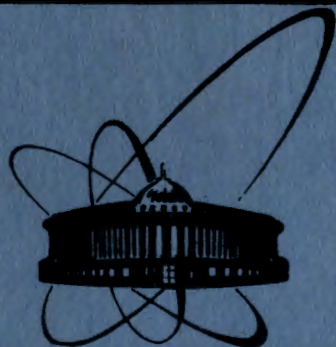


9/1-84



ОБЪЕДИНЕННЫЙ
ИНСТИТУТ
ЯДЕРНЫХ
ИССЛЕДОВАНИЙ
ДУБНА

2.90/84

19-83-716

С.Козубек, Е.А.Красавин

РОЛЬ РЕПАРАЦИИ ДНК
В РЕАЛИЗАЦИИ КИСЛОРОДНОГО ЭФФЕКТА
У БАКТЕРИЙ *ESCHERICHIA COLI*
ПРИ ДЕЙСТВИИ ИЗЛУЧЕНИЙ
С РАЗНОЙ ЛИНЕЙНОЙ ПЕРЕДАЧЕЙ ЭНЕРГИИ
(теоретический анализ).

Кислородный эффект при γ -облучении

Направлено в журнал "Радиобиология"

1983

В экспериментах на *E. coli* было показано^{1,2/}, что величина кислородного эффекта /КЭ/ при γ -облучении клеток в значительной степени зависит от их способности к ферментативной репарации повреждений ДНК. Как правило, у многих радиочувствительных мутантов выявляется значительно меньший КЭ, чем у клеток дикого типа. В ряде случаев у некоторых мутантов отмечается даже "отрицательный" КЭ. Однако для *rol* A⁻-мутанта, наоборот, характерны большие значения КЭ по сравнению с клетками дикого типа. Так, в^{2/} для бактерий *E. coli* K-12 дикого типа и изогенных *tes* A⁻- и *rol* A⁻-мутантов получены значения КЭ, соответственно равные 3, 2 и 4. Проведем анализ полученных данных с позиций развиваемых представлений.

При определении параметров модели нами уже приводились экспериментальные данные по выходу первичноиндуцируемых ОР ДНК в кислородных и аноксических условиях. Было отмечено, что для всех штаммов *E. coli* выход ОР при облучении клеток в аноксических условиях в четыре раза меньший, чем в кислородных. При этом указывалось, что часть первичноиндуцируемых ОР / γ -сайтов/ трансформируется в ОР₁. Выход их в кислородных и аноксических условиях также различается примерно в четыре раза. Следует, однако, заметить, что совпадение коэффициентов $N_{\gamma}^O/N_{\gamma}^N$ и N_{OP1}^O/N_{OP1}^N может быть случайным и не иметь коррелятивной связи между собой, поскольку широкий спектр первичных γ -сайтов может модифицироваться в результате влияния различных эндогенных и экзогенных факторов^{3/}. Из^{4,5/} следует, что 2/3 γ -сайтов, индуцируемых в кислородных и аноксических условиях, восстанавливается репарацией I. В свою очередь, репарация II у клеток дикого типа восстанавливает 3/4 повреждений, остающихся после завершения репарации I^{6/}. У *tes* A⁻-мутантов, учитывая данные, полученные в^{6/}, можно полагать, что репарация II осуществляется более интенсивно, чем у клеток дикого типа, восстанавливая ~9/10 повреждений, остающихся после завершения репарации I. В отличие от ОР₁, восстанавливаемых репарацией II и определяющих основную долю в суммарном выходе ОР₁, выход ОР₁^{ir} в кислородных условиях составляет, как мы уже определили, лишь 1/20 от общей суммы ОР₁. Казалось бы, этот тип повреждений играет несущественную роль в инактивирующем действии γ -облучения на клетку. Однако после завершения репарации II соотношение между выходом ОР₁^{ir} и долей не восстановленных повреждений репарацией II резко меняется: для клеток дикого типа это соотношение составляет 1/6 и для *tes* A⁻-мутанта 1/3. Первоначальное соотношение сохраняется лишь для клеток *rol* A⁻-мутанта, дефект-

ных по репарации II. В условиях же аноксии соотношение N_{OP1}^{ir}/N_{OP1} после завершения репарации II для клеток дикого типа, *tes* A⁻- и *rol* A⁻-мутантов соответственно составляет 1/2, 1 и 1/4. В дальнейшем все типы ОР₁ у клеток дикого типа и *rol* A⁻-мутанта трансформируются в ОР₂=МС и в конечном итоге либо восстанавливаются репарацией III, либо фиксируются в виде ЭДР.

Рассмотрим в рамках развиваемых представлений два крайних случая.

Случай I. Допустим, что репарация II полностью блокирована. Тогда величина КЭ по выходу ОР₁ (N_{OP1}^O/N_{OP1}^N) сохраняет такие же значения и для ОР₂, МС и ЭДР, поскольку репарация III восстанавливает в одинаковой степени ОР₁ и ОР₁^{ir}. Величина КЭ по тесту выживания клеток в этом случае должна соответствовать КЭ по критерию образования ОР₁. Действительно, рассмотренная ситуация в полной мере реализуется у *rol* A⁻-мутанта, для которого величина КЭ составляет 4, то есть больше, чем для клеток дикого типа.

Случай II. Рассмотрим ситуацию, когда в клетке блокирована репарация III и вероятность $q_2 = 0$. Здесь репарация II устраняет ОР₁^{ir} как в кислородных, так и в аноксических условиях, оставляя не восстановленными лишь ОР₁^{ir}. Поскольку выход ОР₁^{ir} не зависит от условий оксигенации, КЭ у таких клеток не должен иметь места. В определенной мере описанная ситуация реализуется у *tes* A⁻-мутанта, дефектного по репарации III. У клеток данного типа вероятность $p_3 = 0$, но вероятность $q_2 \neq 0$, хотя, как можно полагать, имеет в два раза меньшие значения по сравнению с клетками дикого типа. При блоке репарации III, судя по данным^{6,7/}, репарация II у *tes* A⁻-мутанта, как уже указывалось, осуществляется в большем объеме, чем у клеток дикого типа. При изменении объема быстрой репарации следует ожидать модификации и радиочувствительности клеток и величины КЭ. То есть при увеличении значений параметра Q, должно наблюдаться уменьшение чувствительности клеток к γ -облучению и снижение величины КЭ. Действительно, вышеизложенное находится в соответствии с экспериментальными данными. В^{2,3/} отмечено, что для *tes* A⁻-мутанта, имеющего $D_0 = 10$ Гр и величину КЭ = 2,1, наблюдается снижение значений КЭ до 1,75 при возрастании радиорезистентности клеток / $D_0 = 12,5$ Гр/.

У бактерий *E. coli* K-12 дикого типа эффективно функционируют и быстрый и медленный механизмы репарации ДНК. Поэтому величина КЭ, равная 3 по критерию выживания клеток, будет определяться в основном степенью балансировки механизмов репарации II и III. Степень сбалансированности указанных механизмов отражается в реальной кинетике индукции и репарации основных типов повреждений ДНК, определенной нами в рамках рассматриваемой модели. На основе изложенных выше представлений можно предполагать, что сдвиг этого баланса должен отражаться на величине КЭ по критерию точной выживаемости. В случае ограничения объема репарации III,

зависимой от среды роста /например, при культивировании клеток в условиях бедной среды/, по-видимому, следует ожидать уменьшения величины КЭ по причинам, рассмотренным при анализе случая II. Наоборот, при увеличении объема репарации III, восстанавливающей как неотрепарированные OP_1^I , так и OP_1^{Ir} , можно ожидать для клеток дикого типа возрастания величины КЭ.

Известно, что *uvrA*-мутация у бактерий *E.coli* не влияет на чувствительность клеток к γ -облучению в кислородных условиях /чувствительность их одинакова с клетками дикого типа/. Однако при облучении в условиях аноксии наблюдается повышение чувствительности *uvrA*-мутанта, что приводит к снижению величины КЭ, равной ~2. Данное обстоятельство можно объяснить тем, что мутация в *uvrA*-гене приводит к нарушению сбалансированности процессов репарации II и III. Такая точка зрения согласуется с представлениями, согласно которым продукт *uvrA*-гена является не только ответственным за элиминацию пиримидиновых димеров в ДНК клеток при ультрафиолетовом облучении, но прежде всего является регуляторным белком, контролирующим работу специфических эндонуклеаз и гликозилаз, участвующих в эксцизионной репарации ^{7/8/}. В этой связи уменьшение КЭ у *uvrA*-мутанта может объясняться возрастанием объема репарации II, что делает более значимым вклад OP_1^{Ir} в суммарный выход потенциальных летальных поврежденных клеток - OP_2 . Поскольку величина КЭ для *uvrA*-мутанта составляет 2, а $D_0 = 100 \text{ Гр}^{2,9/}$, получаем значения параметров Q_u и S_u для данного штамма соответственно равными 10 и 10.

Изложенные выше соображения, объясняющие уменьшение КЭ у *uvrA*-мутантов возрастанием объема репарации II, основываются на предположении о независимости кинетики данного типа репарации от условий оксигенации клеток. Однако известно, что эффективность восстановительных процессов может зависеть от степени оксигенации клеток ^{10,11/}. В связи с этим уменьшение КЭ у *uvrA*-мутантов можно также объяснить и снижением объема репарации II в аноксических условиях. В этом случае следует ожидать большего выхода OP_2 из невозстановленных OP_1 . Такая ситуация, как можно полагать, реализуется у двойного *uvrA* *recA*-мутанта. Для него величина КЭ = 1 и D_0 в кислородных и аноксических условиях составляет 10 Гр. Объяснить отсутствие КЭ у *uvrA* *recA*-мутантов возрастанием объема репарации II нельзя, поскольку величина D_0 одинакова как при облучении клеток в кислородных, так и в аноксических условиях. По-видимому, наиболее приемлемое объяснение может заключаться в снижении объема репарации II в аноксических условиях, что нивелирует соотношение $N_{OP_1}^O / N_{OP_1}^N = 4$ до 1 после завершения репарации II.

В связи с изложенным определим параметры Q^O и Q^N для *recA* *uvrA*-мутанта / Q_{ru}^O и Q_{ru}^N /:

$$\frac{N_{OP_1}^O - N_{OP_1}^{Ir}}{Q_{ru}^O} + N_{OP_1}^{Ir} = (D_0^{-1})_{ru}^O, \quad /1/$$

$$\frac{N_{OP_1}^N - N_{OP_1}^{Ir}}{Q_{ru}^N} + N_{OP_1}^{Ir} = (D_0^{-1})_{ru}^N, \quad /2/$$

где $(D_0^{-1})_{ru}^O = (D_0^{-1})_{ru}^N = 0,1 \text{ Гр}^{-1}$ - чувствительность клеток в кислородных и аноксических условиях. На основании /1/, /2/ получаем $Q_{ru}^O = 10$ и $Q_{ru}^N = 2$, что свидетельствует о снижении в аноксических условиях объема репарации II у данного мутанта.

Как указывалось выше, от эффективности репарации II у *E.coli* в значительной степени зависит величина КЭ. Рассмотрим далее более подробно вопрос, касающийся влияния репарации III на проявление КЭ. Известно, что с помощью механизма медленной репарации у *E.coli* восстанавливаются протяженные однонитевые бреши в молекуле ДНК с участием экзонуклеазы V, ДНК-полимеразы III, продукта *recA*-гена и ряда других ферментов, контролируемых многими структурными и регуляторными генами. Известно также, что при изменении условий оксигенации клеток меняется и эффективность медленной репарации ^{12/}. По данным ^{12/}, в условиях аноксии эффективность репарации III возрастает в ~2 раза. По-видимому, это связано с тем, что процесс экзонуклеазной деградации ДНК в аноксических условиях замедлен по сравнению с нормально оксигенированными клетками, что обуславливает в конечном итоге меньший выход МС и ЭДР. Следует отметить, что замедление экзонуклеазной деградации ДНК не обязательно должно отражаться в уменьшении вероятности q_2 . Вероятность образования $OP_2 = \text{МС}$ определяется также и количеством молекул-ферментов, осуществляющих экзонуклеазную деградацию ДНК, и их способностью к "узнаванию" необходимого субстрата при инициации процесса деградации. И поскольку этот процесс является энергозависимым, очевидно, что в условиях аноксии можно скорее ожидать снижения интенсивности процесса деградации ДНК, чем уменьшения вероятности экзонуклеазной атаки. Защитное действие пострадиационной аноксии, по-видимому, обусловлено большим выходом таких МС, которые содержат большее количество комплементарных неповрежденных нуклеотидов /при условии одинаковой в этом случае экспрессии *lexA-recA* генов, ответственных за синтез *recA*-белка/, что обуславливает меньшую вероятность фиксации МС в ЭДР. В свете всего сказанного можно ожидать, что клетки должны проявлять наименьшую чувствительность при облучении в условиях аноксии и при культивировании в пострадиационный период также в аноксических условиях. Наибольшая же чувствительность должна наблюдаться при облучении и культивировании в условиях нормальной оксигенации. Действительно, как следует из ^{12/}, чувствительность бактерий *E.coli* в наибольшая при облучении и культивировании в кислородных условиях. Облучение же в атмосфере азота и культивирование в обычных условиях на воздухе выявляет КЭ = 2,6. При культивировании клеток, облученных на воздухе, в пострадиационный период в условиях аноксии также наблюдается снижение их радиочувствительности, и фактор изменения дозы /ФИД/ в этом случае составляет ~1,5. Наибольший

ме КЭ = 3,4 выявляется при облучении и культивировании клеток в пострадиационный период в условиях аноксии.

Следует отметить, что аноксические условия в пострадиационный период могут влиять не только на репарацию III путем замедления экзонуклеазной деградации ДНК, но могут, по-видимому, изменять и баланс репарации II и III, если таковые условия возникают в клетке достаточно быстро. Следует также иметь в виду, что образование протяженных брешей в ДНК вследствие ее деградации наиболее интенсивно происходит при облучении клеток в кислородных условиях, так что защищающее действие пострадиационной аноксии в этом случае, по-видимому, минимально. Более эффективной является пострадиационная аноксия при облучении клеток в аноксических условиях. Здесь, очевидно, образование протяженных брешей изначально происходит не столь интенсивно, как при облучении клеток в кислородных условиях.

Таким образом, мы рассмотрели вопросы, связанные с ролью репарации ДНК в реализации КЭ у бактерий *E. coli* при γ -облучении. С учетом имеющихся экспериментальных данных о закономерностях индукции и репарации основных типов повреждений ДНК удается непротиворечиво объяснить различные стороны проявления КЭ у разных штаммов *E. coli*. Прежде чем перейти к анализу зависимости КЭ от линейной передачи энергии излучений, необходимо рассмотреть реализацию КЭ у бактерий при γ -облучении в условиях влияния химических радиомодификаторов - аноксических радиосенсибилизаторов и радиопротекторов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Alper T. Mutation Res., 1967, 4, p.15-20.
2. Sapora O., Fielden E.M., Loverock P.S. Radiat.Res., 1977, 69, p.293-305.
3. Johansen I. Radiat Res., 1974, 58, p.398-408.
4. Johansen I. et al. Proc.Nat.Acad.Sci.USA, 1975, 72, p.167.
5. Town CH.D., Smith K.S., Kaplan H.S. Radiat.Res., 1973, 55, p.334-345.
6. Serna F.R., Samoylenko I.I. Biochem. and Biophys.Res., 1975, 67, p.1415-21.
7. Hadden C.T. J.Bacteriol, 1977, 132, p.856-861.
8. Томилин Н.В. Цитология, 1977, 19, с.1086-1092.
9. Howard-Flanders P., Boyce R.P. Radiat.Res.Suppl., 1966, 6, p. 156.
10. Gillies N.E., Alper T. Nature, Lond., 1959, 183, p. 237-8.
11. Koch C.J. Advances in Radiat.Biol., 1979, 8, p.273-315.
12. Alper T. Cellular Radiobiology. Cambridge university press, Cambridge - London - New York - Melbourne, 1981.

Рукопись поступила в издательский отдел
17 октября 1983 года

Козубек С., Красавин Е.А.

19-83-716

Роль репарации ДНК в реализации кислородного эффекта у бактерий *Escherichia coli* при действии излучений с разной линейной передачей энергии /теоретический анализ/. Кислородный эффект при γ -облучении

В рамках разрабатываемых модельных представлений рассматриваются закономерности индукции и репарации основных типов повреждений ДНК у разных штаммов *E. coli* при γ -облучении в кислородных и аноксических условиях. Анализируются соотношения выходов одностранных разрывов ДНК, восстанавливаемых / OP_1^r / и не восстанавливаемых / OP_1^f / быстрым типом репарации /II/ в кислородных и аноксических условиях. Отмечается важная роль OP_1^r в реализации кислородного эффекта /КЭ/ у клеток дикого типа, rec^- , pol^- , uvr^- и $rec^- uvr^-$ мутантов. Показано, что первоначальное соотношение выходов OP_1^f и OP_1^r , одинаковое для всех вышеуказанных штаммов, резко меняется у различных мутантов после завершения репарации II. Обсуждается влияние балансировки механизмов репарации II и III на проявления КЭ у клеток дикого типа и чувствительных мутантов.

Работа выполнена в Лаборатории ядерных проблем ОИЯИ.

Препринт Объединенного института ядерных исследований. Дубна 1983

Kozubek S., Krasavin E.A.

19-83-716

The Role of DNA Repair in the Realization of Oxygen Effect in Bacteria *Escherichia coli* after Irradiation with Ionizing Radiation with Different Linear Energy Transfer/Theoretical analysis/. The Oxygen Effect after γ -irradiation

On the basis of model approach the character of DNA damage induction and its repair after γ -irradiation of different mutants of *Escherichia coli* is considered. The relations between single strand breaks repairable and irreparable by fast repair in the presence or absence of oxygen have been analysed. The role of the balance between fast and slow repair in the oxygen effect for different mutants of *E. coli* is discussed.

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

Preprint of the Joint I

Перевод О.С.Виноградовой