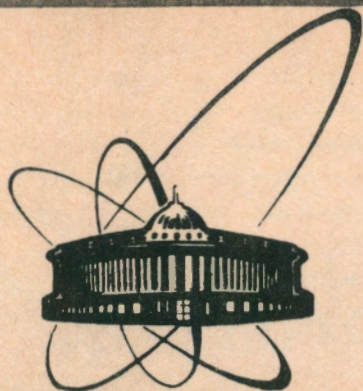


92-105



сообщения  
Объединенного  
института  
ядерных  
исследований  
Дубна

P19-92-105

В. Л. Корогодина, В. И. Корогодин, Е. С. Майорова

МОДЕЛИРОВАНИЕ ДИНАМИКИ ВЫЯВЛЕНИЯ  
РЕВЕРТАНТОВ У ДРОЖЖЕЙ-САХАРОМИЦЕТОВ

1992

## Введение

При изучении мутагенеза у дрожжей обычно определяют частоты мутирования исследуемого локуса. Одна из наиболее распространенных методик - определение частоты мутирования путем подсчета колоний вторичного роста (ревертантов) на агаризованных питательных средах [1]. Нами описаны некоторые методики для изучения спонтанного мутагенеза у дрожжей с переносом на ядерных фильтрах колоний исходного штамма на селективную среду [2,3]. Динамика выявления ревертантов на селективной среде оказалась различной для разных генов и разных сред [4]. Видимо, такая характеристика ревертирования гена отражает какие-то свойства ревертантов, например, скорость их размножения на селективной среде, и зависит от условий культивирования.

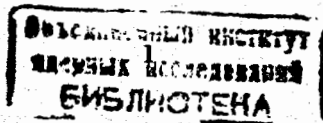
Для определения свойств спонтанных ревертантов по локусу *leu 2-1* и закономерностей, связанных со средой культивирования, мы провели моделирование динамики выявления ревертантов, используя результаты ранее проведенных экспериментов и метод Монте-Карло. Одновременно были решены следующие задачи: 1) уточнение и оптимизация методики, приемлемой для определения частоты ревертирования; 2) моделирование скорости размножения ревертантов; 3) выяснение природы различий между ревертантами, выявляющимися в разные сроки.

Материал и методы проведенных экспериментов, а также полученные результаты описаны в работе [5]. Напомним лишь, что в качестве исходного был использован штамм **HA3-24A** (а *leu2-1 lys1-1*), полученный от Чепурного, ОИЯИ [6], обладающий очень слабым остаточным ростом. В настоящей работе использовали данные по динамике выявления локусных ревертантов, возникших спонтанно на средах с разным содержанием лейцина (3, 30 и 300 мг/л).

### Принципы и условия моделирования

1. Процесс ревертирования полагали связанным с репликацией [4], а формула для определения числа событий ревертирования в популяции клеток была:

$$M = r \cdot 2^{\frac{t}{\tau_0}}, \quad (1)$$



где  $M$  - число ревертантов, возникших к моменту времени  $t$ ;  $r$  - частота этих событий;  $\tau_0$  - продолжительность клеточного цикла исходного штамма. Производной формулы (1) является формула (2) для определения времени  $t_i$  возникновения  $i$ -го ревертанта:

$$t_i = \ln(i/r) \cdot \tau_0 / \ln 2 - t_0, \quad (2)$$

где  $t_0$  соответствует времени, требующемуся для накопления числа посеянных клеток из одной клетки.

Эта посылка иллюстрируется на гистограмме накопления числа ревертантов в растущей популяции дрожжей (рис. 1, А). Отличное от нуля количество ревертантов при  $t = 0$  соответствует наличию некоторого их количества в исходной популяции клеток, посеянных на питательную среду.



Рис. 1. Моделирование образования ревертантов с частотой  $6 \cdot 10^{-7}$  в течение 46 часов на среде культивирования с 3 мг/л лейцина (А); равновероятное распределение ревертантов по условному времени деления (Б); динамика выявления ревертантов на селективной среде (В).

2. В основу моделирования были положены условия наших опытов по определению частоты возникновения ревертантов по локусу *leu2-1* у штамма **НАЗ-24А**. Одной из особенностей этого штамма является очень слабый остаточный рост на селективной среде без лейцина, благодаря чему образование ревертантов после переноса дрожжей на селективную среду практически прекращается [5].

3. Для выявления закономерностей появления колоний ревертантов, соответствующих простейшим сформулированным выше допущениям, была разыграна следующая модель. Было сделано предположение, что неко-

торая условная продолжительность клеточного цикла ревертантов, усреднённая от момента реверсии до момента регистрации, распределена случайным образом в интервале, определённом сроком появления на селективной среде первых и последних вторичных колоний. Такое случайно разыгранное по методу Монте-Карло распределение  $\tau$  (время клеточного цикла ревертантов) представлено на рис. 1, Б. Назовем  $\tau$  условным временем деления (УВД). Динамика выявления на селективной среде ревертантов с такими случайно распределёнными  $\tau$  представлена на рис. 1, В. (Считалось, что зарегистрировать мы можем колонию ревертанта при  $6 \cdot 10^5$  клеток). На этой простой модели видно, что распределение деформировано: в правой части мы наблюдаем как бы "недостаток" ревертантов, а слева - наличие выявившихся в первые сутки ревертантов, клетки которых были занесены в исходную популяцию при посеве.

4. Следующей моделью являлся случайный розыгрыш УВД ревертантов при учете экспериментально полученной динамики их выявления. А именно, по экспериментальному времени выявления мы строим распределение ревертантов по УВД, используя метод Монте-Карло и посылки 1-2. На рис. 2 представлены: динамика выявления ревертантов на

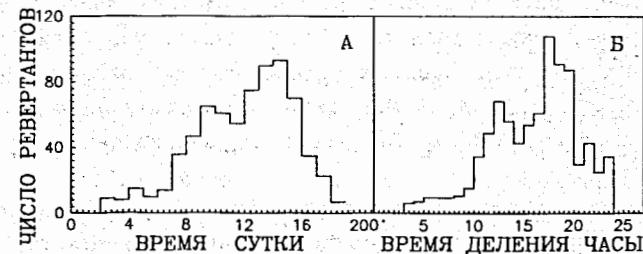


Рис. 2. Динамика выявления ревертантов без растирания при культивировании в течение 48 часов на среде с 3 мг/л лейцина (А). Моделирование условного времени деления (Б).

селективной среде в опыте без растирания\*, перенесенных со среды

\* В опытах без растирания колонии дрожжей, выросшие на исходной среде, перед перенесением на селективную среду не подвергали растиранию стеклянной палочкой (см. [3]).

культивирования с 3 мг/л лейцина (А), и моделированное распределение УВД ревертантов  $\tau_i$  (Б). Различия между рис.1, Б и В, и рис.2, А и Б означает, что простейшее допущение о случайном распределении ревертантов по  $\tau_i$  не соответствует действительности, что и оправдывает проведение настоящей работы.

#### Результаты

Подтверждение образования всей совокупности выявленных ревертантов на исходной среде культивирования.

Обратимся к опытам с растиранием колоний исходного штамма в момент переноса на селективную среду, описанным в [5]. Условия опыта таковы, что если отрезок времени между образованием ревертанта до растирания колонии позволяет ему разделиться хотя бы один раз, мы регистрируем этот ревертант как "множественный", в противном же случае - как "единичный" [3]. Метод Монте-Карло, а также соотношение (2) определяют моделирование групп "множественных" и "единичных" ревертантов. Моделирование выхода множественных и единичных ревертантов, опирающееся на экспериментальные данные по времени их выявления, можно сопоставить с результатами экспериментов, что будет служить проверкой верности или ложности исходных посылок. Чтобы такая модель "работала", мы должны были предположить, что на исходной среде культивирования колонии ревертантов растут с  $\tau_i \leq \tau_0$ , (где  $\tau_i$  - УВД клеток ревертантов, а  $\tau_0$  - клеток исходного штамма). Это предположение в дальнейшем подтвердилось (см. табл.4).

В табл. 1 приводятся экспериментальные данные и результаты моделирования выхода множественных и единичных ревертантов для случая выращивания культуры на среде с 3 мг/л лейцина в течение 54 часов (логарифмическая фаза роста). Хорошие соответствия результатов моделирования экспериментальным данным были получены при их сопоставлении с результатами опытов по выращиванию дрожжей на средах с 3, 30 и 300 мг/л лейцина в течение сроков, соответствующих нахождению культур как в логарифмической, так и в стационарной фазах роста.

Эти результаты позволяют заключить, что все ревертанты, наблюдаемые в опыте, т.е. как множественные, так и единичные, образовались на исходной среде культивирования, а не после перенесения на

Табл.1. Сравнение результатов моделирования с экспериментальными данными

экспериментальные данные			результаты моделирования		
t(час)	п множественные	п единичные	t(час)	п множественные	п единичные
54	325	595	53.98	325	595

селективную среду, как, например, в случае с ревертантами по гену *ade2*, описанными в работах [2-4].

#### Моделирование продолжительности клеточного цикла ревертантов

Для всех вариантов опытов по ревертированию (в логарифмической и стационарной фазах роста на средах с 3, 30 и 300 мг/л лейцина) было проведено моделирование УВД клеток ревертантов - их усреднённой характеристики от момента ревертирования до регистрации колоний вторичного роста.

На рис. 3 представлены результаты моделирования для среды культивирования с 3 мг/л лейцина, для случаев логарифмической (верхний ряд) и стационарной (нижний ряд) фаз роста. На рисунке показана динамика выявления "множественных" (А, Г) и "единичных" (Б, Д) колоний ревертантов. Там же представлены гистограммы распределения ревертантов по УВД их клеток в случаях логарифмической (В) и стационарной (Е) фаз роста. Эти данные соответствуют популяции клеток на 20 чашках Петри. Для сред культивирования, где лейцин в норме (30 мг/л) и в избытке (300 мг/л), динамика выявления и гистограммы распределения ревертантов по УВД показаны на рис. 4 и 5. Хорошо видно, что, помимо статистических колебаний, гистограммы для случаев логарифмической и стационарной фаз роста культур, а также для всех вариантов сред имеют различия. Они, прежде всего, их форма, зависят от размеров колоний исходного штамма и других факторов, таких, например, как более быстрое выявление ревертантов, если они образуют группу. В табл.2 приведены

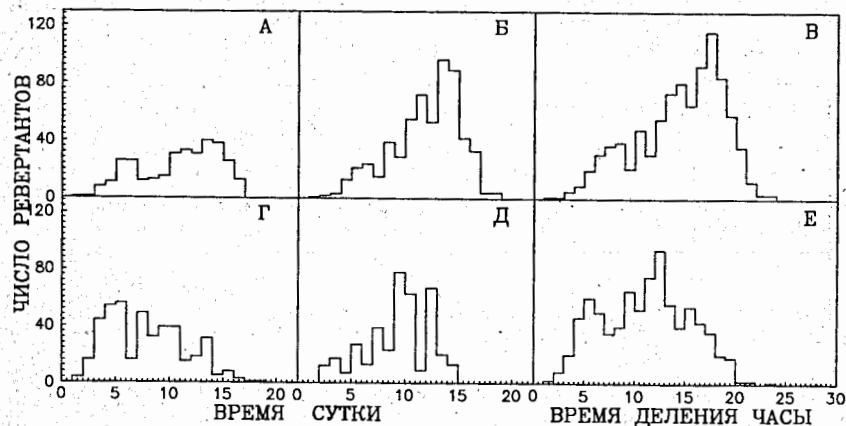


Рис. 3. Динамика выявления ревертантов в опыте с растирием при культивировании на селективной среде с 3 мг/л лейцина. Возраст культур: 54 часа — "множественные" (А) и "единичные" (Б) ревертанты; 4 суток — "множественные" (Г), "единичные" (Д) ревертанты. Моделирование условного времени деления в логарифмической (В) и стационарной (Е) фазах роста.

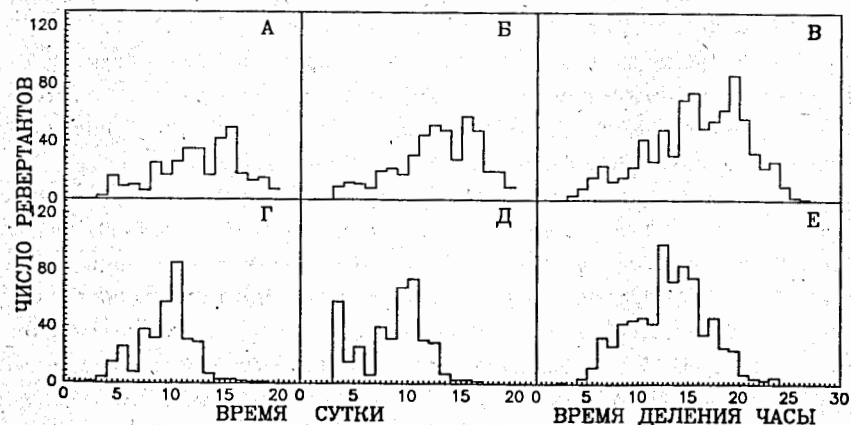


Рис. 4. Динамика выявления ревертантов в опыте с растирием при культивировании на селективной среде с 30 мг/л лейцина. Возраст культур: 30 часов — "множественные" (А) и "единичные" (Б); 4 суток — "множественные" (Г) и "единичные" (Д). Моделирование условного времени деления в логарифмической (В) и стационарной (Е) фазах роста.

размеры колоний исходного штамма при переносе фильтров со среды с лейцином на селективную среду. В логарифмической фазе роста на средах с 30 и 300 мг/л лейцина в одной колонии содержится в три-четыре раза больше клеток, чем на среде с 3 мг/л лейцина. В стационарной фазе колонии крупнее, чем в логарифмической, в полтора-два раза (табл. 2). Мы уже отмечали [5], что это обусловило невыявление части ревертантов, возникающих в более крупных колониях, особенно тех из них, которые вырастают в более поздние сроки.

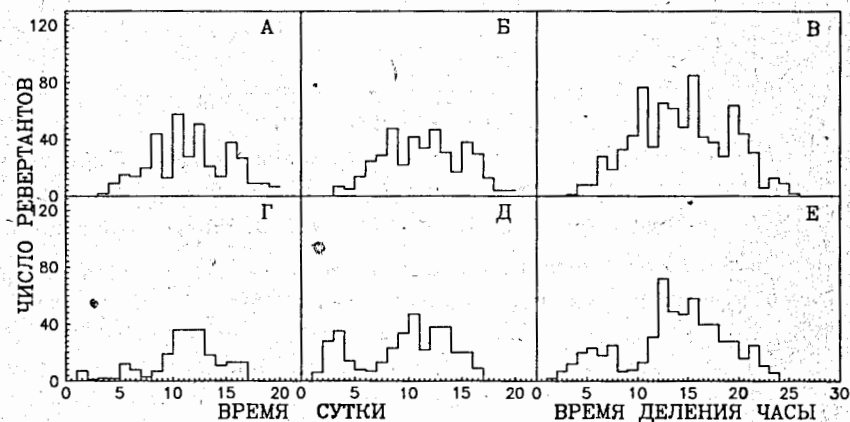


Рис. 5. Динамика выявления ревертантов в опыте с растирием при культивировании на селективной среде с 300 мг/л лейцина. Возраст культур: 30 часов — "множественные" (А), "единичные" (Б); 4 суток — "множественные" (Г), "единичные" (Д). Моделирование условного времени деления в логарифмической (В) и стационарной (Е) фазах роста.

При нормировке результатов экспериментов на одно и то же число клеток в колонии ( $10^6$ ) мы получили гистограммы, показанные на рис. 6. Очевидно, что варианты (Б-Е) плохо отражают картину ревертирования гена *leu2* в результате быстро нарастающего недовываения с увеличением числа клеток в колониях (см. рис. 6 и табл. 2).

#### Характеристики клеток ревертантов и образуемых ими колоний

Для выяснения более подробных характеристик ревертантов 132 ревертанта, полученные при проведении одного из опытов на среде с 3 мг/л лейцина, посеяли штампом на полную среду. После трёхнедель-

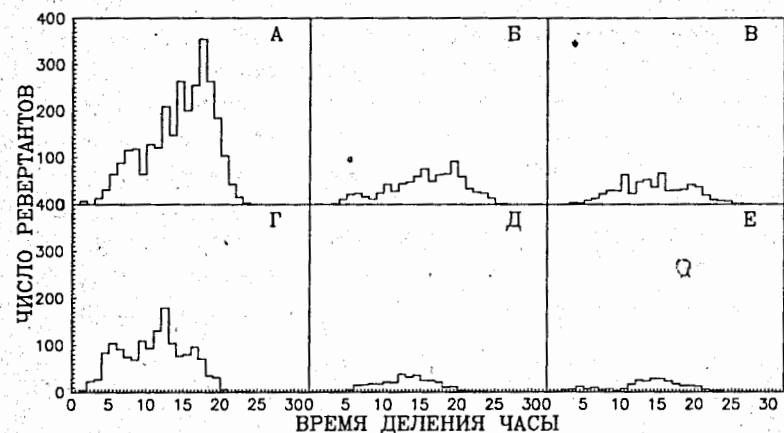


Рис. 6. Моделирование условного времени деления в опыте с растиранием при культивировании на средах с 3 (А,Г), 30 (Б,Д), и 300 (В,Е) мг/л лейцина в логарифмической (А,Б,В) и стационарной (Г,Д,Е) фазах роста. Нормировка на одно и то же ( $10^6$ ) число клеток в колонии для популяций на 20 чашках Петри.

Табл. 2. Число клеток в колонии при переносе на селективную среду (усредненные данные 3-5 опытов)

лейцин мг/л	логарифмическая фаза		стационарная фаза	
	t(час) культиви- рования	$n \cdot 10^5$ (кл/кол) при переносе	t(час) культиви- рования	$n \cdot 10^5$ (кл/кол) при переносе
3	54	$3,3 \pm 0,6$	96	$5,0 \pm 0,9$
30	22	$9,7 \pm 2,1$	96	$22,9 \pm 7,1$
300	25	$13,0 \pm 2,1$	96	$22,1 \pm 6,7$

ного культивирования проявились морфологические различия посеянных культур. Можно было выделить четыре четко различающихся группы колоний (табл. 3).

Табл. 3. Характеристики колоний ревертантов, относящихся к разным группам

№ группы	Характеристики колоний
1	Крупные, однородные, кремового цвета с темнеющей верхушкой.
2	Средние, ярко-белые.
3	Мелкие, светло-бурые.
4	Разный размер, бурые разных оттенков.

Характеристики ревертантов соответствующих групп представлены в табл. 4. Дополнительное качество - наличие на колониях ревертантов двух или более колоний вторичного роста - сведено в пятый столбик, где в скобках указывается группа, в которую входит такой ревертант.

Сделав моноклональный рассев 27 культур с разными сроками выявления, мы обнаружили следующие фенотипы колоний. Крупные, круглые, белые, без секторов - большей частью они были из группы 1. Средние, круглые, белые, без секторов. Разных размеров, бурые разных оттенков, с секторами, часто с колониями вторичного роста (вторичные колонии - в основном большие, белые) - все из группы 4. 4 ревертанта из 27 были мелкие, бурые с секторами, при повторных пересевах выплывали колонии с исходным фенотипом, крупные белые колонии, мелкие белые и колонии бурого цвета. Все четыре указанных ревертанта были из группы 4 и появились на селективной среде на 14-15 сутки.

Шесть культур ревертантов, зарегистрированных в разные сроки, были посеяны на среды с 3 мг/л лейцина и без лейцина, и определены кривые их роста. Они представлены на рис. 7.

Время генерации клеток на обеих средах приведены в табл. 5.

Табл. 4. Различия ревертантов по морфологии колоний.  
В столбцах - число культур

срок выявления на селективной среде, сутки	№ группы				наличие колоний вторичного роста (№ группы)
	1	2	3	4	
1		1			
2		3			
3		2	1	1	1(4)
4		3		3	
5		4			
6		5			
7		3	1	3	
8		3	1	2	1(4)
9		3	1	1	4
10		1		3	
11			4	3	1(4)
12		3	2	1	1
13		1	1	4	2(2,4)
14		1	7	4	8
15			3	3	7
16			1	1	3
17		2		1	4
18		2	2		5
19-24			2	7	

Табл. 5. Время деления клеток ревертантов на средах с 3 мг/л лейцина и без лейцина

№ культуры	срок выявления (сутки)	$\tau$ на средах (час)	
		leu (3 мг/л)	leu (0 мг/л)
1	2	3.1	3.0
2	9	4.2	4.0
3	14	5.5	4.2
4	17	6.4	4.7
5	17	4.5	2.9
6	17	2.9	3.1

Для всех кривых роста наблюдается одна особенность, независимо от срока выявления соответствующего ревертанта: кривые роста на среде без лейцина отличаются от кривых роста на среде с 3 мг/л лейцина не столько временем генерации, сколько наличием латентного периода - временем, в течение которого посеянная клетка находится на питательной среде без размножения. Эти данные очень хорошо иллюстрируют термин "условное время деления", принятый нами по отношению к расчётным значениям  $\tau_1$ , и показывают, что состоит оно, по меньшей мере, из двух компонентов - времени генерации в логарифмической фазе роста и продолжительности лаг-фазы. Большая роль здесь принадлежит, конечно, и конкурентноспособности клеток ревертантов при контакте с клетками исходного штамма.

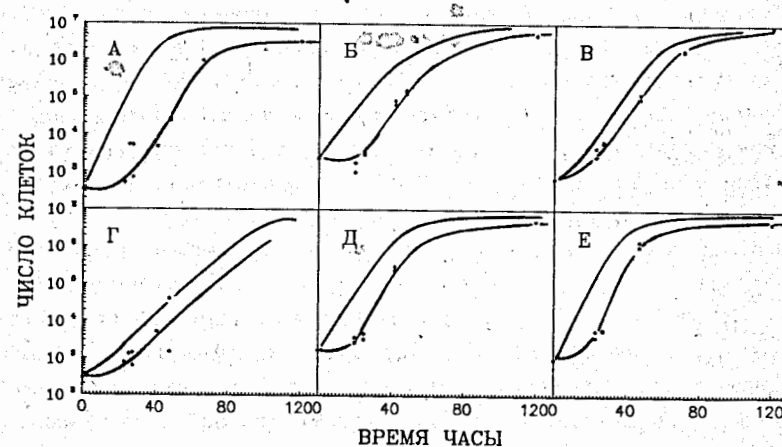


Рис. 7. Кривые роста ревертантов, выявившихся на селективной среде в разные сроки: на 2 (А), 9 (Б), 14 (В) и 17 сутки (Г, Д, Е).

### Обсуждение

Моделирование выявления ревертантов на селективной среде подтвердило предположение, что в случае штамма НАЗ-24А в процессе такого выявления мы регистрируем ревертанты, образовавшиеся на исходной среде культивирования. Экспериментальная проверка различ-

ных сделанных в ходе работы над моделью предположений показала, что на исходной среде усреднённое время генерации ревертантов не превышает такового для клеток исходного штамма. Это очень хорошо согласуется с представлениями о регуляции биосинтеза лейцина - [7,8].

На селективной среде, где у ревертантов включается собственный биосинтез лейцина, УВД клеток за период от перенесения на селективную среду до момента регистрации варьирует от 2-3 часов до 20 часов (рис. 3-5). Экспериментальная проверка показала, что величина  $\tau_1$ , видимо, многофакторная: помимо собственно времени генерации ревертанта она включает в себя и латентный период, когда клетка без деления находится на селективной среде; когда же она начинает делиться, то время генерации оказывается гораздо меньше УВД расчётной условной величины. В табл. 5 приведены значения  $\tau$  для ревертантов как с малыми (№ 1,2), так и с большими (№ 4-6) сроками выявления на селективной среде; для последних можно было бы ожидать  $\tau=18-20$  часов. Судя по сопоставлению экспериментальных данных и результатов моделирования, латентный период для клеток ревертантов индивидуален и сильно зависит от подавления размножения ревертанта клетками исходного штамма.

После проведённого анализа экспериментально регистрируемых данных и результатов моделирования становится ясным различие в гистограммах по УВД  $\tau$  для логарифмической и стационарной фаз роста культур, а также для разных вариантов сред (3, 30 и 300 мг/л лейцина). Можно с большой уверенностью предположить, что для многих ревертантов с увеличением размеров исходных колоний латентный период так затянут, что они могут вовсе не выявиться из-за высыхания и/или истощения среды в чашках Петри или из-за низкой конкурентноспособности (рис. 3-6). Этой причиной объясняется как недостаток на гистограммах 3, В; 4, В, Е; и 5, В, Е многих ревертантов, особенно в правой части распределений, так и "растягивание" этих гистограмм в результате увеличения латентного периода в вышеупомянутых вариантах опытов. Наиболее оптимальными, поэтому, представляются условия культивирования, когда колонии исходных клеток имеют размер порядка  $3 \cdot 10^5$  (например, среда с 3 мг/л лейцина, логарифмическая фаза роста).

Сравним ещё раз моделированные значения УВД ревертантов (рис. 3-5, В, Е). Несмотря на выявленные выше различия, такие распределения имеют сходную форму. Понять причину этого помогает табл. 4 и ряд других данных опытов, приведённых в том же разделе.

Из табл. 4 видно, что существует несколько типов ревертантов, различающихся не только морфологией колоний, но и сроками их выявления. Дальнейшие опыты показали, что ревертанты также различны по стабильности клеток. Нами было замечено, что некоторые ревертанты с повышенной частотой мутирования ещё раз мутируют, образуя фенотип ревертантов, выявляющихся в ранние сроки (наиболее устойчивый по нашим наблюдениям). Принимая во внимание большую нестабильность ревертантов, выявляющихся в более поздние сроки регистрации, вполне возможны ситуации, когда в эти сроки мы регистрируем вместо первичных нестабильных - вторичные стабильные ревертанты. Обычно фенотипы очень стабильных ревертантов нами наблюдались в ранние сроки, но некоторые из них (скорее всего, вторичные ревертанты) встречаются позднее. Менее стабильные фенотипы наблюдаются более, чем на неделю позднее, и есть сроки (15-17 суток), когда выявляются клоны, дающие при повторных посевах также нестабильные линии дрожжей.

Расчётная условная величина УВД, или  $\tau$ , включающая в себя и время генерации, и латентный период клеток, может принимать значения от 2-3 часов до 20 часов, а распределение числа ревертантов на этом интервале имеет характерную форму (рис. 3-5, В, Е). В левой части гистограмм по  $\tau_1$  располагается относительно небольшая однородная группа ревертантов, обладающих высокой стабильностью и потому хорошо выявляющихся во всех вариантах опытов. В правой части расположены группы очень нестабильных ревертантов, выщепляющие такие же нестабильные клоны, а также ревертанты с фенотипами, аналогичными располагающимся правее и левее. Самую большую группу составляют часто мутирующие ревертанты с различной природой реверсий - их окраска варьирует от белой и кремовой до тёмно бурой, что, видимо, отражает особенности синтеза лейцина и жизнеспособность составляющих их клеток. Представляется, что картина реверсии, получаемая с помощью моделирования распределения условного времени генерации  $\tau_1$ , отражает разные способы внутригенной супрессии и уникальна для каждого локуса.

#### Список литературы

1. Захаров И.А., Кожин С.А., Кожина Т.Н., Федорова И.В. Сборник методик по генетике дрожжей-сахаромикетов. Л., Наука, 1984.



2. Корогодина В.Л., Корогодин В.И., Файси Ч. Динамика выявления локусных и супрессорных реверсов при инкубации ауксотрофных по аденину дрожжей на селективной среде. Сообщение ОИЯИ Р19-88-766, Дубна, 1988.

3. Корогодина В.Л., Корогодин В.И., Симонян Н.В., Файси Ч. Влияние состава среды культивирования на частоту спонтанного мутирования дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* - В сб.: Генетическое действие корпускулярных излучений. - ОИЯИ, Дубна, 1989, с. 98-109.

4. Korogodin Y.I., Korogodina V.L., Fajsz Cs., Chepurnoy A.I., Mikhova-Tsenova N., Simonyan N.V. On the dependence of spontaneous mutation rates on the functional state of genes. \\Yeast, 1991, V.7, p. 105 - 117.

5. Корогодина В.Л., Корогодин В.И., Майорова Е.С. Динамика выявления ревертантов у дрожжей, имеющих слабый остаточный рост. Сообщение ОИЯИ Р19-92-74, Дубна, 1992.

6. Чепурной А.И., Михова-Ценова Н., Брунцкова Х. Спонтанное мутирование *leu 2* у *Saccharomices Cerevisiae*. \\ Генетика, 1989, т. 25, с. 1952-1959.

7. Jones E.W. and Fink G.R. Regulation of amino acid and nucleotide biosynthesis in yeast. In Strathern J.N., Jones E.W. and Broach J.R.(eds.): The molecular biology of the yeast *Saccharomyces*. Metabolism and gene expression. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1982, pp.230-239.

8. Kohlhaw G.B. Regulation of leucine biosynthesis in lower eukaryotes. In Herrmann K.M. and Somerville R.L.(eds.): Amino acids biosynthesis and genetic regulation. London-Amsterdam-Ontario-Sidney-Tokio, Addison-Wesley publishing company, 1983, pp.285-300.

Рукопись поступила в издательский отдел  
11 марта 1992 года.