 1998. Relationships between yeast Rad27 and Apn1 in response to apurinic/aprimidinic (AP) sites in DNA // *Nucleic Acids Res.* Vol. 27. P. 956–962.

Influence of mutations in regulatory *PHO* genes on stability of a genetic material of yeast *Saccharomyces cerevisiae*

A. M. Smirnov, E. V. Sambuk

✿ **SUMMARY:** Yeast *Saccharomyces cerevisiae* is convenient modelling object for studying of spontaneous mutations frequency under the influence of various environmental factors, and also as a result of metabolism infringement. One of necessary components of the growing media is inorganic phosphate. Its lack influences an expression of many genes. The system of genes expression regulation by phosphate is studied in detail. In the present work dependence of stability of a genetic material of a cage on its metabolic condition caused by mutations in genes, coding phosphate metabolism regulating proteins, is shown.

✿ **KEY WORDS:** *Saccharomyces cerevisiae*; Pho85p; mutability; mutagen sensitivity

Информация об авторах:

Смирнов Арсений Михайлович, аспирант, Санкт-Петербургский государственный университет, кафедра генетики и селекции. 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., д. 7/9. E-mail: nusense@mail.ru.

Самбук Елена Викторовна, доцент, Санкт-Петербургский государственный университет, кафедра генетики и селекции. 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., д. 7/9. E-mail: esambuk@mail.ru.