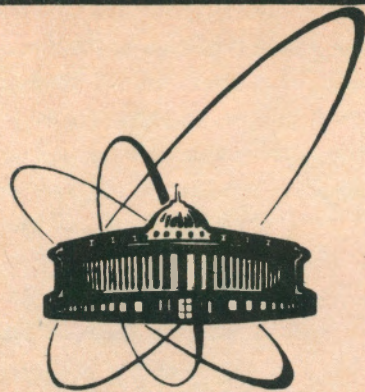


92-198



сообщения
объединенного
института
ядерных
исследований
дубна

P19-92-198

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

МОДЕЛИРОВАНИЕ СПОНТАННОГО
РЕВЕРТИРОВАНИЯ ДЛЯ РАЗНЫХ ГЕНОВ
И УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

1992

Опыты, проведенные с дрожжами-сахаромицетами, несущими мутацию *leu2-1*, показали [1], что время выявления ревертантов по этой мутации зависит, в основном, от двух характеристик: латентного периода и времени деления клеток. Последнее сильно зависит от конкурентноспособности ревертанта и определяет срок выявления колонии в условиях опыта на селективной среде.

Моделирование "условного времени деления" (УВД) клеток (включающего время генерации и латентный период) показало, что ревертанты распределены по этой величине не случайно, а составляют группы, различающиеся морфологией колоний. В целом гистограммы по УВД отражают картину супрессии локуса [2].

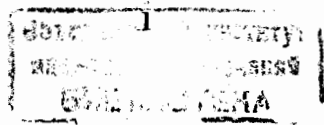
Целью настоящей работы является сравнение такой характеристики для разных типов супрессии, разных локусов и условий культивирования.

Материалы и методы

Штамм гаплоидных дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* НАЗ-24 А (*a leu2-1 lys1-1*) получен от А.И.Чепурного, ОИЯИ. Штамм Р-192 (*a ade2-192*) любезно предоставлен проф. И.А.Захаровым, Петергоф. Если мутации *leu2-1* и *lys1-1* - nonsense, то мутация *ade2-192* является, по всей видимости, missense мутацией [3]. Анализировали ревертанты к прототрофности, по лейцину и по аденину. Они возникают либо за счет мутаций в генах *leu2* и *ade2* (внутригенная супрессия), либо в генах-супрессорах (межгенная супрессия).

Среды использовали полные и минимальные [4]. В опытах со штаммом НАЗ-24 А к минимальной среде в разных опытах добавляли лейцин в концентрациях 3, 30 или 300 мг/л, а также лизин в концентрации 30 мг/л. Среда без лейцина была селективной. В опытах со штаммом Р-192 к минимальной среде добавляли 1, 10 или 100 мг/л аденина. Среда без аденина была селективной.

Культивирование. Дрожжи выращивали на питательных средах на микропористых ядерных фильтрах [5]. После инкубации на исходных средах определяли число клеток в колонии и переносили вместе с фильтрами на селективную среду. Инкубация на селективной среде продолжалась до полного прекращения появления колоний ревертантов, обычно до 14-21 суток. Во время инкубации на селективной среде выявляющиеся колонии ревертантов ("единичные"



и "множественные" [6], достигающие $6 \cdot 10^5$ кл/кол) ежедневно регистрировали, а затем для разделения на внутригенные и межгенные супрессоры проводили фенотипический анализ.

Дифференциация ревертантов. Анализ ревертантов по локусу *leu2-1* проводили по потребности в метаболитах. Для этого их переносили на следующие среды: 1) минимальную среду с лизилом без лейцина; 2) минимальную среду с лейцином без лизина; 3) минимальную среду без лейцина и лизина. Внутригенными (L) считали ревертанты, растущие только на первой среде, а межгенными (S) супрессорными ревертантами - на всех трех средах. Клоны, не растущие на среде без лейцина, из дальнейшего учета исключали.

Анализ ревертантов по локусу *ade2-192* проводили по потребности в аденине и по окраске колоний ревертантов на полной среде с автолизатом [6]. Полагали, что колонии внутригенных ревертантов имеют белую окраску и крупнее, чем за счет межгенной супрессии; колонии в этом случае были розовые. На штамме ДК-769 (*a ade2-192 lys2-5*), полученном А.Б.Девиным (Москва) и Н.А.Колтовой (Дубна), с той же мутацией *ade2-192*, были проведены фенотипический и генетический анализ на принадлежность к первой (L) и второй (S) группам супрессорных реверсий локуса *ade2-192*. Деление по окраске на полной среде колоний ревертантов на внутригенные и межгенные подтвердилось генетическим скринингом на 98% [7].

Статистика. Для каждой группы в опытах со штаммом НАЗ-24 А использовали в среднем по 20 чашек Петри, в каждой из которых было по 220 колоний (посев штампом). Результаты учета возникающих ревертантов нормировали на 20 чашек Петри; эти данные и приводятся ниже. В опытах со штаммом Р-192 для разных вариантов использовали от 30 до 100 чашек Петри для получения примерно 100 штук колоний ревертантов в каждом варианте.

Моделирование

Моделирование проводили по методу Монте-Карло, описание дано в [2]. Условия опытов, положенных в основу моделирования, описаны в [1,8].

Моделировали величину УВД, характеризующую латентный период и время деления клеток ревертантов от момента реверсии до

регистрации колоний ревертанта. Гистограммы этой величины являются суперпозицией гистограмм группы морфологически идентичных ревертантов, видимо, сходных по происхождению [2].

Результаты

Опыты, проведенные со штаммом НАЗ-24 А (*a leu2-1 lys1-1*) по спонтанному ревертированию к прототрофности по лейцину на средах 3, 30 и 300 мг/л лейцина показали отсутствие зависимости частоты мутирования от среды культивирования в пределах недовыявления на богатых средах [1,2].

Частоты ревертирования, определенные в оптимальных условиях опыта (логарифмическая фаза роста культуры, среда культивирования - 3 мг/л лейцина), представлены в табл.1.

Табл.1. Частоты спонтанного ревертирования локуса *leu2-1*

Тип реверсий	Число клеток в колонии	Частота ревертирования
"локусные" L	$3,3 \cdot 10^5$	$6,3 \cdot 10^{-7}$
"супрессорные" S	$3,3 \cdot 10^5$	$1,5 \cdot 10^{-7}$

Гистограммы ревертантов по гену *leu2* и по генам-супрессорам по их условному времени деления даются на рис.1.

Табл.2. Частоты спонтанного ревертирования локуса *ade2-192*

тип реверсии	среда $C_{уд}$ (мг/л)	число клеток в колонии	частота ревертирования
"локусные" L	10	$8,2 \cdot 10^5$	$6,6 \cdot 10^{-10}$
	0	$1,9 \cdot 10^6$	$5,6 \cdot 10^{-8}$
"супрессорные" S	10	$8,2 \cdot 10^5$	$9,4 \cdot 10^{-9}$
	0	$1,9 \cdot 10^6$	$5,8 \cdot 10^{-8}$

Использование моделирования для уточнения результатов определения частот ревертирования, полученных в опытах по изучению спонтанного ревертирования мутанта по локусу *ade2-192* [8], дали величины, зависящие от среды культивирования (табл.2).

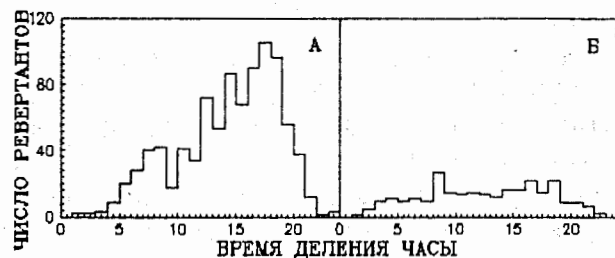


Рис.1. Гистограммы спонтанных ревертантов штамма NA3-24A по локусу *leu2-1*: мутация в гене *leu2* (А) и в генах-супрессорах (Б).

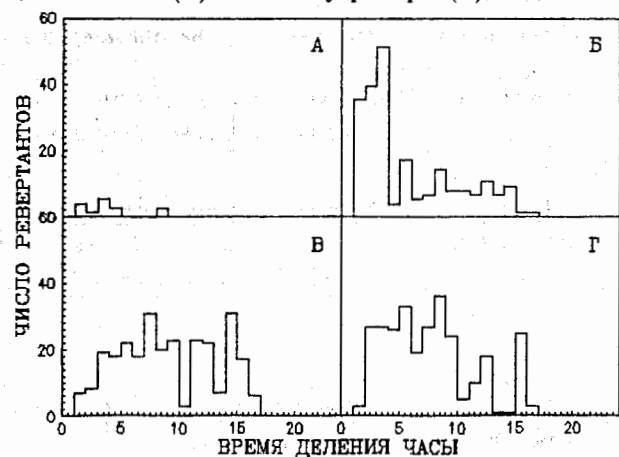


Рис.2. Гистограммы спонтанных ревертантов штамма P-192(a *ade2-192*) в условиях культивирования на среде $C_{ad}=10$ мг/л, логарифмическая фаза роста (А,Б); на среде без аденина (В,Г). Гистограммы ревертирования гена *ade2* (А,В); генов-супрессоров (Б,Г).

Напомним, что у штамма P-192 хорошо выражен остаточный рост на селективной среде, что позволяет регистрировать реверсы, возникающие при размножении клеток на среде без аденина.

Гистограммы ревертантов по гену *ade2* и по генам-супрессорам

для двух сред культивирования ($C_{ad}=0$; $C_{ad}=10$ мг/л) приведены на рис.2.

Обсуждение

Ревертирование дрожжей с мутацией *leu2-1*. Как указывалось выше, все ревертанты были разделены на две группы: "локусные" и "супрессорные". Очевидно, к первым можно отнести, в основном, ревертанты за счет внутригенной супрессии, а ко вторым - межгенной, учитывая, что обе мутации *leu2-1* и *lys1-1* - nonsense. Как указывалось в [2], гистограммы по условному времени деления (УВД) являются суперпозицией групп ревертантов, характеризующихся сходными латентными периодами и временами генерации клеток. Там же было показано, что эти характеристики четко связаны с морфологией колоний ревертантов. Это позволяет предположить, что подобные гистограммы отражают, с точностью до выявления ревертантов, спектр супрессии и ее эффективность для каждого локуса (либо генов-супрессоров и их эффективность).

Анализируя гистограмму (рис.1,А), полученную для внутригенной супрессии, видим, что преобладает фенотип с большой задержкой деления. Такие ревертанты составляют большую долю в валовом мутагенезе. Как показал анализ, проведенный в [2], эта же часть ревертантов является наиболее нестабильной, в сравнении с теми, что лежат в области УВД от 2 до 10 часов.

Гистограмма (рис.1,Б), отражающая межгенную супрессию того же локуса, показывает примерно одинаковую частоту мутирования разных генов-супрессоров. По всей видимости, это гены, супрессоры тРНК [9], т.к. тест на эффективность роста на средах *leu⁻*, *lys⁺* и *leu⁺*, *lys⁻* показал, что более 90% ревертантов растут с равной скоростью размножения на обеих средах.

Как указывалось в [2], различий в наборе ревертантов и частотах ревертирования при культивировании на средах с 3, 30 и 300 мг/л лейцина не наблюдалось (табл.1).

Ревертирование дрожжей с мутацией *ade2-192*. Как предполагается, это мутация missense [3]. Что касается ревертирования в гене *ade2* (рис.2), то частоты возникновения локусных ревертантов различны на среде с аденином (А) и без аденина (В). Они различаются более, чем в 100 раз (табл.2). Такое повышение частоты мутирования гена *ade2* в условиях голодания по аденину объясняется, скорее всего, зависимостью мутирования гена от его функциональной активности [10]. Из-за очень низкой частоты ревертирования ($6.6 \cdot 10^{-10}$)

на среде с аденином и малой статистики трудно сделать вывод о том, соответствуют ли локусы реверсий гена *ade2* на средах с добавкой аденина и без аденина.

Картины межгенной супрессии этого локуса представлены на рис.2 для условий культивирования с аденином (Б) и без аденина (Г). Очевидно, что в данном случае меняется не только частота ревертирования (табл.2), но и набор мутирующих генов-супрессоров. При голодании по аденину наблюдается дисбаланс пулов нуклеотидов [11]. При этом происходит повышение валового мутагенеза, затрагивающего многие гены [12,13]. Это увеличение частоты мутирования касается, очевидно, и генов-супрессоров (рис.2,Г). Это хорошо согласуется с выводами, сделанными в [8].

В обоих исследованных случаях мы наблюдаем и моделируем не прямые мутации, а картину внутригенной и межгенной супрессии. Однако мы можем делать некоторые выводы о локусах супрессии и их эффективности в зависимости от генотипа и условий культивирования. Отсутствие различий в картинах супрессии гена *leu2* на средах с содержанием лейцина 3, 30 и 300 мг/л [1,2], несмотря на зависимость экспрессии гена *leu2* от содержания лейцина в среде [14], а также различий в межгенной супрессии локуса *leu2-1* в тех же условиях заставляет думать о механизмах, влияющих на мутагенез у этого штамма дрожжей в исследованных условиях. Этой причиной могла бы быть мутация nonsense, мешающая транскрипции гена. В случае гена *ade2* мутация missense влияет только на конечный продукт гена. В этом случае мы наблюдаем повышение частоты мутирования гена *ade2* в 100 раз при голодании по аденину, в то время как общий уровень мутагенеза поднялся лишь в 6 раз.

Литература

1. 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.
2. Корогодина В.Л., Корогодин В.И., Майорова Е.С. - Моделирование динамики выявления у дрожжей-сахаромицетов. Сообщение ОИЯИ, Р19-92-105, Дубна, 1992.
3. Сойдла Т.Р., Инге-Вечтомов С.Г. Симаров Б.В. - В сб.: Исследования по генетике. Л.:Изд. ЛГУ, 1967, N 3, с.148.
4. Захаров И.А., Кожин С.А., Кожина Т.Н., Федорова И.В. Сборник методик по генетике дрожжей-сахаромицетов. Л., Наука, 1984.

5. Флеров Г.Н. Синтез сверхтяжелых элементов и применение методов ядерной физики в смежных областях. - Вестник АН СССР, 46, 1984, с.35-48.

6. Корогодин В.И., Абетян Н.О., Брунцкова Х., Джанполадян Н.Л., Корогодина В.Л., Михова-Ценова Н., Симонян Н.В., Файси Ч., Чепурной А.И. Спонтанный мутагенез и условия культивирования клеток. В кн.: "Оптогенез, эволюция, биосфера", М., Наука, 1989, с.60-70.

7. Корогодина В.Л., Колтовая Н.А., Любимова К.А. Корогодин В.И., Файси Ч. Оценка вклада двойных мутантов в регистрируемый спектр реверсов, возникающих у ауксотрофных дрожжей. Сообщение ОИЯИ. Р-19-88-835, Дубна, 1988.

8. Korogodin V.I., Korogodina V.L., Fajsz Cs., Cherpurnoy A.I., Mikhova-Tzenova N., Simonyan N.V. On the dependence of spontaneous mutation rates on the functional state of genes. Yeast, 1991, v.7, p.105-117.

9. Sherman F. Suppression in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. In: The Molecular Biology of the Yeast *Saccharomyces*. Metabolism and Gene Expression. (Eds. J.N.Strathern, E.W.Jones and J.R.Broash). Cold Spring Harbor Laboratory, 1982, pp. 463-485.

10. Korogodin V.I., Korogodina V.L. and Fajsz Cs. Mutability of genes depends on their functional state - a hypothesis. Biol. Zent. bl. 1990, v. 109, pp.447-451.

11. Loeb L.A., Weymouth L.A., Kunkel T.A., Copinathan K.P., Beckman R.A., Dube D.K. On the fidelity of DNA replication. - Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 1978, v. 43, pp. 921-927.

12. Kunz B.A. Genetic effects of deoxyribonucleotide pool imbalances. - Environ. Mut., 1982, v.4, pp. 695-725.

13. Haynes R.H. Molecular mechanisms in genetic stability and change: the role of deoxyribonucleotide pool balance - Genetic consequences of nucleotide pool imbalance, ed. by de Serres F.J. Plenum Publishing Corporation, New York, 1985, pp. 1-23.

14. Andreadis A., Yun-Pung Hsu, Hermodson M., Kohlhow G., and Schimmel P. Yeast *LEU2*. Communication. - J. of Biol. Chemistry, 1984, v.259, pp.8059-8062.

Рукопись поступила в издательский отдел
6 мая 1992 года.