

ОБЪЕДИНЕННЫЙ
ИНСТИТУТ
ЯДЕРНЫХ
ИССЛЕДОВАНИЙ
ДУБНА

P19-88-671

А.В.Глазунов, А.В.Борейко

ЗАКОНОМЕРНОСТИ
ПОСТГИПЕРТЕРМИЧЕСКОГО ВОССТАНОВЛЕНИЯ
У ГАПЛОИДНЫХ И ДИПЛОИДНЫХ ДРОЖЖЕЙ
SACCHAROMYCES CEREVISIAE
И **PICNIA PINUS**

Направлено в журнал "Цитология"

1988

Известно, что дрожжевые клетки разных видов и генотипов значительно отличаются по чувствительности к воздействию гипертермической обработки^{/1,2/}. Причины этих различий неясны. С другой стороны, для дрожжевых клеток *Saccharomyces cerevisiae* в логарифмической фазе роста культуры была показана способность восстанавливаться от термических повреждений при выдерживании в непитательной среде^{/3/}, которая, как можно было предполагать, обуславливает различную терморезистентность клеток. Однако этот эффект не удается воспроизвести на других штаммах дрожжей^{/4,5/}. Ранее нами было доложено об обнаружении у дрожжей постгипертермического восстановления, выявляемого при высеве клеток, подвергнутых гипертермической обработке /50° С/, на твердую питательную среду, содержащую 1,5 М КСl^{/6/} или КNO₃^{/7/}: выживаемость таких клеток существенно возрастает при выдерживании их в воде при 28° С. В предыдущей работе^{/8/} приведены аргументы в пользу того, что субстратом этого восстановления служат не солеспецифические термические повреждения /т.е. вызывающие летальный эффект только в присутствии высокой концентрации соли/, но повреждения, от которых клетка гибнет и при высеве на стандартную питательную среду. Для предположения о роли постгипертермического восстановления как фактора, в значительной мере определяющего чувствительность клеток к гипертермии, имелись некоторые основания: так, диплоидный мутант, гомозиготный по *gad 54*, обладающий повышенной чувствительностью к гипертермии, как оказалось, не способен к постгипертермическому восстановлению^{/7/}. В данной работе проведены дальнейшие исследования закономерностей постгипертермического восстановления у дрожжей разных видов и генотипов с целью выяснить, в какой мере этот процесс ответствен за различную термочувствительность клеток.

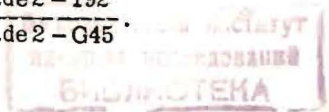
МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использованы следующие штаммы дрожжей:

1. *Saccharomyces cerevisiae* 28-73-2A /гаплоид/ и 28-73-1B /диплоид/. Штаммы полностью изогенны, за исключением различий в локусе типа спаривания^{/8/}.

2. *Saccharomyces cerevisiae* 197/2 /гаплоид/ *a ade2* и

ПГ-154 /диплоид/ $\frac{a}{a} \frac{ade2-192}{ade2-G45}$.



3. *Pichia pinus*: МН⁴ /гаплоид/ и МН⁴Д /диплоид/. Штаммы изогенны за исключением различий в локусе типа спаривания.

Клетки *S. cerevisiae* выращивали на твердой полноценной питательной среде YEPD при 28° С в течение 3 суток /стационарная фаза роста культуры/. Клетки *P. pinus* выращивали на твердой минимальной среде /YNB (Difco) с добавлением 2% глюкозы/ в течение 3 суток при 28° С. Далее клетки ресуспендировали в воде и центрифугировали в градиенте сахарозы /40-60% для *S. cerevisiae* и 20-40% для *P. pinus*/ в горизонтальном роторе при 1000g при комнатной температуре в течение 15 мин, после чего отбирали фракцию одиночных клеток, несколько раз промывая клетки водой. Для получения логарифмической фазы роста клеток *P. pinus* их выращивали в течение 12 ч. в жидкой минимальной среде при 28° С в колбах с азрацией, затем центрифугировали в линейном градиенте сахарозы /20-40%/ методом, описанным выше, и отбирали со дна градиента фракцию почкующихся клеток. Полученная суспензия содержала 70-90% клеток с почками средних и меньших размеров.

Гипертермической обработке подвергали водную суспензию клеток /2x10⁶ клеток/мл/ по методике, изложенной нами ранее /6,7/. Суспензию клеток разводили водой при 0° С и рассеивали в чашки Петри со средой YEPD /стандартная/ и YEPD, содержащей 1,5 М KCl /солевая среда/. Выживаемость клеток определяли, подсчитывая число макроколоний, выросших через 5-7 сут. при 28° С.

Ошибку выживаемости определяли следующим способом /9/:

$$\frac{\Delta S}{S} = \frac{\sigma_{\bar{x}}}{\bar{x}} + \frac{\Delta L}{L},$$

где $\sigma_{\bar{x}}$ - дисперсия распределения числа выживших клеток по чашкам; \bar{x} - среднее число выживших клеток на чашке; $\Delta L/L$ - относительная ошибка разведения клеточных суспензий.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Как было показано, эффект, аналогичный обсуждаемому постгипертермическому восстановлению, имеет место и после облучения ионизирующей радиацией /быстрое пострадиационное восстановление/: выживаемость облученных клеток возрастает при выдерживании в воде при 28° С перед высевом на твердую питательную среду, содержащую 1,5 М NaCl /10/ или KCl /11/. Установлено, что субстратом для пострадиационного и постгипертермического восстановления служат разные повреждения /6/. Так, если в первом случае речь идет о радиационных повреждениях

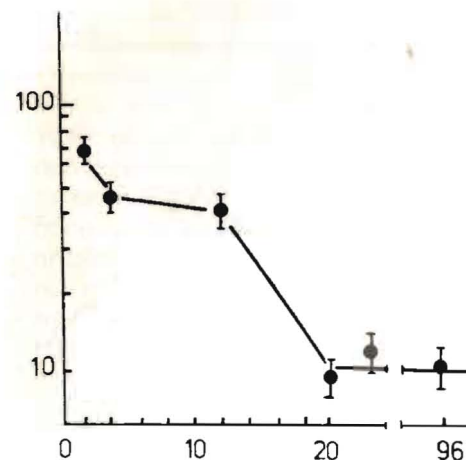


Рис. 1. Выживаемость диплоидных дрожжей штамма 28-73-1В, подвергнутых гипертермической обработке /50° С, 5 мин/, в зависимости от времени выдерживания на солевой среде. По оси абсцисс - время, ч; по оси ординат - выживаемость, %.

ДНК /а именно: двунитевых разрывах ДНК /12/, то во втором, по-видимому, восстанавливаются другие клеточные структуры /например, это могут быть ферменты, мембраны, аппарат белкового синтеза и пр./.

Лучевые повреждения, элиминируемые в процессе быстрого восстановления, фиксируются /т.е. становятся необратимыми/ в результате первого пострадиационного деления клетки /13/. В связи с этим интересно было выяснить характер фиксации термических повреждений, являющихся субстратом постгипертермического восстановления.

На рис. 1 приведены результаты следующего опыта. Клетки штамма 28-73-1В, подвергнутые гипертермической обработке /50° С, 5 мин/, рассеивали на плотную солевую среду, покрытую бумажным фильтром, инкубировали при 28° С, и через различные промежутки времени фильтры с клетками переносили на стандартную среду для формирования макроколоний.

Как видно, после незначительного снижения выживаемости в первые 2 ч выдерживания, по-видимому, не связанного с фиксацией лучевых повреждений, выживаемость выходит на плато /38-45%/ и далее убывает, достигая к 20-23 ч выдерживания на солевой среде постоянного значения /10-12%/. Эти величины хорошо согласуются со значениями выживаемости клеток, подвергнутых гипертермической обработке и либо высеванных на солевую среду /8,8 ± 0,9%/ сразу, либо после 6-часового выдерживания в воде при 28° С, достаточного для завершения постгипертермического восстановления /45 ± 5%/. За 20 ч выдерживания на солевой среде доля почкующихся клеток практически не изменялась и составляла величину, близкую к таковой для исходной культуры /~3-4%/. Таким образом, фиксация термических повреждений на солевой среде происходит в течение 10-20 ч после гипертермической обработки, в результате чего они становятся необратимыми. Эта фиксация не связана, как в случае облучения, с де-

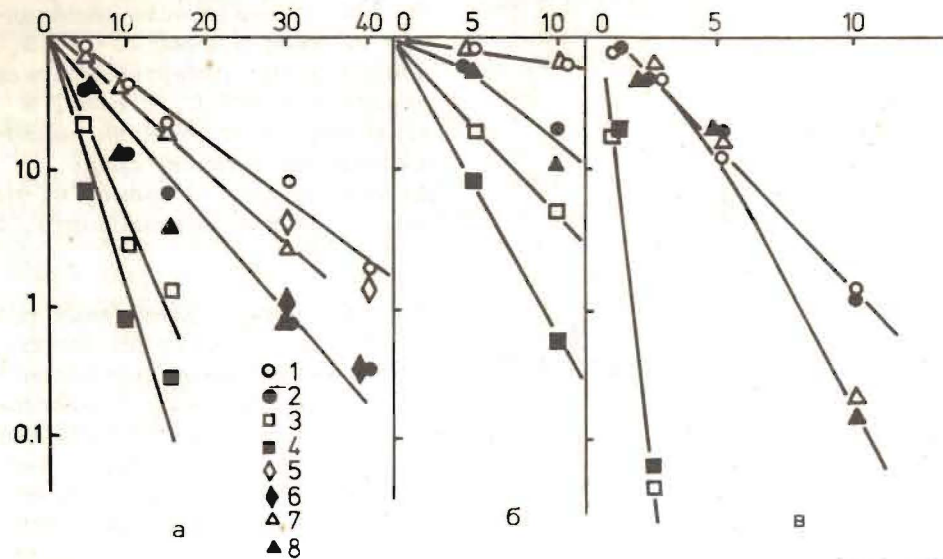


Рис. 2. Кривые выживания гаплоидных и диплоидных клеток *S. cerevisiae* /а, б/ и *P. pinus* /в/ после гипертермической обработки /50° С для *S. cerevisiae* и 47° С для *P. pinus*/. Светлые символы - гаплоиды, темные символы - диплоиды. 1, 2, 3, 4 - высев на питательную среду сразу после гипертермической обработки; 5, 6, 7, 8 - высев после выдерживания в воде при 28° С в течение 6 ч; 1, 2, 5, 6 - высев на стандартную среду; 3, 4, 7, 8 - высев на солевую. а - штаммы 28-73-2А и 28-73-1В, б - штаммы 197/2 и ПГ-154, в - штаммы МН4 и МН4Д. По оси абсцисс - время гипертермической обработки, мин; по оси ординат - выживаемость, %.

лением клетки после гипертермической обработки, что подчеркивает разную природу радиационных и термических повреждений.

В следующих опытах использовались штаммы дрожжей *S. cerevisiae* и *P. pinus*, существенно отличающиеся по чувствительности к гипертермической обработке. В связи с этим было интересно выяснить, отличаются ли данные штаммы по эффективности постгипертермического восстановления.

На рис. 2 представлены кривые выживания гаплоидных и диплоидных клеток *S. cerevisiae* /а, б/ и *P. pinus* /в/ после гипертермической обработки /50° С для *S. cerevisiae* и 47° С для *P. pinus*/. Для каждого вида дрожжей приведены данные параллельных опытов. Клетки, подвергнутые гипертермической обработке, рассевали на стандартную и солевую среды. Как видно,

при высеве клеток *S. cerevisiae* на стандартную среду гаплоидные клетки существенно резистентнее к гипертермии, нежели диплоидные: фактор изменения дозы /ФИД_{10%}/ на уровне выживаемости $S = 10\%$ равен примерно 2. Использование ФИД как показателя различий в термочувствительности и эффективности постгипертермического восстановления здесь оправдано тем, что до уровня выживаемости порядка 1% кривые выживания близки к экспоненциальным. Тот факт, что терморезистентность изогенных диплоидных клеток ниже соответствующей величины для гаплоидных, противоречит известным ранее данным Вуда¹¹, который показал, что диплоиды обладают более высокой резистентностью к гипертермической обработке, нежели гаплоиды, с одной стороны, и данным Петина и Жураковской¹⁴, продемонстрировавших независимость терморезистентности от пloidности клеток, - с другой. Причины этих расхождений неясны. Отметим, что, в отличие от авторов указанных работ, мы использовали полностью изогенные линии гаплоидных и диплоидных дрожжей, поэтому не исключено, что другое соотношение термочувствительностей, полученное в цитируемых статьях, могло быть вызвано гетерозиготностью диплоидных клеток. Взятая нами другая пара гаплоидных и диплоидных клеток *S. cerevisiae* также обнаружила повышенную устойчивость к гипертермии гаплоидов по сравнению с диплоидами /рис. 2б/. При этом эффективность постгипертермического восстановления у гаплоидов и диплоидов *S. cerevisiae* /28-73-2А и 28-73-1В/ примерно одинакова: ФИД составляет соответственно $3,0 \pm 0,8$ и $2,9 \pm 0,8$. Аналогичная ситуация имеет место и для другой пары гаплоидных и диплоидных клеток *S. cerevisiae* /рис. 2б/. Таким образом, различия в терморезистентности гаплоидных и диплоидных клеток *S. cerevisiae*, по-видимому, не связаны с их способностью восстанавливаться от термических повреждений.

Для изогенных штаммов дрожжей *P. pinus* /рис. 2а/ терморезистентность гаплоидов /МН4/ и диплоидов /МН4Д/ примерно одинакова при высеве клеток на стандартную среду. При этом эффективность постгипертермического восстановления для клеток обеих пloidностей приблизительно совпадает /ФИД_{10%} = $4,2 \pm 1,2$ /. На рис. 3 приведена кинетика постгипертермического восстановления диплоидных клеток *P. pinus*: как и в случае *S. cerevisiae* /8,7/, процесс завершается за 4-6 ч выдерживания клеток в воде при 28° С перед высевом на солевую среду. Причем высев клеток на стандартную среду /рис. 3, кривая 1/ не позволяет выявить восстановление этого типа.

Вообще заметим, что клетки *S. cerevisiae* существенно превосходят *P. pinus* по устойчивости к гипертермии /D₀ для диплоидов двух видов дрожжей различаются примерно на порядок

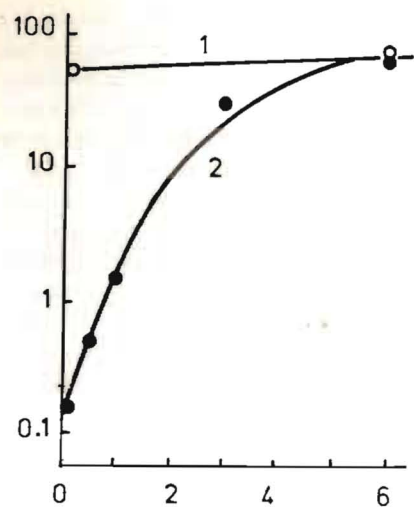


Рис. 3. Выживаемость диплоидных клеток *P. pinus* штамма МН4Д, подвергнутых гипертермической обработке /47° С, 2,5 мин/ в зависимости от времени выдерживания в воде перед высевом на стандартную /1/ или солевую /2/ среды. По оси абсцисс — время, ч; по оси ординат — выживаемость, %.

при обработке температурой 50°С/. Тем не менее, эффективности постгипертермического восстановления /если судить по ФИД/ отличаются незначительно. Представленные данные делают правомерным вывод о том, что способность дрожжевых клеток в стационарной

фазе роста культуры к постгипертермическому восстановлению не является фактором, определяющим различия в их термочувствительности.

В следующих опытах проверена способность дрожжевых клеток к постгипертермическому восстановлению в логарифмической фазе роста культуры. Как видно из таблицы, при высеве на стандартную среду диплоидные клетки *P. pinus* в логарифмической фазе роста более чувствительны к гипертермии /47° С/, нежели в стационарной. Повышенная термочувствительность клеток *S. cerevisiae* в логарифмической фазе роста /по сравнению с клетками в стационарной фазе/ показана ранее^{15/}. Оказалось, что клетки *P. pinus* в логарифмической фазе роста практически неспособны к постгипертермическому восстановлению, в то время как у тех же клеток, но в стационарной фазе, оно весьма эффективно /см. таблицу/. Таким образом, повышенная термочувствительность клеток в логарифмической фазе роста коррелирует с отсутствием у них постгипертермического восстановления.

В заключение кратко перечислим основные выводы работы. Постгипертермическое восстановление дрожжевых клеток не является фактором, определяющим различия в терморезистентности гаплоидных и диплоидных клеток *S. cerevisiae*, а также клеток *S. cerevisiae* и *P. pinus* в стационарной фазе роста культуры. В то же время повышенная термочувствительность клеток *P. pinus* в логарифмической фазе роста /по сравнению с клетками в стационарной фазе/ в значительной мере определяется способностью к постги-

Таблица
Постгипертермическое восстановление дрожжевых клеток *Pichia pinus* МН4Д в стационарной и логарифмической фазах роста культуры

Фаза роста культуры	Время гипертермической обработки /50° С/, мин	Выживаемость, %			
		Немедленный высеv		Высеv после выдерживания 5 ч в воде при 28° С	
		Стандартная среда	Солевая среда	Стандартная среда	Солевая среда
Стационарная	2,5	14 ± 3	0,11 ± 0,02	19 ± 3	8 ± 2
	5	1,3 ± 0,3	0,010 ± 0,005	1,6 ± 0,2	0,5 ± 0,2
Логарифмическая	2,5	0,14 ± 0,03	0,10 ± 0,02	0,20 ± 0,03	0,20 ± 0,04
	5	0,04 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,05 ± 0,01

пертермическому восстановлению. Гаплоидные клетки *S. cerevisiae* более устойчивы к гипертермии по сравнению с диплоидными, тогда как для дрожжей *P. pinus* термочувствительности гаплоидов и диплоидов не различаются. Термические повреждения, служащие субстратом для постгипертермического восстановления, фиксируются на солевой среде в течение 10-20 ч после гипертермической обработки. Эта фиксация не связана с делением клетки после гипертермической обработки.

ЛИТЕРАТУРА

1. Wood T.H. - Adv. in Biol. and Med. Phys., 1956, p.119.
2. Петин В.Г. Генетический контроль радиочувствительности клеток. М.: Энергоатомиздат, 1987.
3. Schenberg-Frascino A - Mol. Gen. Genet., 1972, v.117, p.239.
4. Patrick N.H., Haynes R.H., Uretz R.B. - Radiat. Res., 1964, v.21, p.144.
5. Reddy N.M.S. et al - Int.J.Rad.Biol., 1983, v.43, No.4, p.465.
6. Глазунов А.В., Борейко А.В. - Цитология, 1985, т.27, №1, с.88.

7. Глазунов А.В., Борейко А.В. - Радиобиология, 1985, т.25, №5, с.612.
8. Наумов Г.И., Толсторуков И.И. - Генетика, 1972, т.8, №3, с.95.
9. Тейлор Д. Введение в теорию ошибок. М.: Мир, 1985.
10. Глазунов А.В., Капильцевич Ю.Г. - Радиобиология, 1982, т.22, №1, с.62.
11. Борейко А.В., Насонова Е.А., Глазунов А.В. - Радиобиология, 1984, т.24, №4, с.543.
12. Глазунов А.В., Глазер В.М. - Молекулярная генетика, микробиология и вирусология, 1988, №8, с.36.
13. Глазунов А.В., Борейко А.В., Эссер А.Х. - Генетика, 1988, т.24, №3, с.428.
14. Петин В.Г., Жураковская Г.П. В кн.: Радиация и организм. Обнинск: Изд-во НИИ мед. радиологии АМН СССР, 1978, с.25.
15. Schenberg-Frascino A., Moustacchi E. - Mol. Gen. Genet., 1972, v.115, p.243.

Рукопись поступила в издательский отдел
9 сентября 1988 года.

Глазунов А.В., Борейко А.В. P19-88-671
Закономерности постгипертермического восстановления у гаплоидных и диплоидных дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* и *Pichia pinus*

Изогенные диплоидные клетки *Saccharomyces cerevisiae* более чувствительны к гипертермической обработке /50° C/ по сравнению с гаплоидными, причем эффективность постгипертермического восстановления у этих клеток одинакова. Для дрожжей *Pichia pinus* терморезистентность гаплоидов и диплоидов примерно одинакова, при этом эффективность постгипертермического восстановления для клеток обеих плоидностей также не различается. Сделан вывод о том, что постгипертермическое восстановление не является фактором, обуславливающим различную термочувствительность клеток в стационарной фазе роста культуры. Показано, что диплоидные клетки *P. pinus* в логарифмической фазе роста культуры неспособны к постгипертермическому восстановлению, что в значительной мере обуславливает их повышенную чувствительность к гипертермической обработке по сравнению с клетками в стационарной фазе роста.

Работа выполнена в Лаборатории ядерных проблем ОИЯИ.

Препринт Объединенного института ядерных исследований. Дубна 1988

Перевод М.И.Потапова

Glazunov A.V., Boreiko A.V. P19-88-671
Regularities of Posthyperthermic Recovery in Haploid and Diploid Cells of *Saccharomyces Cerevisiae* and *Pichia Pinus*

Isogenic diploid cells of *Saccharomyces cerevisiae* are more sensitive to hyperthermic treatment /50° C/ than haploid ones, the posthyperthermic recovery efficiency being the same for both types of cells. In contrast to this, thermoresistivity of haploid and diploid cells of *Pichia pinus* does not practically differ, the posthyperthermic recovery efficiency for both types of cells is also the same. A conclusion is drawn that posthyperthermic recovery is not a factor responsible for different thermosensitivity of cells in the stationary phase of their growth. It is shown that diploid cells of *P. pinus* in the logarithmic phase of their growth are incapable of recovering after hyperthermal treatment, which is largely the reason for their higher sensitivity to such treatment as compared with cells in the stationary phase of growth.

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

Preprint of the Joint Institute for Nuclear Research, Dubna 1988