

ОБЪЕДИНЕННЫЙ
ИНСТИТУТ
ЯДЕРНЫХ
ИССЛЕДОВАНИЙ
ДУБНА

19-86-159

П.Н.Лобачевский, В.Б.Мишонова

ВЫЖИВАЕМОСТЬ ДИПЛОИДНЫХ ДРОЖЖЕЙ
ПОСЛЕ γ -ОБЛУЧЕНИЯ:
ГЕНЕТИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ
ЭФФЕКТА ДОРАСТАНИЯ

Направлено в журнал "Радиобиология"

1986

Мутации серии rad, приводящие к повышенной чувствительности к ионизирующему излучению γ , влияют на радиочувствительность как гаплоидных, так и диплоидных дрожжей. В большинстве случаев проявление этих мутаций сильнее выражено у диплоидных (гомозиготных по мутации) клеток, чем у гаплоидных. По данным T. Saeki ^{/2/} отношение D_0 (дикий тип) / D_0 (мутант) для ряда изученных мутаций (rad 5, 6, 18, 50-57) находится в интервале 1,2 - 1,7 для гаплоидных клеток и в интервале 1,9 - 6,2 для диплоидных. По данным В.Г. Петина ^{/3/} этот интервал в случае мутаций rad 50-57 составляет для гаплоидных клеток 1,5 - 2,5, а для диплоидных клеток 1,6 - 7,0. Причем эта разница в проявлении мутаций радиочувствительности у гаплоидных и диплоидных клеток оказывается еще выше, если учесть сигмоидную форму кривой выживания последних. Так, отношение LD_{10} (дикий тип) / LD_{10} (мутант) для диплоидных клеток заключено в интервале (2,7 - 11,2). Для объяснения этих данных в ряде работ ^{/2,4/} выдвигается гипотеза о существовании присущей только диплоидным клеткам так называемой диплоидспецифической репарации повреждений, индуцированных ионизирующим излучением. Мутации радиочувствительности могут блокировать процессы как неспецифической (общей для гаплоидных и диплоидных клеток), так и диплоидспецифической репарации. Это и приводит к более сильному проявлению этих мутаций в случае диплоидных клеток.

Известно, однако, что высокая резистентность диплоидных клеток дикого типа и сигмоидная форма их кривой выживания в существенной мере обусловлены эффектом дорастания ^{/5,6/}. Нельзя исключать, что мутации радиочувствительности могут влиять на этот эффект. В пользу такого предположения свидетельствует и тот факт, что параметры, характеризующие плечо кривой выживания, у радиочувствительных мутантов меньше, чем у клеток дикого типа. Экстраполяционное число кривой выживания клеток дикого типа XS800 равно 3, а для ряда штаммов диплоидных клеток, несущих мутации rad 50-57, составляет от 1,0 до 1,9 ^{/3/}. Поэтому оценка роли диплоидспецифической репарации должна проводиться с учетом возможного влияния мутаций радиочувствительности

на эффект дорастания. Изучение этого влияния и явилось целью настоящей работы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использованы следующие штаммы диплоидных дрожжей: XS 800 (RAD/RAD), XS 1898 (rad 52-1/rad 52-1), XS 1889 (rad 53-1/rad 53-1), T3 (rad 54/rad 54), XS 1935 (rad 55-3/rad 55-3). Характеристики этих штаммов даны в работах ^{/2,9/}.

Корректное определение вклада эффекта дорастания в выживаемость диплоидных клеток после γ -облучения возможно на основе сравнения кривой выживания с дозовой зависимостью доли неповрежденных клеток, или нулевого класса ^{/6/}. В рамках развитых ранее модельных представлений ^{/7,8/} эффект дорастания определяется вероятностью реализации повреждений α , которую можно рассчитать из следующего соотношения:

$$S(D) = \sum_{i=0}^k (1 - \left(\frac{1 - (1 - \alpha)^i}{(1 - \alpha)^i}\right)^2) S_0(D) \frac{(-\ln S_0(D))^i}{i!},$$

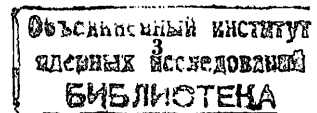
где $S(D)$ - выживаемость, $S_0(D)$ - нулевой класс при дозе D , k - такое целое число, что $(1 - \alpha)^{k+1} \leq 0,5 < (1 - \alpha)^k$.

Подготовку культуры к облучению и определение выживаемости проводили по стандартной методике, описанной ранее ^{/10/}. Для изучения дозовой зависимости нулевого класса использовали метод культивирования облученных клеток в жидкой питательной среде ^{/6/}. В каждой точке дозовой зависимости выживаемость и нулевой класс определяли из одной суспензии облученных клеток, что существенно повышает точность вычисления значения параметра α .

Для подавления быстрого пострадиационного восстановления клетки облучали в поздней G_1 -фазе клеточного цикла ^{/11/}. С этой целью клетки, подготовленные по стандартной методике, перед облучением культивировали 2 часа в жидкой питательной среде при 28°C. Для изучения медленного пострадиационного восстановления облученные клетки перед посевом инкубировали в течение 48 часов в воде при 28°C.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В таблице приведены значения параметров α и k и отношения



D_0/D_0' и LD_{10}/LD_{10}' , рассчитанные по дозовым зависимостям нулевого класса и кривым выживания соответственно. D_0 - доза, уменьшающая нулевой класс в e раз на экспоненциальном участке кривой, а LD_{10} - доза, уменьшающая выживаемость до 10% для клеток дикого типа в стандартных условиях. D_0' и LD_{10}' - соответствующие величины для клеток rad - мутантов и клеток дикого типа при различной степени пострадиационного восстановления.

Таблица. Параметры дозовых кривых выживания и нулевого класса для клеток дикого типа и радиочувствительных мутантов. Для гаплоидов rad 52 - rad 55 приведены литературные данные /1,2,3/. Условия А - при частичном подавлении быстрого восстановления, Б - стандартные условия, В - при завершении медленного восстановления

Мутация радиочувствительности (условия)	Гаплоидные клетки D_0/D_0'	Диплоидные клетки			
		D_0/D_0'	α	k	$\frac{LD_{10}}{LD_{10}'}$
RAD (А)	I	I	$0,152 \pm 0,024$	4	I
RAD (Б)	I	I,6	$0,153 \pm 0,024$	4	I,7
RAD (В)	I	0,5	$0,198 \pm 0,040$	3	0,5
rad 52	2,3	5,0	$0,156 \pm 0,014$	4	5,3
rad 54	I,7	7,4	$0,192 \pm 0,030$	3	9,2
rad 53	I,4	I,4	$0,420 \pm 0,020$	I	2,5
rad 55	I,5	I,6	$0,340 \pm 0,050$	I	2,7

Выбор LD_{10} для характеристики кривой выживания связан с тем, что эта величина характеризует в определенной степени плечо кривой. А эффект дорастания, как известно, вносит существенный вклад в формирование этого плеча. Для характеристики же нулевого класса выбрана величина D_0 , поскольку именно она является адекватным критерием для сравнения с радиочувствительностью гаплоидных клеток.

Мутации rad 52 и rad 54, как видно из сравнения значений параметра α , не влияют на эффект дорастания. Для диплоидных клеток, несущих эти мутации, отношение D_0/D_0' практически не отличается от LD_{10}/LD_{10}' . Можно предполагать, что в этих случаях более сильное

проявление мутаций у диплоидных клеток связано именно с подавлением диплоидспецифической репарации.

У диплоидных клеток, несущих мутации rad 53 и rad 55, вероятность реализации повреждений α существенно выше, чем у клеток дикого типа. Следовательно, эти мутации блокируют процессы, ответственные за эффект дорастания. Особенно наглядно это видно из сравнения значений параметра k . В рамках модельных представлений величина k представляет собой максимальное количество повреждений, при котором клетка еще способна сформировать макроколонию. Для клеток дикого типа и мутантов rad 52/ rad 52 и rad 54/ rad 54 значение параметра k составляет 3 - 4, а для клеток, несущих мутации rad 53 и rad 55, $k = 1$. Подавление эффекта дорастания и приводит к тому, что отношение LD_{10}/LD_{10}' в случае мутаций rad 53 и rad 55 значительно выше, чем D_0/D_0' . С другой стороны, для этих мутаций D_0/D_0' (гаплоид) $\approx D_0/D_0'$ (диплоид). Следовательно, мутации rad 53 и rad 55 не влияют на диплоидспецифическую репарацию. Более сильное проявление этих мутаций в случае диплоидных клеток полностью обусловлено подавлением эффекта дорастания.

Заслуживает внимания тот факт, что корреляции между радиочувствительностью и величиной параметра α не наблюдается. Более того, у наиболее чувствительных мутантов rad 52/ rad 52 и rad 54/ rad 54 эффект дорастания такой же, что и у клеток дикого типа. Это позволяет сделать вывод, что эффект дорастания не зависит от тех процессов, подавление которых приводит к высокой радиочувствительности этих мутантов. Предполагается, что это есть процессы диплоидспецифической репарации повреждений, лежащие в основе пострадиационного восстановления жизнеспособности клеток дикого типа. Поэтому нами проведено изучение эффекта дорастания в условиях, обеспечивающих разную степень пострадиационного восстановления. Результаты этих экспериментов показывают (табл.), что эффект дорастания не зависит от степени как быстрого, так и медленного пострадиационного восстановления.

Таким образом, результаты исследования эффекта дорастания у радиочувствительных мутантов диплоидных дрожжей и у клеток дикого типа в условиях, обеспечивающих разную степень пострадиационного восстановления, позволяют сделать следующие выводы. Процессы реализации повреждений, определяющие эффект дорастания, и процессы диплоидспецифической репарации повреждений представляют собой два взаимно независимых механизма, обеспечивающих высокую резистентность диплоидных клеток к облучению. Более сильное проявление мутаций радиочувствительности у диплоидных клеток обусловлено в

случае мутаций rad 52 и rad 54 подавлением диплоидспецифической репарации повреждений, а в случае мутаций rad 53 и rad 55 - подавлением эффекта дорастания.

ЛИТЕРАТУРА

- I. Game G.S., Mortimer R.K. Mutation Research, 1974, v.24, p.281-292.
2. Saeki T., Machida I., Nakai S. Mutation Research, 1980, v.73, N2, p.251-265.
3. Petin V.G., Kabakova N.M. Mutation Research, 1982, v.82, N2, p. 285-294.
4. Корогодин В.И., Красавин Е.А. Радиобиология, 1982, т.ХХП, вып.6, с.727-738.
5. Капульцевич Ю.Г., Корогодин В.И., Петин В.Г. Радиобиология, 1972, т.ХП, с.267-271.
6. Лобачевский П.Н., Замолдчикова С.Ю. Радиобиология, 1985, т.ХХУ, вып.4, с.483-488.
7. Капульцевич Ю.Г. Радиобиология, 1972, т.ХП, вып.3, с.3-18.
8. Лобачевский П.Н., Замолдчикова С.Ю. Препринт ОИЯИ, Р19-86-38, Дубна, 1986.
9. Захаров И.А., Ковальцова С.В., Марфин С.В. Генетика, 1979, т.ХУ, №1, с.41-48.
- Ю. Глазунов А.В., Лобачевский П.Н., Капульцевич Ю.Г. Радиобиология, 1982, т.ХХП, вып.1, с.54-61.
- II. Frankenberg D., Frankenberg - Schwagen R. Int. Journ.Radiat.Biol., v.39, N6, p.617-631, 1981.

Рукопись поступила в издательский отдел
18 марта 1986 года.

Лобачевский П.Н., Мишонова В.Б.

19-86-159

Выживаемость диплоидных дрожжей после γ -облучения: генетический контроль эффекта дорастания

Исследовано влияние мутаций серии rad, приводящих к повышенной радиочувствительности, на эффект дорастания у диплоидных дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* после γ -облучения. Обнаружено, что наиболее чувствительные к излучению мутанты этой серии rad 52/rad 52 и rad 54/rad 54 практически не отличаются по величине эффекта дорастания от клеток дикого типа. У ряда других мутантов, например rad 53/rad 53 и rad 55/rad 55, эффект дорастания существенно меньше. Установлено также, что эффект дорастания не зависит от степени быстрого и медленного пострадиационного восстановления у клеток дикого типа. Результаты исследования позволяют сделать вывод о взаимной независимости процессов, обуславливающих эффект дорастания, и процессов, лежащих в основе восстановления клеток от лучевых повреждений.

Работа выполнена в Лаборатории ядерных проблем ОИЯИ.

Препринт Объединенного института ядерных исследований. Дубна 1986

Перевод О.С.Виноградовой.

Lobachevsky P.N., Mishonova V.B.

19-86-159

Diploid Yeast Survival after γ -Irradiation: The Genetic Control of Delayed Colony Appearance

The influence of rad mutations leading to increased radiosensitivity on delayed colony appearance (DCA) of diploid yeast *Saccharomyces cerevisiae* exposed to γ -irradiation is investigated. It has been found that the most sensitive mutants rad 52/rad 52 and rad 54/rad 54 have no intrinsic difference in DCA effect compared with wild type cells. The number of other mutants, for example rad 53/rad 53 and rad 55/rad 55, have essentially reduced DCA effect. DCA effect is also found to be not dependent on extent of rapid and liquid holding recovery of wild type cells. The investigation results permit to draw a conclusion about the independence of processes determining the DCA, and the processes forming the basis of cell recovery radiation damages.

The investigation has been performed at the Laboratory of Nuclear Problems, JINR.

Preprint of the Joint Institute for Nuclear Research. Dubna 1986.