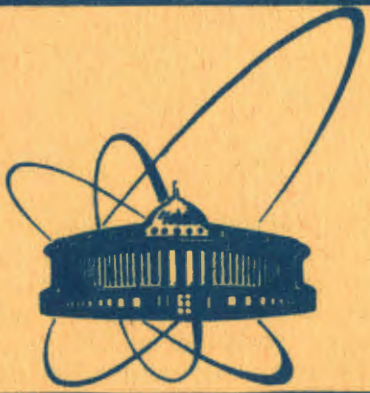
82-929



сообщения
объединенного
института
ядерных
исследований
дубна

Объединенный институт ядерных исследований
БИБЛИОТЕКА

19-82-929

С.Козубек, Е.А.Красавин

БИОЛОГИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИОНИЗИРУЮЩИХ ИЗЛУЧЕНИЙ РАЗНОГО КАЧЕСТВА И РЕПАРАЦИЯ ДНК (теоретический анализ).

ДЕЙСТВИЕ ИЗЛУЧЕНИЙ НА БАКТЕРИИ **ESCHERICHIA COLI.**

Индукция и репарация основных типов повреждений ДНК.

1982

ВВЕДЕНИЕ

Проблема относительной биологической эффективности /ОБЭ/ ионизирующих излучений разного качества уже на протяжении нескольких десятилетий является одной из ключевых проблем радиационной биологии. Для объяснения сложной и неоднозначной зависимости ОБЭ от линейной передачи энергии (L) излучений в разное время были предложены многочисленные модели, основывающиеся на различных представлениях. Развитие классических подходов, использующих принцип попадания и теорию мишени, а также успешное становление микродозиметрии, привело к созданию ряда формальных моделей, учитывающих только физические особенности взаимодействия разных типов излучений с гипотетическими клеточными мишенями /1/. Выйти за рамки формальных представлений не удалось и "репарационным моделям",поскольку феномен репарации лучевых повреждений рассматривался в отрыве от реальных молекулярных событий, происходящих в клетке.

В последнее время становится все более очевидным, что биологическая эффективность излучений разного качестве определяется как физическими особенностями микрораспределения энергии разных типов излучений в генетических структурах клетки, в результате чего индуцируется широкий спектр первичных повреждений ДНК, так и биологическим фактором, направленным на репарацию этих повреждений /2/. Имеются основания полагать, что снижение репарационной способности клеток с увеличением L, а соответственно и возрастание биологической эффективности в значительной степени связаны с индукцией нерепарируемых повреждений ДНК, играющих роль в летальном действии плотноионизирующих излучений.

Основными молекулярными событиями, приводящими клетку к гибели, являются, как теперь общепризнано, двухнитевые разрывы /ДР/ ДНК /3–6/. Полученные в последнее время данные о механизмах индукции и репарации ДР ДНК у бактерий E.coli свидетельствуют о значительной роли энзиматических ДР в летальном действии γ-лучей /5,6/. При действии же плотноионизирующих излучений можно ожидать преимущественного образования прямых ДР, трудно репарируемых клеткой /2/.

При выяснении роли репарации ДНК в биологической эффективности излучений разного качества наиболее удобно рассмотреть закономерности изменения ОБЭ от L на бактериальных клетках. Для E.coli имеется обширная информация, касающаяся организации генетического аппарата,механизмов индукции и репарации лучевых повреждений ДНК, выделены как радиочувствительные, так и суперрезистентные мутанты /7/.

Попытки моделирования зависимости биологической эффективности излучений от величины L при облучении разных по чувствительности бактериальных клеток предпринимались и ранее [8,9]. Предполагалось, что основными повреждениями ДНК, приводящими клетки к гибели, являются однонитевые разрывы /ОР/ и ДР ДНК. В [9] предполагается существование конкретной связи между выживаемостью и выходом ОР и ДР при действии излучений с разной L, который моделируется с помощью микродозиметрических распределений. Однако в указанных моделях изменение чувствительности клеток с возрастанием L рассматривается формально, без учета влияния на характер этой зависимости биологического фактора.

В свете новых представлений о механизмах образования и восстановления структурных нарушений ДНК у бактерий появляется возможность проведения теоретического анализа влияния репарации ДНК на чувствительность разных штаммов E.coli /дикого типа, чувствительных и суперрезистантного мутантов/ к действию излучений, различающихся по L. Проведение такого анализа и явилось целью настоящей работы. Прежде чем приступить к изложению основных посылок, лежащих в основе предлагаемой модели, коротко рассмотрим современные представления о механизмах индукции и репарации некоторых типов повреждений ДНК, играющих ведущую роль в лучевой инактивации бактериальных клеток.

ОСНОВНЫЕ ТИПЫ ЛУЧЕВЫХ ПОВРЕЖДЕНИЙ ДНК E.coli И ИХ РЕПАРАЦИЯ

Среди широкого спектра первичных повреждений ДНК, индуцируемых γ-излучением, наиболее значимыми, играющими решающую роль в лучевой инактивации клеток, являются, как указывалось, ОР и ДР ДНК [3,4,5,10]. Однако истинные ОР, возникающие вследствие нарушения главной цепи валентности /разрушение фосфодиэфирных и межуглеродных связей/, составляют лишь небольшую долю от общего выхода ОР ДНК, образующихся из первичных γ-сайтов, которые репарационные ферменты переводят в энзиматические ОР [10]. В настоящее время нет полной ясности в вопросе, какова химическая природа таких повреждений, идентифицированы лишь некоторые из них: продукты 5-окси-6-оксипероксидигидротиминового типа, тимин-метильные группы [11–13], апуриновые и апиримидиновые сайты [14], повреждения сахара [15].

5,6-дигидрокси-дигидротимин (t′), так же как и тимин-метильные группы - продукты радиационно-химического превращения тимина, являются наиболее частыми щелочностабильными типами радиационных повреждений первичной структуры ДНК [13]. Однако наряду с t′-продуктами в γ-облученной ДНК выявляются и щелочелабильные участки. Они являются результатом удаления из ДНК азотистых оснований, преимущественно тимина и его радиационно-химических дериватов [14]. Помимо щелочностабильных, апуриновых и апиримидиновых сайтов в ДНК при γ-облучении возникают повреждения, локализованные в дезоксирибозе, которые также приводят к освобождению основания и образованию малодиальдегида [15].

Разнообразные первичные γ-сайты "узнаются" специфическими клеточными эндонуклеазами, которые переводят их в ОР. К настоящему времени выявлено несколько таких эндонуклеаз: γ-эндонуклеаза, специфичная для щелочностабильных повреждений [16], АП-эндонуклеазы, субстратом действия которых служат апуриновые и апиримидиновые сайты [17,18] и ряд других [19]. От скорости работы эндонуклеаз и других репарационных ферментов зависит общее число ОР в геноме клетки в каждый момент во время и после облучения [10]. Действительно, приводимые в литературе данные свидетельствуют о варьировании выхода ОР ДНК у бактерий от $1{,}16 \cdot 10^{-11}$ сГр$^{-1}$ дальтон$^{-1}$ [20] до $2 \cdot 10^{-13}$ сГр$^{-1}$ дальтон$^{-1}$ [21]. Столь большие колебания в оценках выхода ОР могут быть объяснены тем, что часть первичных повреждений ДНК репарируется механизмом сверхбыстрой и быстрой репарации.

Известно, что репарация ОР осуществляется у бактерий с участием разных репарационных ферментов, восстанавливающих ОР с использованием механизмов сверхбыстрой (I), быстрой (II) и медленной (III) репарации [22]. Репарация I за 1-2 минуты при 0 °C воссоединяет до 90% разрывов [23]. Точкой приложения фермента, участвующего в репарации I - ДНК-лигазы, являются разрывы, имеющие смежные 3′OH - 5′PO_4 концы, которые в случае отсутствия нуклеотидных брешей легко могут восстанавливаться одной ДНК-лигазой без участия каких-либо других ферментов [24]. Примерно 90% ОР, оставшихся нерепарированными после завершения репарации I, воссоединяются механизмом репарации II в течение 10 минут при 0 °C [24,25]. Субстратом репарации II преимущественно являются концы 3′PO_4–5′OH, 3′OH–5′OH и 3′OH–5′PO_4 с пробелом нуклеотида [25]. В ней принимает участие полимераза I. ОР ДНК, которые не могли быть восстановлены репарацией I и II, являются объектом репарации III, зависимой от ростовой среды, наличия полимеразы III, продуктов генов dna G$^+$, dna B$^+$, lex A$^+$ и контролируемой генами rec A, rec B и rec C [22]. Сложный генный контроль репарации III, возможно, отражает характерные особенности тех концевых групп, которые не могут быть отрепарированы ферментами, участвующими в репарации I и II. Их восстановление требует координированного действия целого ряда структурных и регуляторных генов [26].

Первичные γ-сайты уже в процессе репарации I и II становятся мишенями для эндонуклеаз, которые, перехватывая у лигаз лигазоспецифические концы, производят инцизию повреждений в цепи ДНК [24,25]. В, свою очередь, экзонуклеазы осуществляют расчистку концов инцизионных разрывов, подвергая деградации цепь ДНК в обоих направлениях с образованием брешей [5,10]. Деградация ДНК является результатом действия преимущественно rec BC-экзонуклеазы V [27]. У клеток дикого типа при дозах облучения, близких к средним летальным (D_0), в процесс деградации вовлекается до несколь-

ких десятков процентов всей клеточной ДНК[28]. Отмечено неравномерное распределение деградации по клеточной популяции[29]. В одних клетках происходит полный распад генома, в других наблюдается ограниченная деградация[30,31]. У некоторых чувствительных мутантов, например у recA-мутанта, количество деградированной ДНК достигает 90% от всей ДНК, содержащейся в геноме[27]. Breши, появляющиеся в результате экзонуклеазной деградации, застраиваются при помощи полимераз, и лигазы воссоединяют ковалентные связи между исходной и вновь синтезированной ДНК.

Таким образом, последовательная цепь основных этапов репарации первичных повреждений ДНК, вызывающих образование ОР: эндонуклеазная инцизия γ-сайтов - экзонуклеазная расчистка - полимеразный ресинтез поврежденной цепи - лигазное воссоединение концов, приводит к восстановлению целостности ДНК. Однако такая идеальная картина репарации ОР далеко не всегда реализуется в клетке[10]. Репарационные ферменты действуют "некоординированно", и активность ресинтезирующих энзимов отстает от интенсивной работы эндонуклеаз и процесса экзонуклеазной расчистки[10]. Это может приводить к тому, что breши, образуемые в комплементарных нитях ДНК, способны перекрываться, образуя ДР. На основе теории репарационного баланса, разработанной С.Е.Бреслером[32], можно понять конкурирующие взаимоотношения деструктивных и ресинтезирующих ферментов, приводящих к образованию ДР ДНК в клетках и, в конечном итоге, определяющих их радиочувствительность. Рассмотрим более подробно этот вопрос.

До недавнего времени считалось, что основным механизмом образования ДР в клетках является одновременное повреждение обеих комплементарных нитей в результате прохождения ионизирующей частицы, приводящего к возникновению так называемых прямых ДР /ПДР/. Однако в экспериментах с бактериальными клетками было показано[5,6,10], что этот механизм не является преобладающим, а ведущая роль здесь принадлежит энзиматическим ДР /ЭДР/, которые возникают из перекрывающихся брешей в комплементарных нитях ДНК[5]. Обычно приводимые в литературе значения выходов ДР для γ-излучения, равные 10^{-13} - 10^{-14} сГр$^{-1}$ дальтон$^{-1}$, по-видимому, являются суммой ЭДР и ПДР. Выход же ПДР на самом деле значительно меньше. Действительно, для суперрезистентного мутанта E.coli Gam-444[33], изогенного с клетками дикого типа, у которого хорошо сбалансированы процессы деградации ДНК и ресинтеза поврежденных участков, выход ДР составляет $3\text{-}5\cdot10^{-15}$ сГр$^{-1}$ дальтон$^{-1}$. То есть уменьшение количества перекрывающихся брешей в комплементарных нитях ДНК снижает удельный вклад ЭДР в суммарный выход ДР примерно на порядок.

В свете полученных в последнее время данных о механизмах индукции ЭДР с новых позиций может рассматриваться вопрос о возможности репарации ДР у E.coli[34,35]. В[5] показано, что у E.coli дикого типа репарации ДР не происходит. Можно полагать, что при пострадиационной инкубации клеток в питательной среде возрастание дозы облучения, при которой в среднем на геном образуется один ДР ($D_{\overline{др}}$), отражает процесс репарации экзонуклеазных однонитевых брешей, которые в случае близкого расположения относительно друг друга регистрируются как ДР. Важным моментом здесь является то, что $D_{\overline{др}}$, при которой происходит фиксация ДР /ЭДР или ПДР/, соответствует D_0. Необходимо отметить, что при подавлении активности клеточных нуклеаз $D_{\overline{др}}$, как непосредственно после облучения, так и при пострадиационной инкубации клеток, примерно одинакова с D_0[6]. Эти данные свидетельствуют в пользу того, что фиксация одного ДР в геноме E.coli дикого типа приводит к летальному эффекту, а также указывают на решающую роль в этом процессе ЭДР, образующихся из экзонуклеазных перекрывающихся брешей.

У радиочувствительных мутантов отсутствует корреляция между D_0 и $D_{\overline{др}}$. Для recABC мутанта, например, при сравнительно большой величине $D_{\overline{др}}$ /~100 Гр/ отмечается также и высокая радиочувствительность ($D_0 \ll D_{\overline{др}}$)[6]. Это означает, что для чувствительных мутантов летальными событиями являются не только ДР, но и другие повреждения ДНК. У суперрезистентного мутанта, так же как и у клеток дикого типа, $D_{\overline{др}}$ фиксированного ДР примерно равна D_0[33]. Это указывает на то, что суперрезистентный мутант не способен репарировать ДР, как и клетки дикого типа, а фиксация одного ДР в геноме приводит к летальному эффекту. Вместе с тем вследствие низкого выхода ЭДР у этого штамма радиорезистентность его очень высока.

На основании вышеизложенного можно сделать следующее заключение. Первичные радиационные повреждения ДНК, возникающие как вследствие прямого разрыва межмолекулярных связей в главной цепи валентности, так и вследствие действия репарационных ферментов, трансформируются в ОР. Дорепликативная репарация ОР у E.coli находится под сложным контролем структурных и регуляторных генов и реализуется механизмами сверхбыстрой, быстрой и медленной репарации. Деградация ДНК в клетке, как необходимый этап репарации, определенным образом сбалансирована с процессами ресинтеза поврежденных участков. Вследствие деградации ДНК возможны случаи перекрытия двух брешей в комплементарных нитях, приводящих к возникновению ДР. Фиксация одного ДР /энзиматического или прямого/ приводит к летальному эффекту. Репарации ДР у E.coli не происходит.

Таким образом, к настоящему времени получен ряд экспериментальных данных, касающихся не только феноменологии инактивирующего действия γ-лучей на E.coli с разной репарационной способностью, но и механизмов индукции и репарации повреждений ДНК, лежащих в основе летального действия γ-лучей. Это обстоятельство позволяет провести теоретический анализ закономерностей изменения чувствительности (D_0^{-1}) клеток при действии излучений разного качества, попытаться выяснить роль репарации ДНК в формировании характера зависимости $D_0^{-1}(L)$.

ЛИТЕРАТУРА

1. Alper T. Cellular Radiobiology. Cambridge Univ.Press, L., 1980.
2. Корогодин В.И., Красавин Е.А. ОИЯИ, Р19-82-71, Дубна, 1982.
3. Каплан С. В кн.: Современные проблемы радиационных исследований. "Наука", М., 1972, с.128-137.
4. Van der Schans G.P., Bleichrodt I.E. Int.J.Radiat.Biol., 1974, 26, p.121-126.
5. Бреслер С.Е., Носкин Л.А., Суслов А.В. Радиобиология, 1981, 21, с.3-7.
6. Бреслер С.Е., Носкин Л.А., Суслов А.В. В кн.: Повреждение и репарация ДНК. Изд-во Института биол.физики АН СССР, Пущино, 1980, с.27-42.
7. Бреслер С.Е., Вербенко В.Н., Калинин В.Л. Генетика, 1980, 16, с.1753-1763.
8. Munson R.J. et al. Int.J.Radiat.Biol., 1967, 13, p.205-224.
9. Гюнтер К. и др. Космическая биология и медицина, 1973, 7, с.14-20.
10. Бреслер С.Е., Носкин Л.А. Радиобиология, 1978, 18, с.548-555.
11. Cerutti P.A. Naturwissenschaften, 1974, 61, p.51-59.
12. Hariharan P.V., Remsen J.F., Cerutti P.A. In: Molecular Mechanisms for Repair of DNA. Plenum Press, New York, 1975, p.51-59.
13. Swinehart J.L., Cerutti P.A. Int.J.Radiat.Biol., 1975, 27, p.83-94.
14. Dunlap B., Cerutti P.A. FEBS Letters, 1975, 51, p.188-190.
15. Крушинская Н.П., Шальнов М.И. Радиобиология, 1969, 9, с.339-345.
16. Wilkins R.J. Nature New Biology, 1973, 244, p.269-271.
17. Томилин Н.В., Баренфельд Л.С. Биохимия, 1977, 42, с.1173-1183.
18. Carrier W.L., Setlow R.B. Radiat.Res., 1974, 59, p.97.
19. Noguti T., Kada T. Biochem.et biophys.acta, 1975, 395, p.294-305.
20. Bonura T., Youngs D.A., Smith K.C. Int.J.Radiat.Biol., 1975, 28, p.539-548.
21. Lehnert S., Moroson H. Radiat.Res., 1971, 45, p.299-310.
22. Town C.D., Smith K.C., Kaplan H.S. Current Topics in Radiat.Res., 1973, 8, p.351-399.
23. Serna F.R., Samoilenko J.J. Biochem.and Biophys.Res.Comm., 1975, 67, p.1415-1421.
24. Газиев А.И. В кн.: Механизмы радиационного поражения и восстановления ДНК. Изд-во ИБФ АН СССР, Пущино, 1972, с.204-232.
25. Газиев А.Н. Радиобиология, 1975, 15, с.107-113.
26. Жестяников В.Д. Репарация ДНК и ее биологическое значение. "Наука", Л., 1979.

27. Youngs D.A., Bernstein I.A. J.Bacteriol., 1973, 113, p.901-906.
28. Hamelin C., Youngs D.A., Smith K.C. J.Bacteriol., 1976, 127, p.1307-1314.
29. Pollard E.C., Randal E.P. Radiat.Res., 1973, 55, p.265-279.
30. Pollard E.C., Kraus K. Biophys.J., 1963, 13, p.332-339.
31. Pollard E.C. Curr.Top.Radiat.Res., 1970, 6, p.51-127.
32. Бреслер С.Е. Успехи соврем.биологии, 1976, 82, с.181-198.
33. Бреслер С.Е., Вербенко В.Н., Калинин В.Л. Генетика, 1982, 18, с.1245-1262.
34. Krasin F., Hutchinson F. J.Mol.Biol., 1977, 116, p.81-98.
35. Krish R.E., Krasin F., Sanri C.J. Int.J.Radiat.Biol., 1976, 29, p.37-50.

Рукопись поступила в издательский отдел
31 декабря 1982 года.

НЕТ ЛИ ПРОБЕЛОВ В ВАШЕЙ БИБЛИОТЕКЕ?

Вы можете получить по почте перечисленные ниже книги, если они не были заказаны ранее.

Д3-11787	Труды III Международной школы по нейтронной физике. Алушта, 1978.	3 р. 00 к.
Д13-11807	Труды III Международного совещания по пропорциональным и дрейфовым камерам. Дубна, 1978.	6 р. 00 к.
	Труды VI Всесоюзного совещания по ускорителям заряженных частиц. Дубна, 1978 /2 тома/	7 р. 40 к.
Д1,2-12036	Труды V Международного семинара по проблемам физики высоких энергий. Дубна, 1978	5 р. 00 к.
Д1,2-12450	Труды XII Международной школы молодых ученых по физике высоких энергий. Приморско, НРБ, 1978.	3 р. 00 к.
	Труды VII Всесоюзного совещания по ускорителям заряженных частиц, Дубна, 1980 /2 тома/	8 р. 00 к.
Д11-80-13	Труды рабочего совещания по системам и методам аналитических вычислений на ЭВМ и их применению в теоретической физике, Дубна, 1979	3 р. 50 к.
Д4-80-271	Труды Международной конференции по проблемам нескольких тел в ядерной физике. Дубна, 1979.	3 р. 00 к.
Д4-80-385	Труды Международной школы по структуре ядра. Алушта, 1980.	5 р. 00 к.
Д2-81-543	Труды VI Международного совещания по проблемам квантовой теории поля. Алушта, 1981	2 р. 50 к.
Д10,11-81-622	Труды Международного совещания по проблемам математического моделирования в ядерно-физических исследованиях. Дубна, 1980	2 р. 50 к.
Д1,2-81-728	Труды VI Международного семинара по проблемам физики высоких энергий. Дубна, 1981.	3 р. 60 к.
Д17-81-758	Труды II Международного симпозиума по избранным проблемам статистической механики. Дубна, 1981.	5 р. 40 к.
Д1,2-82-27	Труды Международного симпозиума по поляризационным явлениям в физике высоких энергий. Дубна, 1981.	3 р. 20 к.
Р18-82-117	Труды IV совещания по использованию новых ядерно-физических методов для решения научно-технических и народнохозяйственных задач. Дубна, 1981.	3 р. 80 к.
Д2-82-568	Труды совещания по исследованиям в области релятивистской ядерной физики. Дубна, 1982.	1 р. 75 к.
Д9-82-664	Труды совещания по коллективным методам ускорения. Дубна, 1982.	3 р. 30 к.
Д3,4-82-704	Труды IV Международной школы по нейтронной физике. Дубна, 1982.	5 р. 00 к.

Заказы на упомянутые книги могут быть направлены по адресу:
101000 Москва, Главпочтамт, п/я 79
Издательский отдел Объединенного института ядерных исследований

Козубек С., Красавин Е.А. 19-82-929

Биологическая эффективность ионизирующих излучений разного качества и репарация ДНК /теоретический анализ/.
Действие излучений на бактерии Escherichia coli.
Индукция и репарация основных типов повреждений ДНК

Рассматриваются основные типы повреждений ДНК у E.coli при γ-облучении и восстановление ДНК путем сверхбыстрой, быстрой и медленной репарации. Обсуждается роль баланса активности репарационных ферментов в образовании энзиматических двухнитевых разрывов /ЭДР/ ДНК. Делается вывод, что деградация ДНК в клетке, как необходимый этап репарации, определенным образом сбалансирована с процессами ресинтеза поврежденных участков. Вследствие деградации ДНК возможны случаи перекрытия двух брешей в комплементарных нитях, приводящие к образованию ЭДР. Фиксация одного двухнитевого разрыва ДНК /энзиматического или прямого/ приводит к летальному эффекту. Репарации ДР у E.coli не происходит.

Работа выполнена в Лаборатории ядерных проблем ОИЯИ.

Сообщение Объединенного института ядерных исследований. Дубна 1982

Kozubek S., Krasavin E.A. 19-82-929

Biological Effectiveness of Ionizing Radiations of Different Quality and the Repair of DNA Damage (Theoretical Analayis).
The Effect of Ionizing Radiations on Bacteria Escherichia coli.
The Induction and Repair of Basic Types of DNA Damage

The basic types of DNA damage produced by γ-radiation in E.coli are reviewed as well as their restitution by means of superfast, fast, and slow repair processes. The role of the balance of repair enzymes activities is considered in connection with the induction of enzymatic double strand breaks DNA. Lethal events in wild types and various mutants (both sensitive and superresistant) are interpreted in terms of single and enzymatic double strand breaks. It is concluded that these lessions are formed by pairs of SSB on the opposite strands of DNA shifted by the balance of degradation and resynthesis close together. It is shown that DSB in γ-irradiated DNA are generated mainly by enzymes participating in repair processes and that the first DSB seems to be the true reason of lethality because of inability to be repaired.

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

Communication of the Joint Institute for Nuclear Research. Dubna 1982

Перевод О.С.Виноградовой.