

ОБЪЕДИНЕННЫЙ  
ИНСТИТУТ  
ЯДЕРНЫХ  
ИССЛЕДОВАНИЙ  
ДУБНА

P19-85-90

А.В.Глазунов, А.В.Борейко

ВЛИЯНИЕ МУТАЦИИ *rad 54*  
НА СПОСОБНОСТЬ ДРОЖЖЕВЫХ КЛЕТОК  
*Saccharomyces cerevisiae*  
ВОССТАНАВЛИВАТЬСЯ  
ОТ РАДИАЦИОННЫХ И ТЕРМИЧЕСКИХ  
ПОВРЕЖДЕНИЙ

Направлено в журнал "Радиобиология"

1985

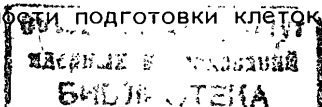
Ранее установлено, что диплоидные клетки *Saccharomyces cerevisiae* способны к "быстрому" пострадиационному восстановлению, которое выявляется при высеве облученных клеток на питательный агар, содержащий повышенные концентрации  $\text{NaCl}^{1,3/}$ , или некоторых солей калия ( $\text{KCl}$ ,  $\text{KNO}_3$ )<sup>4/</sup>. Кроме того, показано, что аналогичный эффект имеет место и для дрожжевых клеток, подвергнутых гипертермической обработке: их выживаемость существенно возрастает при постгипертермическом выдерживании в воде при 28°C перед высевом на твердую питательную среду, содержащую 1,5 М  $\text{KCl}^{5/}$ . Сравнительный анализ двух рассматриваемых феноменов выявил их существенные различия /несмотря на одинаковый способ выявления обоих процессов - высев на "солевую" среду/: так, например, гаплоидные клетки *Sacch. cerevisiae* в стационарной фазе роста культуры и диплоидный мутант, гомозиготный по локусу *rad 52*, способны к эффективному постгипертермическому восстановлению<sup>5/</sup>, тогда как "быстрое" пострадиационное восстановление у них практически полностью подавлено<sup>1,2/</sup>.

В данной работе использован диплоидный мутант *Sacch. cerevisiae*, гомозиготный по локусу *rad 54* - один из самых чувствительных к ионизирующему излучению мутантов подобного типа /в серии *rad 50-rad 57*), описанных в литературе<sup>6/</sup>. В связи с этим было интересно проверить эти клетки на способность к "быстрому" пострадиационному восстановлению, которое, как мы предполагаем, в значительной степени определяет радиорезистентность диплоидных дрожжей. Кроме того, показано, что одна из мутаций в локусе *rad 54* является температурочувствительной, то есть выживаемость облученных клеток, выращенных при перmissive температуре 23°C, существенно превышает соответствующую величину для клеток, выращенных при 36 °C<sup>7/</sup>. Поэтому представлялось существенным исследовать способность указанных мутантов к восстановлению после гипертермической обработки и после совместного действия гипертермии и радиации.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Были использованы диплоидные штаммы дрожжей *Sacch. cerevisiae* Т1 (+/+) и Т3 (*rad 54/rad 54*)<sup>8/</sup>.

Дрожжи культивировали на твердой питательной среде YEPD /пептон - 10 г/л, дрожжевой экстракт - 5 г/л, глюкоза - 20 г/л, агар-агар - 20 г/л/ в течение 5 сут при 28°C /стационарная фаза роста культуры/. Особенности подготовки клеток к облучению



и гипертермической обработке описаны в <sup>1,5/</sup>. Последовательную обработку клеток гипертермией /50±0,1°C/ и радиацией /γ-кванты <sup>137</sup>Cs - мощность дозы ~35 Гр/мин/ проводили по методике, изложенной в <sup>9/</sup>. Клетки облучали при 0°C.

После обработки гипертермией и/или радиацией клеточные суспензии либо выдерживали в течение определенного времени в воде или в жидкой питательной среде YEPD при 28°C, либо сразу разводили водой /при 0-2°C / и рассеивали в чашки Петри на стандартную (YEPD) или солевую (YEPD, содержащую 1 М KNO<sub>3</sub> или 1,5 М KNO<sub>3</sub>) среды. Выживаемость определяли методом подсчета макроколоний, вырастающих через 5-8 сут при 28°C. Выживаемость контроля на солевой среде /если это не оговорено особо/ составляла 70-100% по сравнению с клетками, высеянными на стандартную среду. Ошибка в определении выживаемости обычно не превышала 10%.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

На рис.1 приведены кривые зависимости выживаемости облученных /γ-кванты <sup>137</sup>Cs, 700 Гр/ диплоидных клеток *Sacch.cerevisiae* T1 /"дикий" тип/ от времени выдерживания в воде или жидкой питательной среде при 28°C перед высевом на твердый питательный агар, содержащий 1,5 М KNO<sub>3</sub>.

Видно, что выдерживание облученных клеток в воде при 28°C перед высевом на солевую среду приводит к значительному увеличению их выживаемости /кривая 1/. Однако заметим, что кривая достигает плато приблизительно через 1,5-2 ч выдерживания, тогда как для штаммов, использованных ранее <sup>1-3/</sup>, быстрое восстановление завершалось за 30-40 мин. Выдерживание облученных клеток в жидкой питательной среде перед высевом /кривая 2/ увеличивает скорость пострadiационного восстановления, которая в данном случае приблизительно соответствует величине, наблюдаемой у других

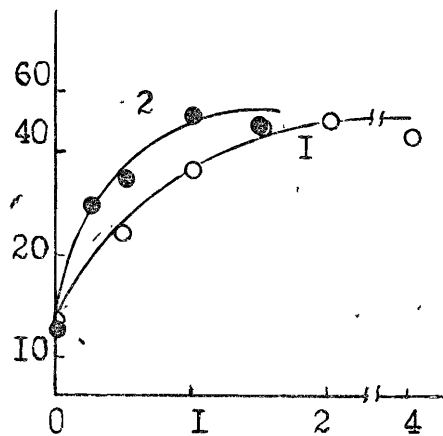


Рис.1. Кривые выживаемости диплоидных дрожжей *Sacch. cerevisiae* T1, облученных γ-квантами <sup>137</sup>Cs в дозе 700 Гр, в зависимости от времени пострadiационного выдерживания при 28°C в воде /1/ и жидкой питательной среде YEPD (2). По оси абсцисс - время, ч; по оси ординат - выживаемость, %.

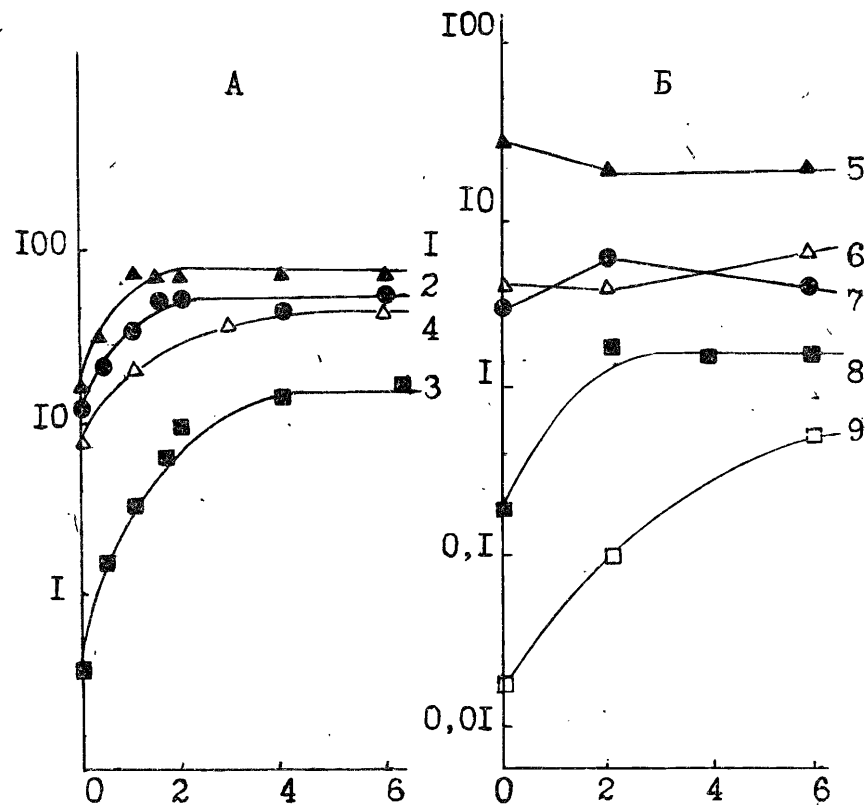


Рис.2. Кривые выживаемости диплоидных дрожжей *Sacch. cerevisiae* штаммов T1/A/ и T3/B/, подвергнутых воздействию гипертермии /50°C/ и/или радиации /γ-кванты <sup>137</sup>Cs / в зависимости от времени выдерживания в воде при 28°C. 1,4,5,6 - гипертермическая обработка /50°C/ в течение 5, 10, 4 и 7 мин соответственно; 2,7 - γ-облучение в дозе 700 и 70 Гр соответственно; 3,8,9 - последовательная обработка гипертермией и радиацией /3 - 50°C, 5 мин, 700 Гр; 8 - 50°C, 4 мин, 70 Гр; 9 - 50°C, 7 мин, 70 Гр/. По оси абсцисс - время, ч; по оси ординат - выживаемость, %/.

штаммов диплоидных дрожжей <sup>1-3/</sup>. Таким образом, особенностью "быстрого" пострadiационного восстановления у дрожжевых клеток штамма T1 является зависимость скорости /но не эффективности!/ этого процесса от состава питательной среды, в которой выдерживаются облученные клетки перед высевом на солевую среду, тогда как для диплоидных дрожжей 28-73-1B такую зависимость не наблюдали.

Выдерживание клеток, подвергнутых гипертермической обработке /50°C /, в воде при 28°C перед высевом на солевую среду, содержащую 1 М или 1,5 М KNO<sub>3</sub> /кривые 4 и 1, рис.2А/, также приводит к значительному увеличению выживаемости, что свидетельствует о наличии у используемого штамма диплоидных дрожжей эффективно-го постгипертермического восстановления.

Следует обратить внимание на то, что здесь в качестве солевой используется среда, содержащая в качестве добавки KNO<sub>3</sub>, тогда как в предыдущих работах /5,9/ мы использовали KCl. Таким образом, эта соль калия также ингибирует процесс восстановления клеток от термических повреждений /как, впрочем, и пострадиационное восстановление/.

В параллельном опыте изучали восстановление клеток штамма Т1, подвергнутых последовательной обработке гипертермией /50°C, 5 мин/ и радиацией /700 Гр/. Видно, что выживаемость таких клеток возрастает по мере выдерживания их в воде при 28°C перед высевом на солевую (1,5М KNO<sub>3</sub>) среду /кривая 3, рис.2А/. Аналогично данным, полученным в /9/, здесь имеет место синергическое взаимодействие инактивирующих факторов при немедленном высеве обработанных клеток на солевую среду, то есть  $S_{ty} < S_t S_y$ , где  $S_{ty}$ ,  $S_t$ ,  $S_y$  - выживаемость клеток после совместной обработки, гипертермической обработки и  $\gamma$ -облучения соответственно.

Синергический эффект уменьшается при выдерживании клеток в воде в течение 4-6 ч при 28°C перед высевом на солевую среду, о чем свидетельствует уменьшение коэффициента синергического взаимодействия /КСВ/, определяемого здесь как  $S_t S_y / S_{ty}$  /см. таблицу/.

Опыты, аналогичные тем, результаты которых приведены выше, были проделаны с диплоидными клетками Sacch.cerevisiae Т3, несущими мутацию в локусе rad 54 в гомозиготном состоянии /рис.2Б/: Клетки подвергали гипертермической обработке /50°C, 4 и 7 мин/ и/или  $\gamma$ -облучению /70 Гр/, после чего выдерживали их в течение разных интервалов времени в воде при 28°C перед высевом на питательный агар, содержащий 1 М KNO<sub>3</sub>. Как видно, выдерживание как облученных /кривая 7/, так и перегретых /кривая 5 - обработка 4 мин; кривая 6 - обработка 7 мин/ клеток не приводит к сколь-нибудь значительному изменению выживаемости на солевой среде. Обратим внимание на то, что клетки Т3 высевали на солевую среду, содержащую меньшие концентрации KNO<sub>3</sub>, чем клетки "дикого" типа. Повышение концентрации KNO<sub>3</sub> в среде приводит к значительной гибели мутантных клеток. Тем не менее, можно предположить, что использованная концентрация соли недостаточна для подавления как пострадиационного, так и постгипертермического восстановления мутантных клеток. Для проверки этого предположения мы высеяли облученные в дозе 70 Гр клетки штамма Т3 на питательный агар, содержащий 1,5 М KNO<sub>3</sub>, сразу или после 1-часового выдерживания при 28°C в воде и в жидкой питательной среде при 28°C. Выживаемость составила 1,7±0,2;

Таблица

Коэффициент синергического взаимодействия в зависимости от времени выдерживания клеток в воде при 28°C /пояснения в тексте/

Режим обработки	T1	T3	
	t5y20 *	t4y2	t7y2
Время выдерживания, ч			
0	6 +2	4 + 1	5 + 1
1	9 +3		
1,5	6 +2		
2	3 +1	1**	1**
4	2 +1		
6	3 +1	1**	1**

\*t5y20 - последовательная обработка гипертермией /50°C, 5 мин/ и радиацией /20 мин при мощности дозы ~35 Гр/;

\*\* Величины  $S_{ty}$  и  $S_t S_y$  достоверно не различаются.

1,7±0,2; 2,4±0,2% соответственно, причем выживаемость необлученных клеток на такой среде составила около 30% по сравнению с клетками, высеянными на стандартную среду. Что касается постгипертермического восстановления, то, как отмечено выше, питательная среда, содержащая 1 М KNO<sub>3</sub>, достаточно эффективно подавляет этот процесс у клеток "дикого" типа /кривая 4, рис.2А/. Поэтому представляется маловероятным, чтобы указанная концентрация соли была недостаточна для подавления постгипертермического восстановления мутантных клеток.

Таким образом, мы имеем серьезные основания утверждать, что мутация rad 54 подавляет как "быстрое" пострадиационное, так и постгипертермическое восстановление диплоидных дрожжей.

Весьма любопытные результаты дали опыты по совместному воздействию гипертермии и радиации на клетки штамма Т3. При немедленном высеве на солевую среду последовательно обработанных гипертермией /50°C / и радиацией клеток наблюдали значительное синергическое взаимодействие рассматриваемых инактивирующих факторов /см. таблицу/. В результате выдерживания этих клеток в воде при 28°C их выживаемость значительно возрастает /кривые 8 и 9, рис.2Б/, причем синергическое взаимодействие гипертермии и радиации практически исчезает: после 6-часового выдерживания

КСВ = 1 /таблица/. Отметим, что в работе /9/ и здесь для клеток "дикого" типа /таблица/ мы наблюдали уменьшение синергического взаимодействия гипертермии и радиации в результате выдерживания обработанных клеток в воде при 28°C. Однако это уменьшение происходит на фоне значительного увеличения выживаемости за счет пострadiационного и постгипертермического восстановления клеток. Здесь ситуация иная, так как для клеток штамма ТЗ отсутствует как пострadiационное /кривая 7, рис. 2Б/, так и постгипертермическое /кривые 5 и 6, рис. 2Б/ восстановление, но имеет место значительное увеличение выживаемости после совместного воздействия гипертермии и радиации в результате выдерживания в воде при 28°C /кривые 8 и 9, рис. 2Б/.

#### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Таким образом, в представленной работе продемонстрировано, что мутация rad 54 блокирует как "быстрое" пострadiационное, так и постгипертермическое восстановление диплоидных клеток *Sacch. cerevisiae*, что может свидетельствовать о существовании общих этапов на пути репарации термических и радиационных повреждений.

Интересными оказались данные по совместному последовательному действию гипертермии и радиации на клетки штамма ТЗ, гомозиготного по мутации rad 54. Действительно, выживаемость этих клеток, последовательно обработанных гипертермией и радиацией, возрастает по мере их выдерживания в воде при 28°C перед высевом на солевую питательную среду, в то время как соответствующая величина для этих же клеток, подвергнутых воздействию каждого из факторов в отдельности, в данных условиях остается постоянной.

Может быть ряд причин, обуславливающих это явление. Так, например, возможна индукция восстановления одним из факторов от повреждений, вызванных другим. Однако в этом случае следовало бы ожидать аддитивного взаимодействия гипертермии и радиации при немедленном после обработки высеве клеток /КСВ=1/, а по мере выдерживания клеток в воде при 28°C величина  $S_{ty}$  должна превышать  $S_t \times S_y / КСВ < 1 /$  /за счет индуцированного восстановления/, чего не наблюдается /таблица/. На наш взгляд, наиболее привлекательным в данном случае является предположение, высказанное ранее /9/, о восстановлении дрожжевых клеток от дополнительных  $t_y$ -повреждений, образующихся в результате комбинированного воздействия гипертермии и радиации /тогда в нашем случае мутация rad 54/ блокирует восстановление от термических и радиационных повреждений, но не от  $t_y$ -повреждений!/.

Авторы выражают благодарность профессору И.А.Захарову за предоставление штаммов и профессору В.И.Корогодину за обсуждение результатов нашей работы.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Глазунов А.В., Капутьцевич Ю.Г. Радиобиология, 1982, т. 22, вып.1, с. 62-69.
2. Глазунов А.В., Капутьцевич Ю.Г. Радиобиология, 1982, т. 22, вып.5, с. 633-636.
3. Глазунов А.В., Капутьцевич Ю.Г. Радиобиология, 1983, т.23, вып. 3, с. 344-348.
4. Борейко А.В., Насонова Е.А., Глазунов А.В. Радиобиология, 1984, т. 24, вып. 4, с. 543-545.
5. Глазунов А.В., Борейко А.В. Цитология, 1985, т. 27, №1, с. 88-93.
6. Saeki T., Mashida Y., Nakai S. Mutation Research, 1980, vol. 72, No 2, p. 251-265.
7. Budd M., Mortimer R.K. Mutation Research, 1982, vol.103, p.19-24.
8. Захаров И.А., Ковальцова С.В., Марфин С.В. Генетика, 1979, т. 15, №1, с. 41-48.
9. Глазунов А.В., Борейко А.В. Радиобиология, 1985, т. 25, вып.1, с. 37-42.

Рукопись поступила в издательский отдел  
11 февраля 1985 года.