

**СООБЩЕНИЯ
ОБЪЕДИНЕННОГО
ИНСТИТУТА
ЯДЕРНЫХ
ИССЛЕДОВАНИЙ
ДУБНА**

P19-84-645

Е.А.Красавин

**ФАКТОРЫ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИЕ ХАРАКТЕР КРИВЫХ
ВЫЖИВАНИЯ БАКТЕРИЙ *ESCHERICHIA COLI*
ПРИ ДЕЙСТВИИ ИЗЛУЧЕНИЙ
С РАЗНОЙ ЛИНЕЙНОЙ ПЕРЕДАЧЕЙ ЭНЕРГИИ
Особенности организации генома
и форма кривых выживания**

1984

В^{1/1} нами рассмотрены основные этапы в развитии представлений о механизмах, определяющих форму кривых выживания (S) клеток в зависимости от дозы (D) облучения. Было отмечено, что разработанные в разное время математические модели в большинстве своем являются формальными, и на их основе часто оказывается невозможной однозначная интерпретация кривых выживания клеток про- и эукариот при действии ионизирующих излучений разного качества. Указывалось, что форма кривых S(D) определяется не только физическими характеристиками ионизирующих излучений, но и зависит от многих факторов биологической природы: особенностей организации генома, физиологического состояния клеток и т.д. Закономерности структурно-функциональной организации генетического аппарата в наибольшей степени изучены у прокариот и, прежде всего, у бактерий *E.coli*. Поэтому бактерии являются наиболее удобным объектом при выяснении влияния биологических факторов на характер дозовых кривых. Известно, что при γ -облучении бактерий *E.coli* выявляются как экспоненциальные, так и сигмоидные зависимости S(D). Условия, при которых реализуются экспоненциальные кривые выживания, т.е. кривые, линейные в полулогарифмическом масштабе, будут обсуждаться нами несколько позднее. Целью же настоящего сообщения является рассмотрение некоторых биологических механизмов, реализуемых у *E.coli* на молекулярном, клеточном и популяционном уровнях, которые могут обуславливать нелинейный характер зависимости S(D).

Как указывалось в^{1/1}, попытки учесть влияние биологических факторов на форму кривых выживания бактерий *E.coli* были предприняты в ряде "репарационных" и "молекулярных" моделей. Однако модельные представления "ограниченного восстановления", объясняющие наличие плеча на кривой S(D) как результат исчерпания при определенных дозах облучения запаса ферментов репарации, не согласуются с рядом обстоятельств. И прежде всего - с хорошо установленным фактом, свидетельствующим о многократном дублировании ферментов репарации в клетке. Например, в каждой клетке *E.coli* имеется $\sim 2 \cdot 10^3$ молекул фермента ДНК-лигазы^{2/}, $\sim 4 \cdot 10^2$ молекул ДНК-полимеразы I^{3/}. Эти ферменты, как известно, участвуют в реализации различных путей механизма восстановления нарушенной структуры ДНК. Простые расчеты показывают, что при выходе первичных одонитевых разрывов OP_1 ДНК, равном $5 \cdot 10^{-12}$ сГр⁻¹ дальтон⁻¹ ^{4/}, при дозах γ -облучения, соответствующих средним летальным (D_0), в геноме *E.coli* образуется около $100 \text{ OP}^{5/}$. С учетом этого можно полагать, что репарация быстрого типа (II), в которой принимает участие ДНК-полимераза I и ДНК-

лигаза, по-видимому, может осуществляться без ограничений, т.е. без дефицита необходимых ферментов репарации. К тому же не исключена, по-видимому, и возможность повторного использования указанных ферментов в процессе репарации ДНК.

При рассмотрении проблемы "плеча" на кривой выживания в рамках молекулярной модели Чедвика-Линхауса^{/6/} мы отмечали^{/1/}, что двунитевые разрывы /ДР/ ДНК из перекрывающихся независимых ОР у клеток млекопитающих образовываться не могут. В отличие от этого, у бактерий при γ -облучении вследствие обширной деградации ДНК имеет место высокий выход ДР из перекрывающихся ОР^{/7/}. При образовании энзиматических ДР /ЭДР/ из перекрывающихся однонитевых брешей на противоположных нитях ДНК имеет место возрастание количества индуцируемых ЭДР с увеличением дозы облучения, причем пропорциональность соблюдается лишь для достаточно больших доз облучения. При малых дозах экзонуклеазная расчистка не восстанавливаемых репарацией II одонитевых разрывов /ОР₂/ ДНК происходит, как отмечалось в^{/8/}, лишь на некоторое максимальное расстояние (ℓ_0) и не приводит к возникновению ЭДР. Вследствие этого можно предположить, что величина ℓ_0 может обуславливать нелинейность выхода ЭДР в области малых доз облучения, а следовательно, и сигмоидный характер зависимости $S(D)$ ^{/7/}. Учитывая, что процесс деградации ДНК у *E.coli* при облучении может быть одним из факторов, определяющих сигмоидный характер кривой $S(D)$, рассмотрим более подробно закономерности деградации ДНК у бактерий.

ДЕГРАДАЦИЯ ДНК У *E.COLI*

Известно, что у бактерий, в отличие от клеток эукариот, происходит интенсивная пострадиационная деградация /ПД/ ДНК. Зависимость количества деградированной ДНК от времени пострадиационной инкубации клеток описывается кинетикой первого порядка, причем начальный участок кинетической кривой не зависит от дозы облучения, а лишь изменяется общий объем деградированной ДНК^{/9/}. Количество деградированной ДНК вначале линейно увеличивается с дозой облучения, а при дальнейшем возрастании дозы повышения размеров деградации ДНК не происходит. Степень деградации ДНК заметно варьирует у разных штаммов *E.coli* дикого типа и неодинаково выражена у чувствительных мутантов. Клетки *rolA*⁻-мутанта, в отличие от *uvr*⁻-мутантов, выявляют повышенную деградацию ДНК по сравнению с клетками дикого типа^{/10/}. *Rec*⁻-мутантам свойствен различный характер ДР: клетки *recA*⁻-мутанта выявляют исключительно высокую степень деградации, вплоть до полного распада генома^{/11/}, в то же время у *recB*⁻-мутантов деградация ДНК выражена слабо^{/12/}.

На величину ПД оказывают влияние многочисленные факторы физической и химической природы. Уменьшение парциального давления

кислорода в среде, присутствие радиопротекторов, ряда химических агентов, понижение температуры до 0°C замедляют ПД^{/13-15/}. Наоборот, выращивание клеток в условиях бедной среды или в присутствии ингибиторов белкового синтеза приводит к повышению размеров деградации ДНК^{/9/}. Следует заметить, что степень ПД можно уменьшить предварительным УФ-или γ -облучением клеток в относительно небольших дозах^{/16/}.

При анализе закономерностей деградации ДНК у бактерий было обращено внимание на неравномерность распределения деградированной ДНК по облученной популяции клеток. Согласно^{/9/}, ПД в клетках *E.coli* В реализуется по принципу "все или ничего", т.е. в одних клетках степень деградации ДНК низкая, в других - ДНК деградирует практически полностью. Наиболее резко выраженную неравномерность деградации ДНК при облучении, по-видимому, следует ожидать у *rec*⁻-мутантов, поскольку известно, что у таких клеток и без облучения отмечается неравномерность содержания ДНК по клеточной популяции. У штаммов с мутацией в различных локусах гена *rec* часть клеточной популяции не делится, и у таких клеток утрачена способность синтезировать ДНК^{/17/}.

Эксперименты по защитному влиянию предварительного γ - или УФ-облучения, а также данные о модифицирующем действии ингибиторов синтеза белка и РНК на интенсивность ПД ДНК позволили сделать заключение о том, что у некоторых штаммов бактерий в ответ на повреждающее действие ряда факторов в клетках синтезируется индуцибельный ингибитор ПД ДНК^{/9,18/}. Первоначальные попытки связать образование ингибитора ПД с существованием в клетках профага оказались несостоятельными. Позднее выяснилось, что процесс деградации ДНК находится под сложным генетическим контролем ряда структурных и регулярных генов. Рассмотрим более подробно генетическую регуляцию процесса ПД ДНК у *E.coli*.

Известно, что процесс деградации ДНК у *E.coli* осуществляется сложным комплексом ферментов, обладающих экзонуклеазной активностью. Выявлено несколько типов экзонуклеаз, осуществляющих гидролиз ДНК, однако наиболее мощным ферментом клетки с указанной активностью является *recBC*-зависимая экзонуклеаза ν ^{/19/}. Данный фермент имеет, помимо АТФ-зависимой одно- и двутяжевой экзонуклеазной, еще и одонитевую эндонуклеазную активность^{/20/}. Присоединяясь к разорванным концам одной нити двутяжевой ДНК, фермент раскручивает дуплексную нить, деградирует один из ее тяжей, оставаясь при этом связанным с другой комплементарной нитью. После того как экзонуклеаза гидролирует участок, достигающий размера в несколько тысяч нуклеотидов^{/21/}, действие фермента прекращается на вторую нить при использовании эндонуклеазной активности. При отсутствии в клетке фактора, ограничивающего действие экзонуклеазы ν , ДНК в клетке может полностью гидролизироваться. Ингибитором ПД ДНК у *E.coli* является продукт *recA*-гена - *recA*-белок^{/22/}. Установлено, что *recA*-белок связывается с одонитевыми участками поврежденной ДНК и препятству-

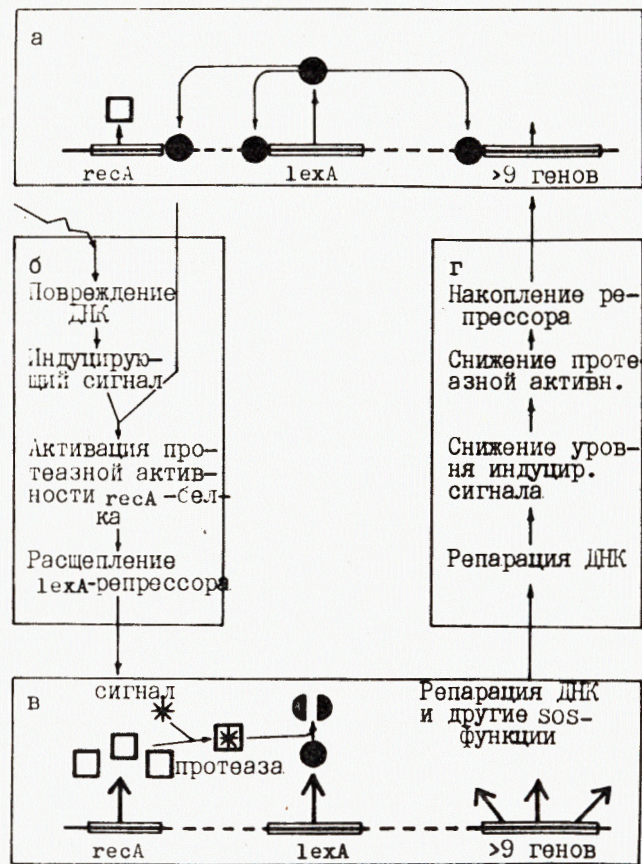


Рис.1. Схема регуляции SOS-системы у *E. coli*^{/22/}, а - состояние системы у нормальных экспоненциально растущих клеток; б - переход системы в индуцированное состояние; в - индуцированное состояние; г - переход системы в нормальное состояние.

ет действию экзонуклеазы ν ^{/23/}. Синтез *recA*-белка в интактных клетках репрессирован *lexA*-белком^{/22/}, однако определенный конститутивный уровень *recA*-белка постоянно поддерживается. При появлении в клетке продуктов деградации ДНК /возможно, олигонуклеотидов/, последние активируют *recA*-белок /рис.1/. Активированный белок, прибрегающий в этом случае протеолитические свойства, инактивирует продукт *lexA*-гена, снимая тем самым репрессию собственного синтеза. Дерепрессия *recA*-гена приводит к интенсивному синтезу *recA*-белка, который ограничивает ПД ДНК. Следовательно, можно предполагать, что указанный механизм, являющийся частью механизма SOS-репарации, представляет собой

систему "обратной связи", функционирующую в клетке и направленную на предотвращение распада генома в случае возникновения обширных деструктивных изменений в ДНК.

В^{/8/} при рассмотрении закономерностей индукции и репарации повреждений ДНК у *E. coli* мы отмечали, что вероятность трансформации первичных повреждений ДНК в односторонние разрывы /OP₁ и OP₂/ может определяться балансом ферментов репарации, осуществляющих деградацию и ресинтез поврежденных участков ДНК. Большая часть этих повреждений восстанавливается репарацией быстрого типа, однако определенная доля OP трансформируется в обширные бреши в нитях ДНК. Можно предположить, что в тех клетках, где система "обратной связи" не может нормально функционировать, экзонуклеаза приведет к образованию обширной деградации ДНК. У клеток же с нормальной регуляцией *lexA-recA*-генов деградация ДНК будет ограниченной и определяться динамичностью экспрессии *lexA-recA*-системы. Наиболее ярко неравномерность ПД ДНК проявляется у *recA*⁻-мутантов, у которых, как уже отмечалось, степень ПД крайне велика. У необлученных клеток *recA*⁻-мутантов наличие значительного числа неделящихся клеток с резко сниженным содержанием ДНК, очевидно, отражает развитие обширной деградации ДНК в результате экзонуклеазного перехвата спонтанных OP, образующихся в процессе репликации бактериальной хромосомы^{/17/}.

Таким образом, общий объем деградации ДНК в облученной популяции клеток, по-видимому, складывается из двух процессов: ограниченной деградации ДНК у части клеток /репарационная деградация/ с нормальной экспрессией *lexA-recA*-генов, и обширной деградации у клеток с нарушенной функцией *lexA-recA*-системы /по клеточная деградация ДНК^{/9/}/. Эти процессы, как уже отмечалось, могут влиять на форму кривых выживания клеток: от размеров репарационной деградации ДНК зависит величина плеча и наклон кривой S(D), а по клеточная деградация в области малых доз облучения маскирует сигмоидность кривых S(D) за счет высокой радиочувствительности части клеточной популяции.

Экспоненциальность кривых выживания *recA*⁻-мутантов, их высокая радиочувствительность при практически полностью подавленной способности к генетической рекомбинации предопределили мнение о решающей роли рекомбинационной репарации в характере дозовых кривых и радиочувствительности клеток *E. coli*^{/24/}. В этой связи рассмотрим некоторые закономерности генетической рекомбинации у бактерий и роль этого процесса в радиочувствительности клеток.

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ РЕКОМБИНАЦИЯ И РАДИОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ *E. COLI*

Известно, что основным регулятором общей рекомбинации у *E. coli* является *recA*-белок^{/22/}. Продукт гена *recA*, мутация в котором блокирует все пути рекомбинации, имеет по крайней мере три активных центра^{/22, 23, 25/}. Один из них, обладающий спо-

способностью к специфической протеолитической дерепрессии ряда индуцибельных оперонов, приобретает активную конформацию лишь при появлении в клетке необходимого индуктора. Механизм его регуляции рассмотрен нами выше. Другой активный центр кооперативно связывается с однонитевыми пробелами в ДНК. Третий каталитический центр в присутствии АТФ и ионов магния осуществляет обмен нитями ДНК между дуплексами по нуклеотидной гомологии при наличии в одном из дуплексов однотяжевой брешы. "Рекомбинационный" центр *recA*-белка, считавшийся ранее конститутивным, по-видимому, как выяснилось в последнее время, также должен активироваться для осуществления рекомбинантного обмена^{/26/}. Активация *recA*-белка происходит в этом случае при связывании его с эффектором - однотяжевными участками ДНК и, возможно, олигонуклеотидами. Следовательно, частота рекомбинантных обменов у *E.coli* определяется, с одной стороны, количеством молекул *recA*-белка, с другой - скоростью их активации. В свою очередь, скорость активации и синтеза *recA*-белка зависит от уровня индуцируемых эффекторов - однонитевых пробелов в молекуле ДНК. Частота рекомбинантных обменов в клетках при облучении в таком случае будет зависеть от числа однонитевых пробелов в молекуле ДНК, образующихся в результате действия *recBC*-экзонуклеазы, либо *recF*-продукта, и от скорости активации *recA*-белка. Возникает вопрос - влияет ли генетическая рекомбинация на форму кривых выживания клеток *E.coli*, и если влияет, то на каких участках кривых *S(D)* - в области плеча или на величине угла наклона экспоненциального участка - может сказываться это влияние. В этой связи следует обратить внимание на следующие обстоятельства.

В^{/27/} показано, что чувствительность *recA*⁻ и *lexA*⁻-мутантов *E.coli* K-12 к облучению электронами 6 МэВ практически одинаково высока и кривые *S(D)* экспоненциальны. В то же время известно^{/28/}, что у *lexA*⁻-мутанта способность к генетической рекомбинации практически не отличается от клеток дикого типа, а у *recA*⁻-мутанта рекомбинация полностью подавлена. Аналогичная ситуация отмечается и в^{/29/} при рентгенооблучении мутантов *lexB*⁻ и *zab*⁻. Эти мутации, супрессирующие проявление мутации *tif-1* и ряда других индуцибельных *recA*-*lexA* зависимых функций, обуславливают высокую чувствительность к рентгеновским лучам и УФ-облучению. Вместе с тем у данных штаммов не нарушен процесс рекомбинации. Так как для рекомбинантного обмена необходимы два дуплекса ДНК, то такой обмен, очевидно, невозможен при отсутствии в клетке реплицированного гомолога. В этой связи обращают на себя внимание данные^{/30/}, где показано, что чувствительность бактерий *E.coli* к γ -облучению не зависит от количества копий генома на клетку. Чувствительность клеток с однокопийным геномом была такой же, как и у клеток с несколькими копиями генома. Аналогичные результаты, свидетельствующие об одинаковой радиочувствительности термочувствительного *dnaA*-мутанта, культивируемого при пермис-

сивных и непермиссивных условиях, получены и в^{/31/}. Поскольку у данного мутанта при непермиссивной температуре нарушается процесс инициации репликации ДНК и отсутствует гомолог, с участием которого возможен рекомбинантный обмен, одинаковая радиочувствительность клеток с нормальной и подавленной способностью к репликации может свидетельствовать о минорной роли генетической рекомбинации в радиорезистентности бактерий *E.coli*. С учетом того, что рекомбинантный обмен, как указывалось выше, возможен лишь на реплицированных участках бактериальной хромосомы гомологичных по нуклеотидной последовательности, очевидно, что роль данного процесса в характере кривых выживания клеток нельзя рассматривать в отрыве от особенностей репликации ДНК у бактерий *E.coli*. С этой целью для оценки возможного влияния процесса генетической рекомбинации на форму кривых выживания клеток рассмотрим особенности репликации бактериальной хромосомы у *E.coli* на протяжении клеточного цикла.

ОСОБЕННОСТИ РЕПЛИКАЦИИ ХРОМОСОМЫ У БАКТЕРИЙ *E.COLI*

Известно, что бактериальная хромосома является единым репликоном, имеющим один небольшой участок инициации репликации (ORI) ДНК^{/32/}. Бактериальный репликон содержит собственный репликатор - участок ДНК, включающий ORI и набор генов, контролирующих инициацию репликации. Процесс удвоения бактериальной хромосомы начинается с одного ORI, идет в обоих направлениях и состоит из трех стадий: инициации, стадии элонгации нитей от ORI и стадии терминации. Установлено^{/33/}, что контроль разных стадий репликации осуществляют несколько генов. Инициация процесса контролируется не только генами, входящими в репликатор, но и рядом других генов: *dnaA*, *dnaC*, *polD*, *dnaH*, *dnaJ*. Элонгация нитей находится под контролем генов *dnaB*, *dnaG*, *dnaS*, *dnaZ*.

В^{/34/} на клетках *E.coli* B/r показано, что скорость репликации хромосомы в экспоненциально растущей культуре является постоянной, и время полного раунда репликации составляет ~41 мин. Аналогичная величина была получена и для другого штамма бактерий - *E.coli* K-12^{/35/}. Поскольку после завершения стадии репликации деление клетки происходит через ~20 мин, то весь клеточный цикл у *E.coli* составляет примерно 61 мин.

Особенности репликации бактериальной хромосомы, в отличие от хромосом эукариот, состоят в том, что при определенных условиях еще до завершения раунда репликации на вновь реплицированных участках ДНК возникают новые участки инициации репликации^{/34/}. Это происходит, когда время удвоения количества ДНК в клетке составляет менее 40 мин. В зависимости от скорости удвоения ДНК в клетке в пределах 40-20 мин одновременно может содержаться до 6 репликативных вилок /рис.2/. Как можно видеть, при скорости удвоения ДНК, равной 60 мин, репликация начинается сразу

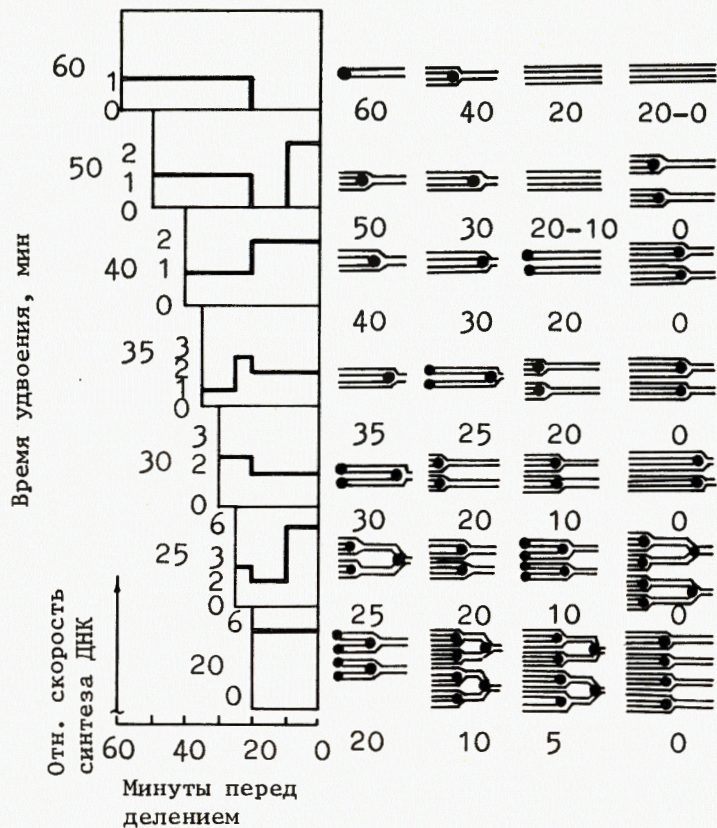


Рис.2. Репликация ДНК у клеток *E.coli* при различном времени удвоения ДНК^{/34/}. В правой части рисунка показана конфигурация хромосомы в различное время перед делением клетки. Цифрами обозначено время, предшествующее делению /в мин/; темными кружками указаны точки репликации.

после клеточного деления. Эти вновь образовавшиеся клетки содержат одну начинающую реплицироваться хромосому, которая удваивается в течение 40 мин, и в последующие 20 мин такие клетки имеют две полных, не начавших реплицироваться, хромосомы. Через 20 мин после завершения деления цикл репликации повторяется. Следовательно, в определенные периоды цикла клетка содержит от одной до двух копий генома. У клеток, время удвоения ДНК которых составляет 50 мин, репликация хромосомы начинается за 10 мин перед цитотомией, так что в течение 10 мин перед делением в клетке имеется более чем две копии генома. Как видно из рис.2, количество репликативных вилок на клетку для еще более

активно растущих культур будет возрастать с уменьшением времени удвоения ДНК.

Количественная оценка среднего числа геномов в клетке была проведена в^{/34/}. Полагая, что скорость синтеза ДНК (k) в точке репликации постоянна /или равна 0/ и клеточный цикл разделен на n интервалов, можно записать, что положение клетки в цикле к окончанию каждого интервала будет $x_1, x_2 \dots x_n$. Если F_i - число точек репликации в i -том интервале, то общий объем синтеза ДНК в данном интервале есть kF_i . Следовательно, если $G(0)$ есть количество ДНК, соответствующее одной копии генома /ОГ/ на клетку при $x = 0$, то общее число ОГ на клетку при нахождении клетки в положении x $G(x)$ будет:

$$\begin{aligned}
 G(x) &= F_1 kx + G(0) = & 0 \leq x \leq x_1 \\
 &= F_2 kx + x_1 k(F_1 - F_2) + G(0) = & x_1 \leq x \leq x_2 \\
 &= F_3 kx + x_1 k(F_1 - F_2) + x_2 k(F_2 - F_3) + G(0) & x_2 \leq x \leq x_3 \\
 &= F_n kx + k \sum_{i=1}^{n-1} x_i (F_i - F_{i+1}) + G(0) & x_{n-1} \leq x \leq x_n
 \end{aligned} \quad /1/$$

Используя функцию распределения клеток $N(x)$ для идеально-экспоненциальной растущей культуры^{/36/}

$$N(x) = (\ln 2) 2^{(1-x)}, \quad /2/$$

получаем среднее число ОГ на клетку \bar{G} как

$$\bar{G} = \frac{\int_0^1 N(x) G(x) dx}{\int_0^1 N(x) dx} \quad /3/$$

Подставляя уравнения /1/ и /2/ в уравнение /3/ и принимая, что $G(1) = 2G(0)$, получаем

$$\bar{G} = \frac{k}{\ln 2} \left[\sum_{i=1}^{n-1} 2^{(1-x_i)} (F_{i+1} - F_i) + (2F_1 - F_n) \right] \quad /4/$$

Таким образом, у *E.coli* взаимосвязь между числом репликонов и количеством ДНК определяется частотой событий инициации репликации. Частота этих событий регулируется внутриклеточной концентрацией отрицательных трансэффекторов, подавляющих инициацию^{/37/}. Концентрация негативных трансэффекторов, в свою очередь, определяется массой синтезируемой ДНК. В условиях богатой среды интенсивность образования новых ORI будет высокой, что приводит к многокопийности генома, в условиях же бедной среды геном *E.coli* будет приближаться к однокопийному.

Хорошо известно^{/38/}, что при ингибировании синтеза белка и РНК происходит подавление инициации новых репликонов, однако блокирования элонгации нитей ДНК в этих условиях не наблюдается, и иницированные репликоны завершают полный раунд репликации. В свете изложенного можно прийти к заключению о том, что особенности репликации ДНК у *E.coli* при разных условиях культивирования могут влиять на характер кривых выживания клеток при облучении. Действительно, для инактивации клеток, выращенных в условиях богатой среды и имеющих несколько копий генома на клетку, необходимо возникновение нескольких инактивирующих событий попадания в чувствительные мишени, поскольку при неповреждении хотя бы одной из копий генома, клетка способна образовать макроколонию, то есть "выжить". Очевидно, что зависимость $S(D)$ в этом случае будет иметь сигмоидный вид. Следовательно, особенности репликации ДНК у *E.coli*, несомненно, играют важную роль в формировании сигмоидного характера кривой выживания. С другой стороны, у клеток, выращиваемых в богатой среде при подавлении синтеза белка специфическими ингибиторами или при инкубировании клеток в непермиссивных условиях, инициации новых репликонов не происходит, а элонгация нитей успешно завершается. Исчезновение многокопийности генома должно в этом случае отражаться на кривой $S(D)$, приводя, по-видимому, к уменьшению величины плеча.

При анализе характера кривых выживания чувствительных мутантов следует иметь в виду, что популяция таких клеток, как правило, весьма гетерогенна по ряду признаков. Например, культуры бактерий с мутацией в различных локусах гена *tes* состоят из трех типов клеток^{/17/}: жизнеспособных, дающих макроколонию на твердой питательной среде и совершающих более 20 делений; условно жизнеспособных, дающих не более 2-5 генераций; и неделящихся клеток. Для *tesA*⁻-мутанта соотношение разных типов клеток соответственно составляет: 0,66; 0,13; 0,21, а для тройного *tesA*⁻*tesB*⁻*tesC*⁻-мутанта: 0,18; 0,40 и 0,42. Имеются основания полагать, что при γ -облучении может происходить сдвиг указанных соотношений в сторону условно делящихся и неделящихся клеток. Это означает, что на кривой выживания в области малых доз облучения могут возникать "прогибы" за счет высокой чувствительности некоторой доли популяции *tes*⁻-мутантов, переходящих в класс условно делящихся и неделящихся клеток, которые не участвуют в образовании макроколоний. Поскольку процесс образования новых ORI и количество копий генома в зависимости от среды роста у *tes*⁻-мутантов, образующих макроколонию, сходен, по-видимому, с таковым у клеток дикого типа^{/24/}, можно ожидать, что феномен поклеточной деградации ДНК, обуславливающий перераспределение клеток по вышеуказанным трем типам, и механизмы, приводящие к многокопийности генома, могут обуславливать сложный характер кривых $S(D)$ у *tes*⁻-мутантов.

Выше указывалось, что в процессе генетической рекомбинации участвуют два гомологичных по нуклеотидной последовательности дуплекса ДНК, и влияние рекомбинационной репарации на форму кривых выживания нельзя рассматривать без учета особенностей репликации бактериальной ДНК. Хотя генетическая рекомбинация, как это следует из приведенных выше данных по радиочувствительности *lex*⁻ и *tes*⁻-мутантов, не влияет на величину угла наклона кривых $S(D)$, процесс этот может играть определенную роль в формировании плеча кривых выживания. Несомненно, что и многокопийность генома, имеющая место у *E.coli* в определенных условиях роста, является фактором, обуславливающим сигмоидность кривых $S(D)$. Поскольку процесс рекомбинации органично связан с процессом репликации, очевидно, что весьма трудно вычленить возможный удельный вклад первого из них в формирование плеча на кривых выживания. В этом смысле являлись бы информативными эксперименты с мутантами, дефектными по рекомбинации, но с нормально протекающими процессами репликации ДНК. Однако у таких клеток часто наблюдается резко выраженная "поклеточная" деградация ДНК, в значительной мере модифицирующая характер кривых выживания клеток.

Таким образом, мы рассмотрели основные факторы биологической природы, которые могут, по нашим представлениям, обуславливать нелинейный в полулогарифмическом масштабе, сигмоидный характер кривых выживания бактерий *E.coli*. Указанная нелинейность может обуславливаться причинами, реализуемыми на молекулярном уровне /репарационная и "поклеточная" деградация ДНК/, на клеточном уровне /особенности репликации ДНК и генетическая рекомбинация на гомологических участках/ и на популяционном уровне /гетерогенность популяции, связанная с прохождением клетки по циклу/. С учетом этих обстоятельств появляется возможность проведения количественного анализа влияния указанных факторов на форму кривых выживания бактерий *E.coli* при действии ионизирующих излучений разного качества.

ЛИТЕРАТУРА

1. Козубек С., Красавин Е.А. ОИЯИ, 19-84-55, Дубна, 1984.
2. Sadowsky P. et al. Cold Spring Harbor Symp. on Quant. Biol., 1968, 33, p.165-177.
3. Kornberg A. Cold Spring Harbor Symp. on Quant. Biol., 1979, 43, part 1, p.1-9.
4. Johansen I. et al. Proc.Nat.Acad.Sci.USA, 1975, 72, p.167-171.
5. Козубек С., Красавин Е.А. ОИЯИ, 19-83-715, Дубна, 1983.
6. Chadwick H., Leenhauts H.P. Phys.Med.Biol., 1973, 18, p.78-87.
7. Бреслер С.Е., Носкин Л.А. Радиобиология, 1978, 18, с.548-555.

8. Козубек С., Красавин Е.А. Радиобиология, 1984, 24, с.456-461.
9. Pollard E.C., Randall E.P. Radiat.Res., 1973, 55, p.265-279.
10. Hamelin C. et al. J.Bacteriol., 1976, 127, p.1307-1314.
11. Clark A.J. Annu.Rev.Genet., 1973, 7, p.67-86.
12. Youngs D.A., Bernstein I.A. J.Bacteriol., 1973, 113, p.901-906.
13. Pollard E.C., Achey P.M. Radiat.Res., 1966, 27, p.419-433.
14. Cramp W.A., Watkins D.K. Radiat.Res., 1970, 41, p.312-325.
15. Pollard E.C. Curr.Top.Radiat.Res., 1970, 6, p.51-127.
16. Pollard E.C., Billen D., Achey P.M. J.Radiat.Biol., 1974, 26, p.107-119.
17. Capaldo F.N. et al. J.Bacteriol., 1974, 118, p.242-249.
18. Pollard E.C., Fugate J.K. Biophys.J., 1978, 24, p.429-437.
19. Linn S., Mackay V. In: Molec.Mechan. for Repair of DNA. (Ed. by P.C.Hanawalt, R.B.Setlow). Plenum Press, 1975, p.293-299.
20. Goldmark P.J., Linn S. J.Biol.Chem., 1972, 247, p.1849-1860.
21. Mackay V., Linn S. J.Biol.Chem., 1974, 249, p.4286-4294.
22. Little J.W., Mount D.W. Cell, 1982, 29, p.11-22.
23. Williams J.G. et al. J.Biol.Chem., 1981, 256, p.7573-7582.
24. Krasin F., Hutchinson F. J.Molec.Biol., 1977, 116, p.81-98.
25. Castellazzi M. et al. Molec.gen.Genet., 1977, 153, p.297-310.
26. Томилин Н.В. Генетическая стабильность клетки. "Наука", Л., 1983.
27. Moody E.M. et al. Molec.gen.Genet., 1973, 121, p.197-205.
28. Howard-Flanders P., Boyce R. Radiat.Res.Suppl., 1966, 6, p.156-184.
29. Devoret R., Blanco M. Molec.gen.Genet., 1970, 107, p.272-280.
30. Bridges V.A. J.Bacteriol., 1971, 108, p.944-946.
31. Жестяников В.Д. Репарация ДНК и ее биологическое значение. "Наука", Л., 1979.
32. Von Meyenburg K. et al. Cold Spring Harbor Symp. on Quant. Biol., 1979, 43, part 1, p.121-128.
33. Geider K. Curr.Top.Microbiol.Immunol., 1976, 74, p.55.
34. Cooper S., Helmstetter C. J.Mol.Biol., 1968, 31, p.519-540.
35. Chandler M. et al. J.Mol.Biol., 1975, 94, p.127-132.
36. Sueoka N., Yoshikawa H. Genetics, 1965, 52, p.747.
37. Pritchard R.H. In: DNA Synthesis. (Ed. by I.Molineaux, M.Kohyama). N.I., London, 1978, p.1-26.
38. Evans I.M., Eberle H. J.Bacteriol., 1975, 121, p.883-891.

Рукопись поступила в издательский отдел
20 сентября 1984 года.

Красавин Е.А.

P19-84-645

Факторы, определяющие характер кривых выживания бактерий *Escherichia coli* при действии излучений с разной линейной передачей энергии. Особенности организации генома и форма кривых выживания

Рассматриваются некоторые биологические механизмы, реализуемые на молекулярном, клеточном и популяционном уровнях и обуславливающие характер зависимости выживания (S) клеток *E.coli* от дозы (D) облучения. Показано, что одной из возможных причин нелинейного характера зависимости S(D), реализуемых на молекулярном уровне, являются особенности деградации ДНК у бактерий. Обсуждаются механизмы генетического контроля "репарационной" и "по клеточной" деградации ДНК. Рассмотрены некоторые закономерности генетической рекомбинации и репликации ДНК у *E.coli*. Делается вывод о том, что одним из основных факторов, обуславливающих сигмовидную форму кривых выживания бактерий *E.coli*, являются особенности репликации бактериальной хромосомы.

Работа выполнена в Лаборатории ядерных проблем ОИЯИ.
Сообщение Объединенного института ядерных исследований. Дубна 1984

Перевод О.С.Виноградовой

Krasavin E.A.

P19-84-645

Factors Determinating the Shape of Survival Curves of *Escherichia Coli* Cells Irradiated by Ionizing Radiation with Different LET. Peculiarities of Genom Organization and the Shape of Survival Curves

The basic biological mechanisms realized on molecular, cellular and population levels and stipulating for the shape of dependence of the cell survival (S) on the dose (D) are considered. One of the possible causes of nonlinear S(D) dependence are the peculiarities of DNA degradation in *E.coli* cells. The mechanisms of genetic control of different types of degradation are discussed. Some regularities of the genetic recombination and replication of DNA in *E.coli* are considered. The conclusion is made that one of the basic factors stipulating for the shoulder on the survival curves in *E.coli* are the peculiarities of the chromosome replication.

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

Communication of the Joint Institute for Nuclear Research. Dubna 1984