
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

RENDICONTI

MARIA ARCÀ, ROBERTO CANEVA, LAURA FRONTALI,
GIORGIO TECCE

Mutazione piccola colonia del lievito ed azione delle acridine sulla sintesi del DNA

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 51 (1971), n.6, p. 577–586.*
Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1971_8_51_6_577_0>

L'utilizzo e la stampa di questo documento digitale è consentito liberamente per motivi di ricerca e studio. Non è consentito l'utilizzo dello stesso per motivi commerciali. Tutte le copie di questo documento devono riportare questo avvertimento.

*Articolo digitalizzato nel quadro del programma
bdim (Biblioteca Digitale Italiana di Matematica)
SIMAI & UMI*

<http://www.bdim.eu/>

Biologia molecolare. — *Mutazione piccola colonia del lievito ed azione delle acridine sulla sintesi del DNA.* Nota di MARIA ARCÀ, ROBERTO CANEVA, LAURA FRONTALI e GIORGIO TECCE, presentata (*) dal Socio G. MONTALENTI.

SUMMARY. — The cytoplasmic « petite » mutation which arises in yeast spontaneously with a frequency of $1/10^2$ – $1/10^3$ is induced with an extremely high efficiency by acridines and by a number of other agents including ethidium bromide, U.V., fluoro-uracil, etc. The base composition of mitochondrial DNA in mutants is profoundly altered and the study of the effect of these agents on DNA replication could provide an explanation of the molecular mechanism of the mutation.

The effect of some mutagenic and related non-mutagenic dyes on DNA replication *in vitro* has been tested in the presence of *Escherichia coli* and yeast mitochondrial DNA polymerase. The results indicate a preferential replication, in the presence of mutagenic dyes, of A+T rich regions of DNA.

Il quadro generale fornito dalla genetica relativo ai meccanismi che sono alla base delle mutazioni geniche e cromosomiche è piuttosto ampio e va dalla sostituzione, inserzione e delezione di basi del DNA alla rottura, perdita o traslocazione di cromosomi o frammenti di essi. La mutazione citoplasmatica « piccola colonia » del lievito sembrava essere del tipo « perdita di materiale genetico ». Il fenomeno della « suppressiveness », cioè la dominanza del carattere piccola colonia osservata in alcuni incroci smentisce però l'ipotesi di una vera e propria sterilizzazione.

La scoperta del DNA mitocondriale ha consentito di studiare la mutazione citoplasmatica del lievito su basi molecolari partendo dall'ipotesi che il DNA mitocondriale contenesse un'informazione genetica citoplasmatica necessaria per il controllo della respirazione. Tale ipotesi è stata confermata dalla dimostrazione che in un mutante citoplasmatico piccola colonia la densità del DNA mitocondriale risultava modificata in seguito alla mutazione stessa [1–3].

L'analisi chimica [4] di vari mutanti « petite » ha dimostrato che la modificazione della densità è dovuta ad una variazione della composizione in basi con un arricchimento di adenina e timina che arriva a valori del 97% nel mutante da noi isolato, percentuale che lascia supporre una mancanza di informazione genetica.

Una modificazione di questo tipo del contenuto in basi del DNA non rientra, almeno apparentemente, negli schemi noti di mutazione. Infatti, l'agente mutageno determina una profonda alterazione della composizione chimica della molecola del DNA, conseguenza, forse, di una deviazione dal normale processo di duplicazione.

(*) Nella seduta dell'11 dicembre 1971.

Gli agenti più usati per indurre la mutazione piccola colonia sono le acridine, che possono determinare il cento per cento di mutazione. Le acridine sono ben note come agenti capaci di produrre mutazioni del tipo inserzione e delezione, ma l'azione mutagenica esplicita in questo caso è di tipo diverso e presenta semmai qualche analogia con la sterilizzazione del fattore F in *Escherichia coli*. Tuttavia, nel caso dei mutanti « petite » la perdita dell'informazione non è accompagnata dalla perdita del DNA che, come abbiamo visto, pur privo di informazione genetica, continua a replicarsi, anzi sembra essere replicato preferenzialmente. Infatti, il DNA alterato costituisce l'unica popolazione molecolare evidenziabile nei mitocondri dei lieviti « petite »; bisogna perciò ammettere un vantaggio selettivo del DNA mutato, ipotesi che tra l'altro spiegherebbe il fenomeno della « suppressiveness » e la stessa origine della mutazione spontanea che non si può pensare avvenga contemporaneamente a carico di tutti i mitocondri contenuti in una cellula di lievito.

Se l'origine della mutazione « piccola colonia » è da ricercarsi in una replicazione anomala del DNA mitocondriale, è evidente l'interesse di studiare l'effetto delle acridine su questo processo.

L'effetto inibitorio della proflavina sulla DNA polimerasi di *E. coli* [5] era noto da molto tempo anche se non nei dettagli del suo meccanismo. Solo in un recente lavoro McCarter *et al.* [6] hanno descritto l'inibizione in maggiore dettaglio e osservato anomalie nel corso della replicazione *in vitro* del poli-dAT ad opera della DNA polimerasi di *E. coli*.

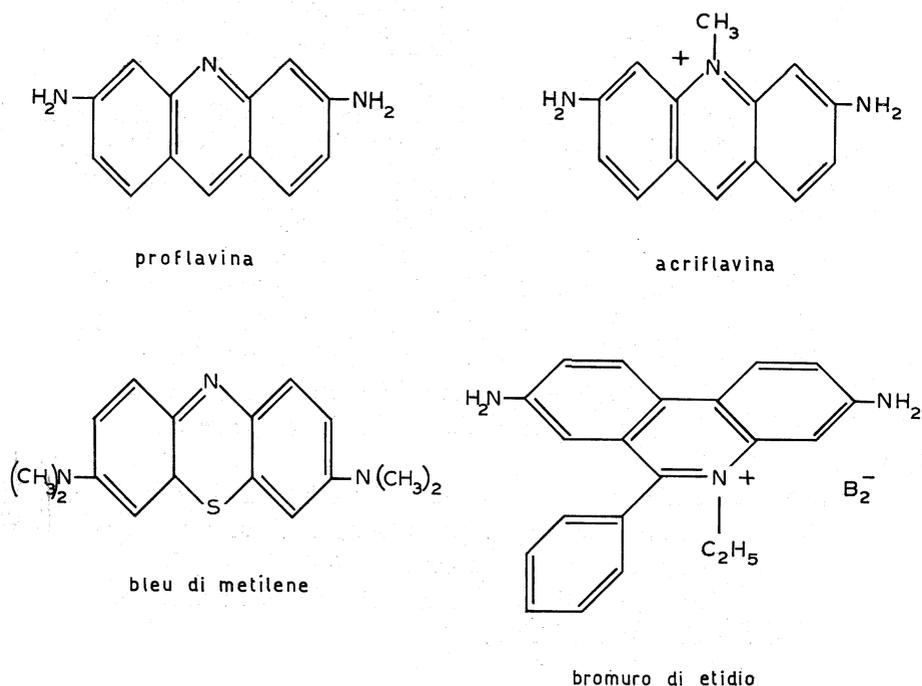


Fig. 1. - Formule dei coloranti studiati.

Nel presente lavoro è riportato uno studio del meccanismo attraverso cui le acridine ed altri coloranti strutturalmente correlati (vedi fig. 1) inibiscono la DNA polimerasi di *E. coli* e di mitocondri di lievito e si analizzano le possibili relazioni tra questa inibizione e il meccanismo molecolare della mutazione.

MATERIALI E METODI

I desossinucleosidi trifosfati erano prodotti Mann. I desossipolinucleotidi sintetici poli-dAT e poli dG—dC erano prodotti della Miles Chem. Co. L'acri flavina (3-6 diamino N-metil-acridina pura) era un prodotto Fluka. La proflavina era un prodotto B.D.H.; la glusulasi era un prodotto ENDO. Tutti gli altri composti usati erano prodotti Merck. La DNA polimerasi di *E. coli* era un prodotto commerciale Worthington corrispondente alla frazione IV del procedimento di purificazione di Richardson *et al.* [7] 300 U/mg o Biopolymers corrispondente alla frazione VII dello stesso procedimento, 5000 U/mg.

Il DNA è stato preparato col metodo di Marmur [8].

CEPPO E TERRENO DI CULTURA

I mitocondri di lievito sono stati isolati da un ceppo di *S. cerevisiae* le cui caratteristiche sono state descritte precedentemente [9]. Il lievito veniva coltivato in condizioni di aerobiosi su un terreno contenente 0,33% NaNO_3 , 0,1% MgSO_4 , 0,05% KCl , 0,0018% FeSO_4 , 0,1% KH_2PO_4 , 1% estratto di lievito, 0,9% glucosio.

PREPARAZIONE DEI MITOCONDRI

Le cellule sono state raccolte all'inizio della fase stazionaria e lavate due volte con H_2O .

È stato seguito un metodo ricavato modificando quello riportato da Duell *et al.* [10]. Le cellule lavate (circa 200 gr.) sono state sospese in mercaptoetanolanmina 0,03 M e incubate a 30°C per 30 min. Sono state poi centrifugate (in una centrifuga Sorvall a 2000 r.p.m. per 10 min.) e risospese in un tampone Tris HCl 10^{-2} M pH 7,4 contenente EDTA 10^{-3} M e sorbitolo 0,72 M. Alla sospensione sono stati aggiunti 3 ml di glusulasi Endo. Dopo circa 120 min. di incubazione a 30°C durante i quali era stata seguita al microscopio la formazione degli sferoplasti, la sospensione è stata diluita 1:1 con Tris HCl—EDTA e sottoposta ad un breve trattamento in un omogenizzatore tipo Potter. Cellule non rotte, nuclei e frammenti cellulari sono stati allontanati per centrifugazione a $1000 \times g$ per 10 min. e la frazione mitocondriale è stata fatta sedimentare per centrifugazione per 15 min. a $30.000 \times g$. Il sedimento

è stato risospeso in tampone TKM (Tris HCl 0,05 M pH 7,4; KCl 0,025 M, MgCl₂ 0,0025 M) contenente saccarosio 0,4 M ed è stato trattato con DNAasi pancreatica (Worthington) alla concentrazione di 20 µg/ml per 30 min. a temperatura ambiente. La sospensione è stata centrifugata di nuovo a 1000 × g per 10 min. e poi a 30.000 × g. I mitocondri sono stati risospesi in Tris HCl 10⁻² M contenente EDTA 10⁻³ M e saccarosio 0,4 M e sottoposti ad altri due cicli di centrifugazione a 1000 e 30.000 × g. Il sedimento dell'ultima centrifugazione ad alta velocità ripreso in Tris HCl contenente EDTA e saccarosio 0,4 M è stato posto su un gradiente di saccarosio 1,1-1,9 M e centrifugato per 4 ore nel rotore SW27 dell'ultracentrifuga preparativa Spinco mod. L65.

La zona del gradiente in cui si trovava la banda mitocondriale (colore rosso) veniva prelevata, diluita 1:1 con Tris HCl-EDTA e centrifugata per 30 min a 30.000 × g. Il sedimento veniva risospeso in un tampone contenente Tris HCl 0,002 M pH 7,4 EDTA: 10⁻³ M e mercaptoetanololo 0,002 M (tampone 2) e usato per la preparazione della DNA polimerasi mitocondriale.

PURIFICAZIONE DELLA DNA POLIMERASI MITOCONDRIALE

È stato seguito il procedimento riportato da Wintersberger e Wintersberger [11]. Il profilo di eluzione dell'attività DNA polimerasica dalla colonna di DEAE cellulosa è riportato in fig. 2. Sull'effluente è stata determinata (mediante uno spettrofotometro Zeiss) la densità ottica a 260 e 280 mµ. Le proteine sono state determinate col metodo di Lowry [12].

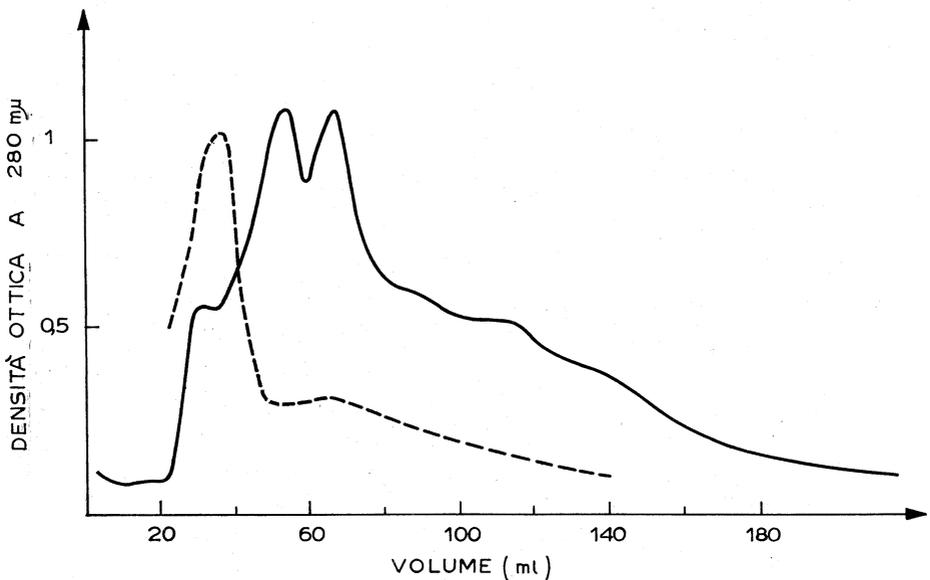


Fig. 2. - Profilo di eluzione delle proteine mitocondriali (tratto pieno) e dell'attività DNA polimerasica (a tratteggio) dalla colonna di DEAE cellulosa.

SAGGIO DELL'ATTIVITÀ DNA POLIMERASICA

Per il saggio della DNA polimerasi di *E. coli*, le miscele di incubazione contenevano, in un volume totale di 0,3 ml, le seguenti quantità di reattivi: tampone fosfato pH 7,4 20 μmoli , [^3H] dATP 10 $\text{m}\mu\text{moli}$ (att. specifica $2 \cdot 10^8$ disint/min/ μmole) mercaptoetanol 0,3 μmoli , MgCl_2 2 μmoli , DNA 4 μg , DNA polimerasi 0,2 unità.

Per il saggio della DNA polimerasi mitocondriale le miscele contenevano, in un volume di 0,25 ml, 25 μmoli Tris HCl pH 8, 15 μmoli MgCl_2 , 7 $\text{m}\mu\text{moli}$ di ognuno dei 4 deossinucleosidi trifosfati di cui dCTP marcato con tritio (att. specifica $2 \cdot 10^8$ disint/min/ μmole) ed eventualmente dATP marcato con C^{14} (att. spec. $4 \cdot 10^7$ disint/min/ μmole) 0,8 μmoli mercaptoetanol, 0,25 μmoli EDTA, 30 μg di DNA-polimerasi mitocondriale e 4 μg DNA di *E. coli*.

RISULTATI

L'effetto dei vari coloranti sulla sintesi *in vitro* di DNA ad opera di DNA polimerasi di *E. coli* è riportato in fig. 3. Gli esperimenti sono stati eseguiti sia alla luce che al buio per saggiare l'eventuale importanza di un effetto

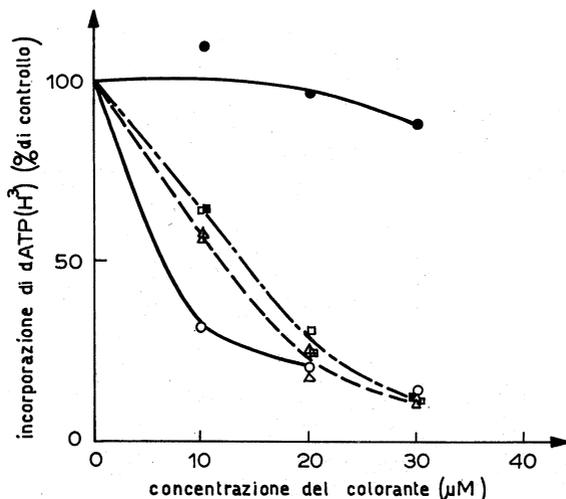


Fig. 3. - Effetto di acridine, bromuro di etidio e bleu di metilene sulla sintesi del DNA *in vitro* ad opera della DNA polimerasi di *E. coli*. ● Bleu di metilene al buio e ○ bleu di metilene alla luce; ■ acriflavina al buio e □ acriflavina alla luce; ▲ proflavina al buio e △ proflavina alla luce; + bromuro di etidio alla luce.

fotodinamico, cioè di rotture a carico del DNA ad opera delle acridine. Come si rileva per proflavina, acriflavina e bromuro di etidio, l'inibizione ha circa lo stesso andamento e non si osserva alcun effetto fotodinamico. Diversa appare

la situazione per il caso del colorante non mutageno bleu di metilene che non inibisce al buio ed ha un forte effetto inibitorio alla luce. Per il caso del bleu di metilene alla luce il meccanismo di inibizione appare quindi diverso.

Il grado di inibizione da acridine non è però lo stesso con i diversi primers come risulta dalla fig. 4, in cui l'effetto della proflavina sulla DNA polimerasi di *E. coli* è studiato in presenza di primers naturali e sintetici (DNA di *E. coli*, e di *S. fradiae*; DNA mitocondriale di *S. cerevisiae*, poli dAT e poli dG—dC).

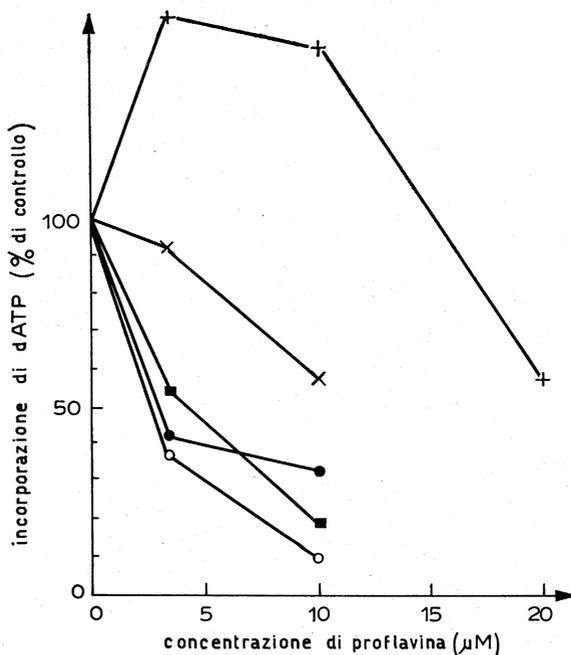


Fig. 4. - Inibizione della incorporazione di $[H^3]dATP$ nel DNA in presenza di proflavina a concentrazioni crescenti e di diversi primers.

Come si vede non si notano differenze notevoli per quanto riguarda i polimeri ricchi in G e C o a composizione equilibrata, mentre si ha inibizione molto minore in presenza di DNA mitocondriale di lievito (80% A+T) e addirittura stimolazione nell'ambito di una certa concentrazione per il poli dAT.

La composizione in basi del prodotto sintetizzato in presenza di acridine studiata mediante doppia marcatura del prodotto con $dATP C^{14}$ e $dCTP H^3$ (fig. 6) è inalterata fino ad una inibizione corrispondente al 90% circa, ma devia a questo punto nel senso di un arricchimento in A e T, cioè di un incremento nel rapporto A/C o T/C. La deviazione non si osserva invece se la sintesi viene ridotta per accorciamento del tempo di incubazione. In fig. 5 è riportata, in funzione della concentrazione di proflavina, la percentuale di A nel DNA sintetizzato in presenza di vari primers.

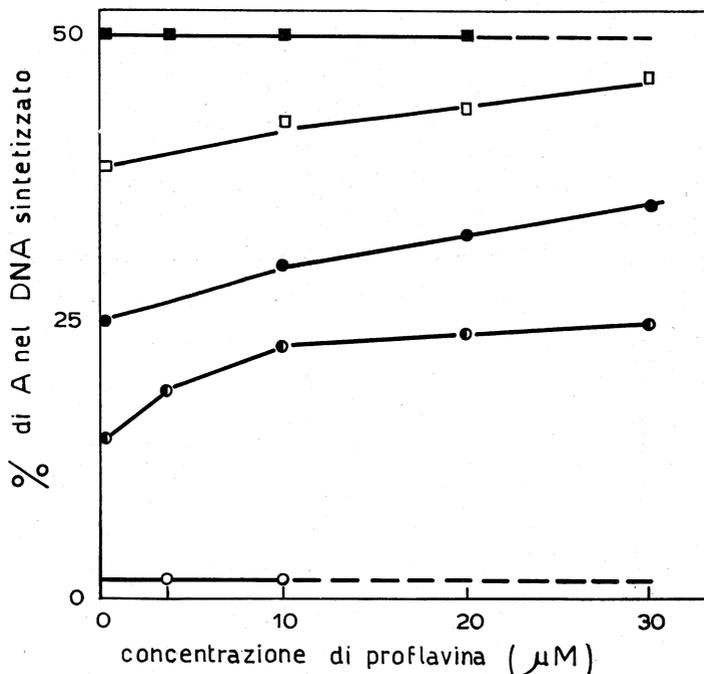


Fig. 5. — Percentuale di A nel DNA sintetizzato in presenza di concentrazioni crescenti di proflavina e diversi primers. ○ poli dG—dC; ● *S. fradiae*; ● *E. coli*; □ DNA mitocondriale; ■ poli dAT.

In fig. 7 è riportato invece l'effetto di acriflavina e proflavina sulla sintesi *in vitro* di DNA ad opera di DNA polimerasi purificata di mitocondri di lievito. Esperimenti preliminari sembrano indicare che, in questo caso, concentrazioni 20 µM dei due coloranti provocano una deviazione del rapporto A/C.

DISCUSSIONE

Le caratteristiche particolari della inibizione da acridine della DNA polimerasi messe in evidenza dai risultati sopra riportati possono contribuire all'interpretazione del meccanismo della mutagenesi citoplasmatica esplicita nel lievito da questi coloranti.

Infatti la mutazione « petite » si accompagna, in tutti i casi finora studiati, ad una modificazione del DNA mitocondriale con spostamento della composizione in basi verso un più alto contenuto in adenina e timina. Analoga deviazione si osserva come conseguenza dell'azione delle acridine sulla DNA polimerasi il cui prodotto di sintesi risulta in presenza di acridine diverso, come composizione chimica, dal primer usato nella miscela di reazione.

La deviazione del rapporto A/C o T/C osservata *in vitro* non è dovuta ad errori nell'appaiamento delle basi in quanto, usando come primer il poli dGdC, se ne ha una copia fedele senza inserimento di adenina e timina.

Per spiegare la deviazione osservata si potrebbe allora pensare che la sintesi di DNA in presenza di acridine non avvenga esclusivamente sul primer che potrebbe non risultare disponibile a causa della formazione di complessi DNA-colorante, ma che sia in parte dovuta alla sintesi *de novo* di poli dAT, sintesi che come è ben noto si ottiene in assenza di primer. Tuttavia questa ipotesi è da scartare dato che la sintesi *de novo* non può avere luogo nei tempi presi in considerazione in quanto le acridine la ritardano fortemente. D'altra parte l'effetto è dovuto specificamente alle acridine e non alla semplice diminuzione della sintesi come risulta dalla fig. 6.

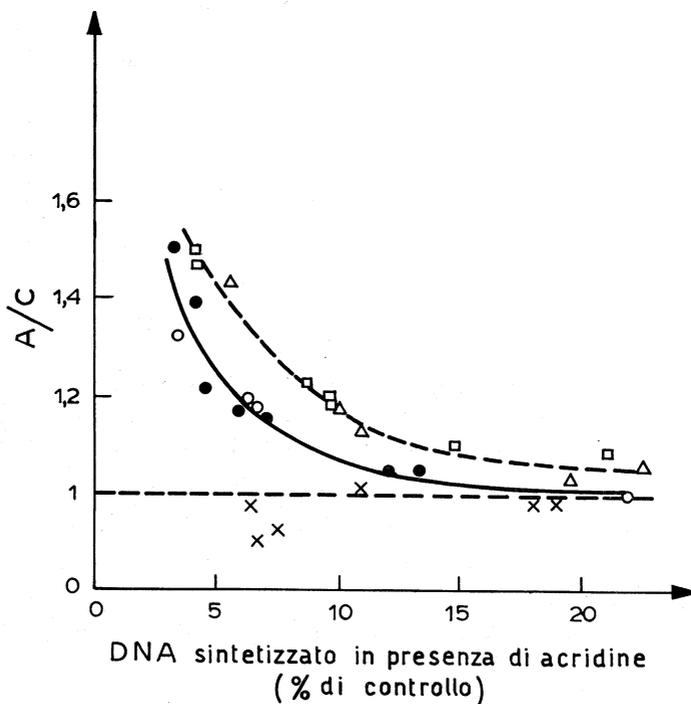


Fig. 6. - Rapporto A/C nel DNA sintetizzato in varie condizioni in presenza di acridine in funzione della percentuale di sintesi rispetto al controllo. DNA di *E. coli*. ● proflavina al buio; ○ proflavina alla luce (polimerasi Worthington); △ acriflavina; □ proflavina (polimerasi Biopolymers); × sintesi ridotta per accorciamento del tempo in incubazione.

Si potrebbe pensare quindi ad una replicazione preferenziale, in presenza di acridine, dei tratti più ricchi in A+T, ciò che concorderebbe anche con i risultati ottenuti in presenza di diversi primers.

Questi risultati sono sostanzialmente in accordo con l'ipotesi che è stata formulata [2] relativamente al meccanismo della mutazione piccola colonia, secondo cui il DNA dei mutanti potrebbe originarsi per replica preferenziale di un frammento ricco in A+T del DNA mitocondriale.

È quindi estremamente importante poter valutare fino a che punto questi risultati si possono estendere alla DNA polimerasi dei mitocondri di lievito.

I primi dati relativi a questo enzima dimostrano che anche in questo caso si ha inibizione da parte dell'acriflavina e della proflavina, ma che c'è differenza tra i due coloranti nel senso che l'inibizione da acriflavina risulta più bassa di quella della proflavina (fig. 7). D'altra parte in ambedue i casi, ma soprattutto in presenza di acriflavina, si ha una deviazione del rapporto A/C a bassi livelli di inibizione, ciò che potrebbe essere messo in relazione con la produzione nei mutanti di DNA alterato e con la replica preferenziale di quest'ultimo. La differenza tra acriflavina e proflavina suggerisce inoltre una correlazione tra l'effetto *in vitro* e l'azione mutagena di questi coloranti dei quali l'acriflavina ha un livello di efficienza assai maggiore.

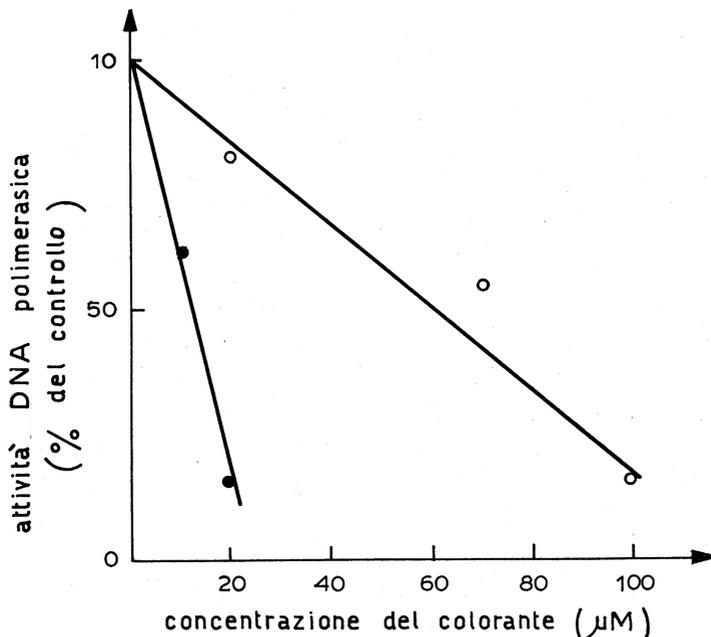


Fig. 7. - Effetto di acriflavina e proflavina sulla sintesi *in vitro* di DNA ad opera di DNA polimerasi mitocondriale purificata.

● acriflavina; × proflavina.

Recentemente Perlman e Mahler [13] hanno osservato che dopo trattamento del lievito con bromuro di etidio (il quale come la acridine produce una percentuale elevatissima di mutanti) si ha una scomparsa del DNA mitocondriale a cui fa seguito una sintesi di DNA alterato. Si può forse ricollegare a questo effetto quello studiato da Westergaard in *Tetrahymena* [14] in cui dopo trattamento con bromuro di etidio si ha un aumento di attività DNA polimerasica mitocondriale che va probabilmente interpretata come attività di riparazione. Si potrebbe quindi dare una spiegazione complessiva di questo tipo: la mutazione è dovuta a replica di un tratto ricco in A+T del DNA mitocondriale che viene poi replicato preferenzialmente. La replicazione parziale segue nel caso del bromuro di etidio, a una frammentazione del DNA seguita

da stimolazione dell'attività riparatrice, il che spiega perché il bromuro di etidio è mutageno anche in assenza di divisione cellulare. Nel caso delle acridine invece, poiché non si ha frammentazione del DNA, la mutazione può insorgere solo durante il normale processo di replicazione del DNA che risulta però alterato nel senso che solo un tratto ricco in A+T viene copiato e poi replicato preferenzialmente. Questa ipotesi potrebbe spiegare anche il diverso contenuto di G+C e quindi di informazione genetica che si riscontra nei mutanti ottenuti dai nostri ceppi [2] e in quelli ottenuti da Slonimski [3]. Per spiegare tale differenza basterebbe infatti pensare a una diversa disposizione dei tratti ricchi in A+T inframezzati o meno da tratti ricchi in G+C.

BIBLIOGRAFIA

- [1] F. CARNEVALI e G. TECCE, « Boll. Soc. It. Biol. Sper. », 41 (1965).
- [2] F. CARNEVALI, G. MORPURGO e G. TECCE, « Science », 163, 133 (1969).
- [3] J. G. MOUNOULOU, H. JACOB e P. SLONIMSKI, « Bioch. Bioph. Res. Comm. », 24, 218 (1966).
- [4] G. BERNARDI, F. CARNEVALI, A. NICOLAJEFF, G. PIPERNO e G. TECCE, « J. Mol. Biol. », 37, 492 (1968).
- [5] J. HURWITZ, J. J. FURTH, M. MALAMY e M. ALEXANDER, « Proc. Natl. Acad. Sci. US. », 48, 1222 (1962).
- [6] J. A. MCCARTER, N. KADOHAMA e C. TSIAPALIS, « Canadian J. Biochem. », 47, 301 (1969).
- [7] C. C. RICHARDSON, C. L. SCHILDKRAUT, H. V. APOSHIAN e A. KORNBERG, « J. Biol. Chem. », 239, 222 (1964).
- [8] J. MARMUR, « J. Mol. Biol. », 3, 1164 (1961).
- [9] G. MORPURGO, G. SERLUPI CRESCENZI, G. TECCE, F. VALENTE e D. VENETTACCI, « Nature », 201, 897 (1964).
- [10] E. A. DUELL, S. INOUE e M. F. UTTER, « J. Bacteriology », 88, 1762 (1964).
- [11] E. WINTERSBERGER e I. WINTERSBERGER, « Eur. J. Biochem. », 13, 20 (1970).
- [12] P. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR e R. J. RANDALL, « J. Biol. Chem. », 193, 265 (1951).
- [13] P. S. PERLMAN e H. B. MAHLER, « Nature », 231, 12 (1971).
- [14] O. WESTERGAARD, « Bioch. Bioph. Acta », 213, 36 (1970).