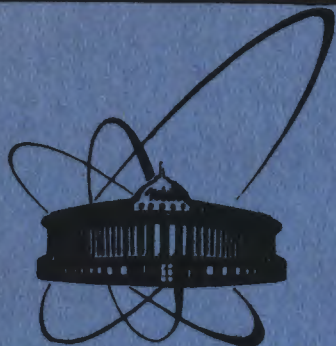


2/iv-84



объединенный
институт
ядерных
исследований
дубна

1675/84

19-83-904

К.Г.Амиртаев, Е.А.Красавин,
С.Козубек, А.Нямсамбуу

РОЛЬ РЕПАРАЦИИ ДНК
В БИОЛОГИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ
ИОНИЗИРУЮЩИХ ИЗЛУЧЕНИЙ
РАЗНОГО КАЧЕСТВА

Влияние α -облучения на чувствительный
и суперрезистентный мутанты бактерий
Escherichia Coli

Направлено в журнал "Радиобиология"

1983

Известно, что зависимость радиочувствительности (D_0^{-1}) бактерий *E. coli* от величины линейной передачи энергии (L) излучений имеет сложный и неоднозначный характер^{/1-3/}. Для чувствительных мутантов зависимость $D_0^{-1}(L)$, как правило, описывается ниспадающей кривой /кривая 1-го рода/, клеткам же дикого типа часто свойственна зависимость $D_0^{-1}(L)$ с максимумом /кривая 2-го рода/^{/1,2/}. В^{/3/} показано, что зависимость $D_0^{-1}(L)$ 2-го рода невозможно однозначно объяснить лишь на основе учета особенностей передачи энергии излучений с разной L чувствительным мишеням клеток. При расшифровке механизмов биологической эффективности ионизирующих излучений разного качества необходимо также учитывать и влияние биологических факторов - процессов пострадиационного восстановления клеток.

В^{/4-8/} проведен теоретический анализ роли репарации ДНК в биологической эффективности излучений с разной L . Было показано, что характер зависимости $D_0^{-1}(L)$ для чувствительных мутантов можно однозначно интерпретировать в терминах физики ионизирующих излучений и геометрии мишеней, поскольку летальными событиями для таких мутантов являются не только двухнитевые разрывы /ДР/, но преимущественно одонитевые разрывы /ОР/ ДНК. Для клеток же дикого типа, у которых летальными повреждениями являются ДР ДНК, характер зависимости $D_0^{-1}(L)$ определяется как биологическими факторами, обуславливающими выход энзиматических ДР /ЭДР/ ДНК, так и физическими свойствами излучений, влияющими на выход прямых ДР /ПДР/ ДНК^{/7,8/}. Расчеты, выполненные в^{/8/}, показали, что в случае уменьшения выхода ЭДР ДНК у *E. coli* при γ -облучении, зависимость $D_0^{-1}(L)$ описывается кривой 2-го рода, а величина максимума на этой кривой определяется степенью чувствительности клеток к γ -облучению. Действительно, снижение выхода ЭДР ДНК у *E. coli* дикого типа при γ -облучении в присутствии радиопротекторов^{/9/} приводит к трансформации зависимости $D_0^{-1}(L)$ 1-го рода в кривую 2-го рода^{/3/}.

В последнее время получены мутанты *E. coli*, обладающие повышенной устойчивостью к γ -облучению^{/10/}. В основе механизмов, обуславливающих высокую резистентность выделенных штаммов к γ -облучению, лежат процессы, влияющие на выход ЭДР ДНК^{/11/}. Согласно^{/11/}, размер деградации ДНК и выход ЭДР у суперрезистентных мутантов существенно ниже, чем у клеток дикого типа. С учетом того, что с возрастанием L выход ЭДР падает, а ПДР, наоборот, увеличивается^{/7/}, чувствительность клеток суперрезистентного мутанта с ростом L должна возрастать. Это означает, что для клеток данного штамма, как следует из^{/8/}, должна иметь место зависимость $D_0^{-1}(L)$ 2-го рода, а различия в чувствительности клеток дикого типа и устойчивого мутанта при γ -облучении должны

исчезать при возрастании L . Для проверки этого предположения и была выполнена настоящая работа.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В работе использованы изогенные штаммы бактерий *E. coli* K-12: дикий тип - AB 1157 (*thr-1 leu-6 pro-A2 his-4 arg E3 lacY1 gal K2 ara-14 xyl-5 mt1-1 tsx-33 str A31 sup E37*), чувствительный мутант AB 2463 (*tes A13*) и суперрезистентный мутант *Gam^r-444*.

Выращивание бактериальных культур проводили до стационарной фазы /2-3·10⁹ клеток в 1 мл/ в жидкой среде YEP следующего состава: пептон - 10 г, дрожжевой экстракт - 5 г, NaCl - 10 г, дистиллированная вода - 1 л. После выращивания культуру отмывали от питательной среды, ресуспендировали в 0,15 М растворе NaCl и выдерживали в нем в течение двух часов. После выдерживания клетки подвергали облучению.

γ -облучение клеток проводили на установке с γ -источником ¹³⁷Cs при 0°C. Мощность дозы облучения составляла 35 Гр/мин. В экспериментах с α -частицами использовали плоский α -источник ²³⁹Pu с мощностью дозы 21 Гр/мин. Среднее значение L α -частиц составляло ~ 110 кэВ/мкм. Облучение образцов γ -лучами проводили как в суспензии, так и на поверхности голодного агара /2% агар-агар/ в виде клеточного монослоя. Способ облучения клеток не влиял на радиочувствительность к γ -облучению. В опытах с α -частицами облучение клеток проводили на поверхности голодного агара при 0°C. После облучения клетки рассеивали в чашках Петри с твердой питательной средой YEP. Подсчет макроколоний производили через 24-48 ч. после облучения. Опыты проводили в 10-15 повторностях; полученные результаты подвергали статистической обработке методом наименьших квадратов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис.1 представлены кривые выживания клеток дикого типа, чувствительного и суперрезистентного мутантов в зависимости от дозы γ - и α -облучения. Как можно видеть, при γ -облучении клеток дикого типа и *tes A⁻*-мутанта кривые выживания носят экспоненциальный характер. Для суперрезистентного мутанта дозовая кривая имеет сигмоидный вид. При α -облучении сигмоидность кривой выживания *Gam^r*-мутанта сохраняется, однако наклон экспоненциального ее участка увеличивается.

В таблице приведены значения радиочувствительности клеток при γ - и α -облучении, величины факторов изменения дозы /ФИД/ для репарационных мутантов и коэффициенты относительной биологической эффективности /ОБЭ/ α -частиц для всех использованных штаммов. Из таблицы следует, что наибольшие различия в радиочувствительности клеток наблюдаются при γ -облучении. Величины ФИД

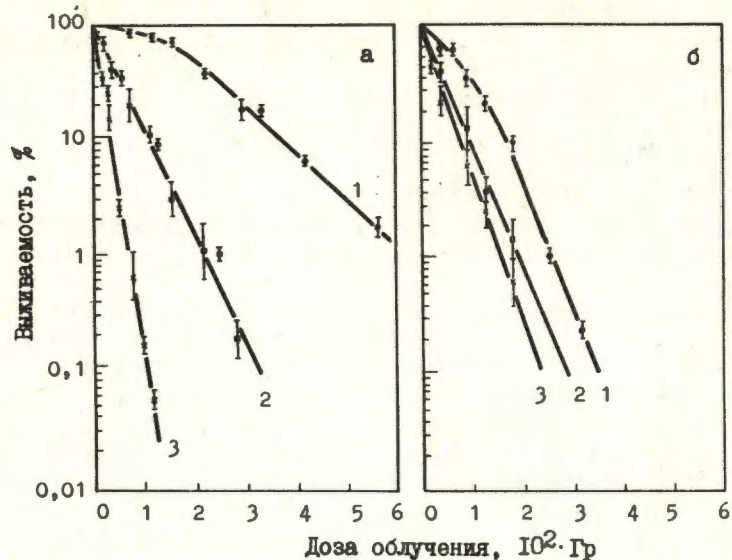


Рис.1. Выживаемость клеток дикого типа /2/, суперрезистентного мутанта /1/ и $res A^-$ -мутанта /3/ при γ - /а/ и α -облучении /б/. По оси абсцисс: доза облучения, Гр; по оси ординат: выживаемость, %.

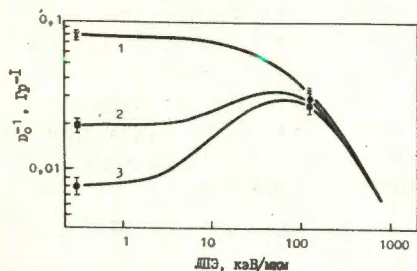


Рис.2. Экспериментальные и расчетные величины радиочувствительности клеток дикого типа /2/, $res A^-$ -мутанта /1/ и суперрезистентного мутанта /3/ в зависимости от L . Экспериментальные точки соответствуют значениям D_0^{-1} для клеток дикого типа (■), $res A^-$ -мутанта (×) и суперрезистентного мутанта (●) при γ - и α -облучении.

в этом случае для $res A^-$ - и Gam^r -мутантов соответственно составляют $0,27 \pm 0,01$ и $2,30 \pm 0,36$. При действии α -частиц чувствительность указанных штаммов *E. coli* изменяется по-разному. Как видно из таблицы, величина D_0^{-1} для клеток дикого типа при α -облучении слегка возрастает по сравнению с γ -облучением, для клеток же $res A^-$ -мутанта величина D_0^{-1} уменьшается. В отличие от этого, чувствительность Gam^r -мутанта при α -облучении существенно возрастает по сравнению с γ -облучением. Величины ФИД при α -облучении для $res A^-$ - и Gam^r -мутантов соответственно составляют $0,78 \pm 0,04$ и $0,93 \pm 0,11$, т.е. при действии α -частиц имеет место нивелирование чувствительности всех использованных в экспериментах штаммов *E. coli*. Более отчетливо это видно на рис.2,

где представлена теоретическая зависимость радиочувствительности клеток от L , рассчитанная на основе /5-8/, и приведены величины D_0^{-1} , полученные в данных экспериментах. Расчет зависимости $D_0^{-1}(L)$ проведен для чувствительной области клетки (σ), равной $0,5 \text{ мкм}^2$. Как можно видеть из представленных материалов, с возрастанием L происходит увеличение чувствительности клеток дикого типа и Gam^r -мутанта, а чувствительность $res A^-$ -мутанта падает. Это приводит к нивелированию значений D_0^{-1} для указанных штаммов *E. coli* при $L \geq 100 \text{ кэВ/мкм}$, т.е. для $res A^-$ -мутанта характерна зависимость $D_0^{-1}(L)$ 1-го рода, а клетки дикого типа и суперрезистентный мутант выявляют зависимость $D_0^{-1}(L)$ 2-го рода. Максимум на этой зависимости для Gam^r -мутанта значительно более выражен по сравнению с клетками дикого типа, поскольку Gam^r -мутант имеет существенно меньшую чувствительность к γ -облучению. Теоретическим зависимостям $D_0^{-1}(L)$ полностью соответствуют величины D_0^{-1} изученных штаммов *E. coli*, полученные нами для двух значений L при γ - и α -облучении.

Таким образом, результаты экспериментов свидетельствуют о том, что значения D_0^{-1} для $res A^-$ -мутанта при γ - и α -облучении принадлежат зависимости $D_0^{-1}(L)$ 1-го рода. Для клеток же дикого типа и Gam^r -мутанта полученные величины D_0^{-1} соответствуют зависимости $D_0^{-1}(L)$ 2-го рода. Кривая 1-го рода, как мы указывали выше, может однозначно быть интерпретирована в терминах физики ионизирующих излучений и геометрии мишеней клеток, поскольку летальными событиями для чувствительных штаммов являются прежде всего ОР ДНК. Снижение величин D_0^{-1} с возрастанием L у таких штаммов отражает увеличение флуктуаций энергии частиц по чувствительным микрообъемам клеток. Меньшая чувствительность $res A^-$ -мутанта при α -облучении по сравнению с γ -облучением, выявленная в наших экспериментах, обуславливается указанными причинами.

Возрастание чувствительности Gam^r -мутанта к α -облучению определяется рядом обстоятельств. Как следует из /11/, высокая ре-

Таблица. Радиочувствительность клеток дикого типа и репарационных мутантов при γ - и α -облучении

Штаммы	$D_0^{-1}, 10^{-2} \text{ Гр}^{-1}$		Ф И Д *		О Б Э **
	γ -облучение	α -облучение	γ -облучение	α -облучение	
AB II57	$1,89 \pm 0,04$	$2,50 \pm 0,06$	I	I	$1,32 \pm 0,06$
AB 2463	$7,13 \pm 0,13$	$3,20 \pm 0,08$	$0,27 \pm 0,01$	$0,78 \pm 0,04$	$0,45 \pm 0,02$
Gam^r 444	$0,82 \pm 0,11$	$2,70 \pm 0,27$	$2,30 \pm 0,36$	$0,93 \pm 0,11$	$3,30 \pm 0,77$

$$* \text{ ФИД} = \frac{D_0 \text{ мутанта}}{D_0 \text{ клеток дикого типа}}$$

$$** \text{ ОБЭ} = \frac{\gamma\text{-облучение}}{\alpha\text{-облучение}}$$

зистентность к γ -облучению Gam^{r} -мутантов, полученных из родительского штамма АВ 1157, обуславливается главным образом меньшим выходом фермент-индуцированных ПДР ДНК, что достигается эффективной балансировкой ферментов, осуществляющих деградацию ДНК и процессы ресинтеза. С возрастанием L , как показано в /7/, выход ЭДР снижается, а частота образования ПДР ДНК резко увеличивается. В диапазоне $L \geq 150-200$ кэВ/мкм практически все ПДР являются ПДР ДНК. Поскольку репарации ПДР ДНК у Gam^{r} -мутанта, так же как и у клеток дикого типа, при дозах облучения, соответствующих средним летальным дозам, по-видимому, не происходит /8/, то величина D_0^{-1} при высоких L зависит главным образом от выхода ПДР ДНК. Следовательно, повышение чувствительности Gam^{r} -мутанта при α -облучении можно связать с возрастанием вклада в летальный эффект ПДР ДНК, выход которых определяется только физическими свойствами излучений и не зависит от влияния биологических факторов.

Таким образом, у изогенных мутантов *E. coli*, которые имеют либо генетический дефект в системе репарации ДНК, либо, наоборот, восстановительные системы у таких мутантов работают более эффективно, реакция клеток на γ - и α -облучение различна. У rec A^- -мутанта при α -облучении наблюдается уменьшение радиочувствительности, у суперрезистентного мутанта чувствительность к действию α -частиц возрастает. Эти факты свидетельствуют о генетической детерминированности характера зависимости $D_0^{-1}(L)$ у бактерий *E. coli*.

Авторы благодарны В.Л.Калинину и Л.А.Носкину за любезно предоставленные штаммы культур бактерий *E. coli*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Munson R.J. et al. *Int. J. Radiat. Res.*, 1967, 13, p. 205-224.
2. Yatagai F. et al. *J. Radiat. Res.*, 1975, 16, p. 99-112.
3. Корогодина В.И., Красавин Е.А. *Радиобиология*, 1982, 22, с. 727-738.
4. Козубек С., Красавин Е.А. ОИЯИ, 19-82-929, Дубна, 1982.
5. Козубек С., Красавин Е.А. ОИЯИ, 19-82-882, Дубна, 1982.
6. Козубек С., Красавин Е.А. ОИЯИ, 19-82-883, Дубна, 1982.
7. Козубек С., Красавин Е.А. ОИЯИ, 19-82-928, Дубна, 1982.
8. Козубек С., Красавин Е.А. ОИЯИ, 19-82-884, Дубна, 1982.
9. Бреслер С.Е., Носкин Л.А. *Радиобиология*, 1978, 18, с. 548-555.
10. Бреслер С.Е., Вербенко В.И., Калинин В.Л. *Генетика*, 1980, 16, с. 1753-1763.
11. Бреслер С.Е., Вербенко В.И., Калинин В.Л. *Генетика*, 1982, т. 18, с. 1245-1254.

Рукопись поступила в издательский отдел
28 декабря 1983 года.

Амиртаев К.Г. и др.

19-83-904

Роль репарации ДНК в биологической эффективности ионизирующих излучений разного качества. Влияние α -облучения на чувствительный и суперрезистентный мутанты бактерий *Escherichia coli*

Проведено исследование чувствительности бактерий *E. coli* K-12 дикого типа (wt), rec A13^- и $\text{Gam}^{\text{r}444}$ -мутантов к инактивирующему действию γ - и α -облучений. Показано, что кривые выживания wt и rec A^- -мутанта при γ - и α -облучении экспоненциальны в отличие от Gam^{r} -мутанта, для которого в обоих случаях получены сигмоидные кривые выживания. Наиболее резко выражены различия в радиочувствительности использованных штаммов *E. coli* при γ -облучении. Величины факторов изменения дозы /ФИД/, рассчитанные по отношению средних летальных доз (D_0), для rec A^- и Gam^{r} -мутантов к D_0 для wt соответственно составляют $0,27 \pm 0,01$ и $2,30 \pm 0,36$. При α -облучении наблюдается нивелирование чувствительности всех использованных штаммов *E. coli*. Для rec A^- и Gam^{r} -мутантов величины ФИД в этом случае соответственно составляют $0,78 \pm 0,04$ и $0,93 \pm 0,11$. Обсуждаются механизмы, определяющие различия в чувствительности разных штаммов *E. coli* к действию ионизирующих излучений разного качества.

Работа выполнена в Лаборатории ядерных проблем ОИЯИ.

Препринт Объединенного института ядерных исследований. Дубна 1983

Amirtaev K.G. et al.

19-83-904

The Role of DNA Repair in the Biological Effectiveness of Ionizing Radiation of Different Quality. The Influence of α -Radiation of the Radiosensitivity of Sensitive and Superresistant Mutants of *Escherichia Coli* Bacteria

The sensitivity of wild type cells, rec A13 and $\text{Gam}^{\text{r}444}$ mutants of *E. coli* to γ - and α -irradiation has been investigated. The survival curves of wild type and rec A^- mutant cells are exponential under our conditions in the case of both γ - and α -irradiation, meanwhile the survival curve of $\text{Gam}^{\text{r}444}$ mutant cells have pronounced shoulder even if irradiated by α -particles. The sensitivity of various mutants of *E. coli* to γ -irradiation markedly differs. The ratios of the sensitivities of different mutants to the sensitivity of wild type cells (DMF) are 0.27 ± 0.01 and 2.30 ± 0.36 in the case of rec A^- and $\text{Gam}^{\text{r}444}$ mutants respectively irradiated by γ -radiation. The sensitivities of different strains of *E. coli* come together for α -radiation. The values of DMF for α -particle: have been determined to 0.78 ± 0.04 for rec A^- and 0.92 ± 0.11 for $\text{Gam}^{\text{r}444}$ mutant cells. The mechanisms causing differences in sensitivities between various strains of *E. coli* irradiated by radiations of different LETs are considered.

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

Preprint of the Joint Institute for Nuclear Research. Dubna 1983

Перевод О.С.Виноградова