

сообщения
объединенного
института
ядерных
исследований
дубна

P19-84-653

С.Козубек, Е.А.Красавин

ФАКТОРЫ,
ОПРЕДЕЛЯЮЩИЕ ХАРАКТЕР КРИВЫХ
ВЫЖИВАНИЯ БАКТЕРИЙ *ESCHERICHIA COLI*
ПРИ ДЕЙСТВИИ ИЗЛУЧЕНИЙ
С РАЗНОЙ ЛИНЕЙНОЙ ПЕРЕДАЧЕЙ ЭНЕРГИИ
Форма кривых выживания
чувствительных мутантов при γ -облучении

1984

Известно, что многие нарушения в механизме репарации ДНК у бактерий приводят к повышению их радиочувствительности^{/1/}. Высокая чувствительность к облучению свойственна и rec^- -мутантам *E.coli*, имеющим дефекты в системе медленной репарации ДНК^{/1/}. Обычно принято считать, что мутации в различных локусах гена rec приводят не только к увеличению радиочувствительности клеток, но и обуславливают экспоненциальный характер зависимости выживания (S) клеток от дозы (D) облучения. Однако известно, что в некоторых случаях и у rec^- -мутантов при γ -облучении наблюдаются сигмоидные кривые выживания^{/2/}. Прежде чем провести анализ влияния различных факторов на форму зависимости S(D) у $rec A^-$, $rec B^-C^-$ и $rec A^-B^-C^-$ -мутантов *E.coli*, рассмотрим некоторые особенности роста культур клеток с мутациями в разных локусах гена rec .

Установлено^{/3/}, что культуры rec^- -мутантов растут медленнее, чем культуры клеток дикого типа. В табл.1 для разных штаммов *E.coli* представлены данные, характеризующие время удвоения количества клеток в культуре (T) и их способность к образованию макроколоний. Из таблицы видно, что для rec^- -мутантов по сравнению с клетками дикого типа характерно, во-первых, возрастание величины T и, во-вторых, снижение способности к образованию макроколоний. Причем уменьшение способности мутантов к образованию макроколоний нельзя объяснить увеличением T. В этом случае, как показано в^{/3/}, возрастание T у таких штаммов соответствовало бы вероятности успешного деления клетки, равной ~0,82.

Таблица 1

Время удвоения количества клеток в культуре у разных штаммов *E.coli* и их способность к образованию макроколоний^{/3/}

Генотип	Время удвоения, мин	Число клеток, образующих макроколонию, %
rec^+	40	100
$rec A^-$	56	66
$rec B^-C^-$	56	34
$rec A^-B^-C^-$	60	18

Однако вероятность образования макроколоний, как видно из табл.1, у мутантов составляет 0,18-0,6, что противоречит экспериментальным данным. Для объяснения этого несоответствия в рамках модели, предложенной в ^{3/}, было сделано предположение о существовании трех классов клеток: клеток класса А, способных к образованию макроколоний, класса В - клеток с ограниченной способностью к делению и не образующих макроколонии, и класса С - неделящихся клеток. При этом допускалось, что из клеток типа А при делении с некоторой вероятностью образуются клетки типа В и из В-клеток с некоторой вероятностью возникают клетки типа С. Из клеток А-типа клетки типа С возникнуть не могут. В рамках предложенной модели после вычисления вероятностей переходов клеток из класса А в классы В и С, можно получить время удвоения клеточной популяции, предполагая одинаковое время клеточного цикла у дикого штамма и клеток класса А и В у гес⁻мутантов. Экспериментальная проверка модели показала ее хорошее соответствие гес В⁻С⁻ и гес А⁻В⁻С⁻-штаммам. Определение фракции неделящихся клеток в опыте выявило 13% таких клеток у гес А⁻мутанта и ~40% у гес В⁻С⁻ и гес А⁻В⁻С⁻-мутантов.

Изучение классов клеток А, В и С, приведенное в ^{4/}, где в качестве критерия жизнеспособности использовались некоторые метаболические характеристики клеток, выявило у гес А⁻мутанта примерно такое же, как и в ^{3/}, количество метаболически неактивных и, следовательно, не образующих макроколонии, клеток. Доля их составила ~15%. Однако у гес В⁻С⁻ и гес А⁻В⁻С⁻-мутантов было обнаружено существенно меньшее число клеток типа С, соответственно равное 25% и 31%. Авторы отмечают, что между клетками типа А и В по их метаболическим характеристикам нет различий, за исключением ограниченной способности клеток класса В к делению. Следует заметить, что у неделящихся клеток гес А⁻мутанта резко снижено содержание ДНК, в то же время содержание ДНК у таких клеток гес В⁻С⁻ и гес А⁻В⁻С⁻-штаммов практически не нарушено.

Модельные представления, развитые в ^{3/}, хорошо соответствуют экспериментальным данным, полученным на гес В⁻С⁻ и гес А⁻В⁻С⁻-мутантах, однако для клеток гес А⁻-штамма такого соответствия нет. Создается впечатление, что гес А⁻мутанту по сравнению с гес В⁻С⁻ и гес А⁻В⁻С⁻-штаммами свойственна меньшая гетерогенность клеточной популяции по способности клеток к образованию макроколоний. У гес А⁻мутанта, по-видимому, можно выделить лишь два типа клеток: А - класс жизнеспособных, образующих макроколонии, и С-класс - нежизнеспособных, неделящихся. Поскольку указанное обстоятельство может иметь значение для формы кривых выживания гес⁻мутантов, рассмотрим этот вопрос более подробно.

Как известно, клетки гес А⁻-штамма неспособны синтезировать гес А-белок, одной из функций которого является ограничение нуклеазной активности гес ВС-экзонуклеазы V. Различные повреж-

дения ДНК, приводящие к нарушению ее структурной целостности, могут стать объектом нуклеазной атаки и привести к обширной экзонуклеазной деградации ДНК, которую осуществляет, главным образом, гес ВС-экзонуклеаза. Согласно ^{1,5/}, у гес А⁻мутанта такими повреждениями могут являться физиологические ОР ДНК, возникающие при репликации хромосомы. У некоторой части клеток с мутацией в гене гес такие ОР могут приводить к практически полной утрате генома вследствие обширной деградации ДНК. В этом случае клетки теряют способность к делению и становятся метаболически неактивными. Вследствие неограниченной деградации ДНК у гес А⁻мутанта, по-видимому, отсутствует промежуточный класс клеток с частично деградированным геномом. В отличие от этого, у гес В⁻С⁻ и гес А⁻В⁻С⁻-мутантов ввиду отсутствия гес ВС-экзонуклеазы деградация ДНК имеет ограниченный характер. Поэтому культуры указанных штаммов могут иметь клетки, геном которых имеет повреждения разной степени выраженности. Следовательно, можно полагать, что у гес А⁻мутанта макроколонии возникают из идентичных по содержанию ДНК и физиологическому состоянию клеток, а у гес В⁻С⁻ и гес А⁻В⁻С⁻-мутантов макроколонии образуются из клеток с разным состоянием генома. На основании изложенного можно прийти к заключению о том, что модельные представления, развитые в ^{3/}, действительно должны хорошо описывать рост культур гес В⁻С⁻ и гес А⁻В⁻С⁻-мутантов и не соответствовать клеткам гес А⁻мутанта. В связи с этим рассмотрим количественные закономерности способности гес А⁻мутанта E.coli к образованию макроколоний.

Обозначим S_0 - вероятность образования макроколонии жизнеспособной клеткой. Вероятность невозникновения макроколонии (N) связана с вероятностью успешного деления (p) жизнеспособной клетки следующим уравнением:

$$N = (1 - p) + p \cdot N^2, \quad /1/$$

где первое слагаемое есть вероятность гибели клетки до первого деления и второе слагаемое - произведение вероятности успешного деления клетки и вероятности невозникновения макроколонии из двух дочерних клеток. Далее получаем:

$$N = (1 - p)/p. \quad /2/$$

Для фракции клеток, способных к образованию макроколоний, имеем:

$$S_0 = 1 - N = \frac{2p - 1}{p}. \quad /3/$$

Разные компоненты популяции гес А⁻мутанта, а также их трансформация в процессе роста культуры в виде диаграммы представлены на рис.1. Как можно видеть, у жизнеспособных клеток с вероятностью p образуются две дочерние клетки, каждая из которых жизнеспособна, и с вероятностью 1-p наблюдается переход в класс нежизнеспособных клеток.

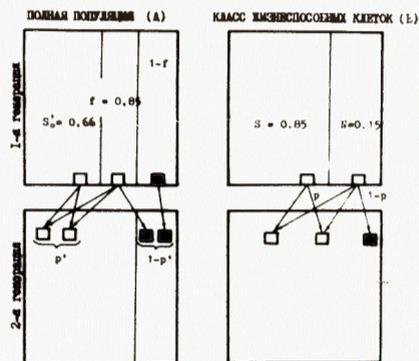


Рис.1. Диаграмма, отражающая состав популяции клеток гес А⁻-мутанта. А - полная популяция; Б - класс жизнеспособных клеток; S₀ - фракция жизнеспособных клеток, образующих макроколонию; N - фракция жизнеспособных клеток, не образующих макроколонию; f - фракция жизнеспособных клеток во всей популяции; S'₀ - фракция клеток всей популяции, образующих макроколонию. Пояснения в тексте.

Уравнения /1/-/3/ описывают рост класса жизнеспособных клеток гес А⁻-мутанта. Фракция нежизнеспособных клеток (1-f), отраженная на рис.1, как следует из /3/, является постоянной и независимой от стадии роста культуры. Исходя из этого, для любых двух следующих друг за другом генераций клеток, получаем уравнение:

$$1 - f = \frac{f(1 - p) + (1 - f)}{f(1 - p) + 2f \cdot p + (1 - f)}, \quad /4/$$

где числитель правой части уравнения представляет собой фракцию нежизнеспособных клеток во второй генерации и в знаменателе - количество клеток во второй генерации. Из /4/ далее имеем:

$$p = \frac{1}{2 - f}. \quad /5/$$

С учетом уравнения /3/ получаем

$$S_0 = f. \quad /6/$$

Равенство /6/ означает, что фракция жизнеспособных клеток, образующих макроколонию, совпадает с фракцией жизнеспособных клеток всей популяции. Следовательно, фракция клеток всей популяции, образующих макроколонию S'₀, связана с f уравнением:

$$S'_0 = S_0 \cdot f = f^2. \quad /7/$$

Полученное уравнение /7/, являющееся следствием развитых модельных представлений, допускает экспериментальную проверку. Прежде чем провести сопоставление модели с экспериментальными данными, вычислим скорость роста культуры клеток гес А⁻-мутанта.

Очевидно, что характеристики роста клеточной популяции должны определяться вероятностью успешного деления клеток в среднем

по популяции (p') и временем клеточного цикла. Предположим, что время клеточного цикла у жизнеспособных клеток гес А⁻-мутанта такое же, как и у клеток дикого типа. Следовательно, популяция клеток гес А⁻-мутанта в соответствии с /3/ будет расти в r раз медленнее по сравнению с клетками дикого типа:

$$r = \frac{\ln 2}{\ln [2 \cdot p' + (1 - p')]}, \quad /8/$$

где p' = p · f = f/(2 - f). Поскольку f = √S'₀, можем записать:

$$r = \ln 2 / (\ln \frac{2}{2 - \sqrt{S'_0}}). \quad /9/$$

Из /3/ известно, что для гес А⁻-мутанта S'₀ = 0,66. На основании /7/ фракцию делящихся клеток f получаем равной 0,812 и фракцию неделящихся - равной 0,188, что хорошо соответствует экспериментальному значению, равному 0,15, полученному в /4/. Далее по уравнению /9/ получаем, что клетки гес А⁻-мутанта в 1,33 раза растут медленнее, чем клетки дикого типа. Например, если у гес⁺-штамма T = 40 мин, то у гес А⁻-мутанта T = 53,2 мин. Эта величина хорошо соответствует экспериментальным данным, полученным в /3/, где показано, что время клеточного цикла для гес А⁻-мутанта соответствует 57 мин.

Таким образом, на основании вышеизложенного можно прийти к заключению о том, что у клеток гес А⁻-мутанта, в отличие от гес В⁻С⁻ и гес А⁻В⁻С⁻-штаммов, по-видимому, отсутствуют классы клеток, промежуточные между жизнеспособными, образующими макроколонию, и неделящимися клетками. Некоторые характеристики клеток дикого типа, гес А⁻ и гес А⁻В⁻С⁻-мутантов представлены в табл.2. С учетом вышеизложенного, а также на основании представлений, развитых в /6,7/, рассмотрим особенности формы кривых выживания гес А⁻ и гес А⁻В⁻С⁻-мутантов при γ-облучении.

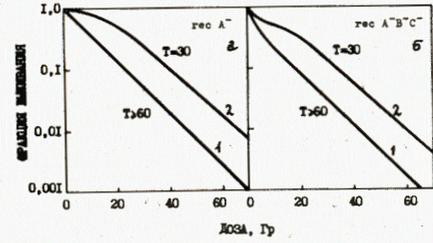
Как известно, у гес⁻-мутантов генетическая рекомбинация практически полностью подавлена и составляет у гес А⁻-мутанта, например, < 10⁻³ от клеток дикого типа /8/. Максимальный размер деградации ДНК, который, как следует из /7/, может обуславливать нелинейность кривых выживания клеток дикого типа, у гес⁻-мутантов не играет роли, поскольку летальными событиями у гес⁻-штаммов, по-видимому, являются не только двунитевые разрывы, но и преимущественно одноститевые разрывы ДНК, не восстановленные быстрым типом репарации /9,10/. Поскольку популяция клеток гес А⁻-мутанта, как было показано выше, состоит из двух классов клеток - жизнеспособных и неделящихся, единственным фактором, который может обуславливать нелинейность зависимости S(D) у клеток данного штамма, может быть многокопийность генома, имеющая место при высокой скорости удвоения ДНК /11/. На основании /7/ с учетом времени клеточного цикла можно вычислить зависимость

Некоторые сравнительные характеристики клеток *E. coli* дикого типа, гес А⁻, гес А⁻В⁻С⁻-мутантов

Генотип	Реак- тент- ность к гес А ⁻ γ-лучам белка	Индук- ция	Наличие неделя- ющих клеток	Время военя клеточной популяции	Наличие экзону- леазы	Выражен- ность деграда- ции ДНК	Наличие остаточ- но деля- ющихся клеток	Метабо- лическая актив- ность не делящих- ся клеток	ДНК в не- делящих- ся клет- ках	Время кле- точного цик- ла делящих- ся клеток
Дикий тип	+	-	-	I	+	-	-	-	I	I
гес А ⁻	-	+	+	I, 4	+	+	-	-	I	I
гес А ⁻ В ⁻ С ⁻	-	+	-	I, 5	-	+	+	+	I	I

Знаками + или - отмечено соответственно наличие или отсутствие признака.

Рис. 2. Кривые выживания гес А⁻/а/ и гес А⁻В⁻С⁻-мутантов /б/, вычисленные по /7/ для времени клеточного цикла $T > 60$ мин и $T = 30$ мин. При расчете $S(D)$ для гес А⁻В⁻С⁻-мутанта чувствительная фракция была принята равной 40% от всей клеточной популяции. По оси абсцисс: доза облучения, Гр; по оси ординат - фракция выживания.



выживания клеток гес А⁻-мутанта от дозы облучения. Такие кривые для $T > 60$ мин и $T = 30$ мин представлены на рис. 2. Как можно видеть, для $T > 60$ мин, когда клеточный геном близок к однокопийному, кривая выживания экспоненциальна. С уменьшением T , когда число копий генома в клетке увеличивается, экспоненциальная зависимость $S(D)$ трансформируется в сигмоидную. Иной характер кривой выживания ожидается для гес А⁻В⁻С⁻-мутанта. Как указывалось выше, для данного штамма характерно наличие в популяции клеток, занимающих промежуточное положение между жизнеспособными и неделяющимися клетками. Такие клетки несут спонтанно возникающие повреждения генетического аппарата /физиологические ОР ДНК /1, 5/ / и, таким образом, являются более чувствительными к облучению. Очевидно, что культура гес А⁻В⁻С⁻-мутанта гетерогенна по радиочувствительности как при $T > 60$ мин, так и при $T < 60$ мин. Эта гетерогенность находит отражение в характере зависимости $S(D)$, которая имеет прогиб начального участка кривой /рис. 2б, кривая 1/, обусловленный более высокой радиочувствительностью промежуточного класса клеток. Более сложный вид зависимости $S(D)$ у клеток гес А⁻В⁻С⁻-штамма ожидается при $T = 30$ мин, когда имеет место многокопийность генома. В этом случае также отмечается начальный прогиб кривой выживания, но наряду с этим появляется и плечо. Описанные различия в кривых выживания у гес А⁻ и гес А⁻В⁻С⁻-мутантов отчетливо выражены и допускают экспериментальную проверку.

Таким образом, мы рассмотрели некоторые особенности роста культур гес⁻-мутантов и их возможное влияние на форму кривых выживания клеток при γ-облучении. На основании развитых представлений появляется возможность проведения теоретического анализа зависимости формы кривых выживания разных штаммов бактерий *E. coli* от величины линейной передачи энергии воздействующих излучений.

ЛИТЕРАТУРА

1. Жестяников В.Д. Репарация ДНК и ее биологическое значение. "Наука", Л., 1979.

2. Мясник М.Н. и др. Радиобиология, 1982, 22, с.312-316.
3. Capaldo F.N. et al. J.Bacteriol., 1974, vol.118, p.242-249.
4. Miller J.E., Barbour S.D. J.Bacteriol., 1977, vol.130, p.160-166.
5. Capaldo F.N., Barbour S.D. In: Molecular Mechanisms for Repair of DNA. Plenum Press, New York, 1975, p.405-418.
6. Красавин Е.А. ОИЯИ, 19-84-645, Дубна, 1984.
7. Козубек С., Красавин Е.А. ОИЯИ, 19-84-647, Дубна, 1984.
8. Castellazzi M. et al. Molec.Gen.Genet., 1977, vol.153, p.297-310.
9. Бреслер С.Е., Носкин Л.А. Радиобиология, 1978, 18, с.548-555.
10. Козубек С., Красавин Е.А. ОИЯИ, 19-82-882, Дубна, 1982.
11. Cooper S., Helmstetter C. J.Mol.Biol., 1968, vol.31, p.519-540.

Рукопись поступила в издательский отдел
26 сентября 1984 года.

Козубек С., Красавин Е.А.

P19-84-653

Факторы, определяющие характер кривых выживания бактерий Escherichia Coli при действии излучений с разной линейной передачей энергии.

Форма кривых выживания чувствительных мутантов при γ -облучении

Рассматриваются количественные закономерности роста гес A^- и гес $A^-B^-C^-$ -мутантов E.coli. На основе анализа экспериментальных данных показано, что популяция гес A^- -мутанта состоит из двух типов клеток: жизнеспособных, образующих макроколонии, и нежизнеспособных, неделящихся. В отличие от гес A^- популяцию гес $A^-B^-C^-$ -мутанта составляют три типа клеток: жизнеспособные, условно жизнеспособные и неделящиеся. Указанные особенности чувствительных штаммов с мутацией в различных локусах гена гес находят отражение в форме зависимости выживания (S) клеток от дозы (D) γ -облучения. Для культуры гес A^- , время удвоения количества клеток (T) которой составляет $T > 60$ мин, ожидается экспоненциальная зависимость S(D) и для клеток с $T < 60$ мин - сигмоидная кривая выживания. Зависимости S(D) гес $A^-B^-C^-$ -мутанта при $T > 60$ мин и $T < 60$ мин описываются кривыми с прогибом начального участка, обусловленного наличием класса условно жизнеспособных клеток.

Работа выполнена в Лаборатории ядерных проблем ОИЯИ.

Сообщение Объединенного института ядерных исследований. Дубна 1984

Перевод О.С.Виноградовой

Kozubek S., Krasavin E.A.

P19-84-653

Factors Determinating the Shape of Survival Curves of Escherichia Coli Cells Irradiated by Ionizing Radiation with Different LET.

The Shape of Survival Curves of the Sensitive Mutants Irradiated by γ -Rays

The growth characteristics of rec A^- and rec $A^-B^-C^-$ mutants of E.coli are considered. It is shown that rec A^- strain is composed of two classes of cells: viable cells which can form macrocolonies and nondividing cells. Rec $A^-B^-C^-$ mutants are characterized by three classes of cells: viable cells, residually dividing cells and nondividing cells. The peculiarities of rec mutants are reflected on the dependence of the cell survival (S) on the dose (D) of γ -irradiation. The survival curves of rec A^- mutant which have generation time (T) $T > 60$ min are exponential. The shape of survival curves with shoulder is formed when $T < 60$ min. The survival curves of rec $A^-B^-C^-$ mutants are more complicated and have bends in the initial part of the survival curve. These bends are determined by residually dividing cells.

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

Communication of the Joint Institute for Nuclear Research. Dubna 1984