

ИНДУКЦИЯ ГЕННЫХ И КОМПЛЕКСНЫХ МУТАЦИЙ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ГАММА-ИЗЛУЧЕНИЯ И УСКОРЕННЫХ ИОНОВ АЗОТА В ГАПЛОИДНЫХ ЭУКАРИОТИЧЕСКИХ КЛЕТКАХ

Н. И. Жучкина, Н. В. Шванева, Н. А. Колтовая

Объединенный институт ядерных исследований, Дубна, Россия

gem_nadin@bk.ru

Резюме. Изучение закономерностей индукции генных мутаций показало, что частота возникновения мутаций зависела от ЛПЭ. ОБЭ мутагенного действия от ЛПЭ для мутаций сдвига рамки считывания и прямых мутаций представляла собой кривую с локальным максимумом около 100 кэВ/мкм. Редко ионизирующее излучение вызывало замены оснований более эффективно, чем ускоренные тяжелые ионы. Тяжелые ионы вызывали более эффективно делеции и комплексные мутации.

Ключевые слова: γ -лучи, тяжелые ионы, генные мутации, *Saccharomyces cerevisiae*.

INDUCTION OF GENE AND COMPLEX MUTATIONS BY GAMMA-RAYS AND ACCELERATED NITROGEN IONS IN HAPLOID EUKARYOTIC CELLS

N. I. Zhuchkina, N. V. Shvaneva, N. A. Koltovaya

Joint Institute for Nuclear Research, Joliot-Curie 6, 141980 Dubna, Russia

gem_nadin@bk.ru

Summary. A study of the patterns of induction of gene mutations showed that the frequency of mutations depended on LET. The RBE of mutagenic effect from LET for frameshift mutations and direct mutations was a curve with a local maximum of about 100 keV/ μ m. Rarely has ionizing radiation caused base substitutions more efficiently than accelerated heavy ions. Heavy ions caused deletions and complex mutations more effectively.

Keywords: γ -rays, heavy ions, point and complex mutations, yeast *Saccharomyces cerevisiae*.

Воздействие ионизирующего излучения приводит к возникновению различных повреждений ДНК, приводящих к мутациям, перестройкам и гибели клеток. Возникающие в клетках первичные повреждения – двунитевые и однонитевые разрывы, поперечные сшивки, модификации оснований – нарушают матричные процессы и приводят к возникновению мутаций. Гомологичная рекомбинация устраняет одно- и двунитевые разрывы. Хотя долгое время она считалась безошибочной, но в последнее время было показано, что в результате гомологичной рекомбинации могут возникнуть небольшие мутации (точечные мутации, сдвиг рамки считывания, небольшие делеции и инсерции) [1]. Репарация двунитевых разрывов ДНК путем негомологичного соединения концов также может приводить к вставке или потере нескольких нуклеотидов. Большой вклад в процесс возникновения мутаций вносят вторичные повреждения, возникающие в результате действия активных форм кислорода.

Консервативность базовых молекулярных клеточных процессов, в том числе репарационных, делает возможным использование модельных эукариотических систем. Одной из наиболее привлекательных моделей в биологических исследованиях служат одноклеточные дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*. Они хорошо генетически охарактеризованы и представляют собой подходящую базу для анализа мутаций, молекулярную природу которых в настоящее время позволяют детально изучить методы, использующие полимеразную цепную реакцию и секвенирование. В данной

работе изучали закономерности индукции генных мутаций в гаплоидных клетках дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* под действием редко- и плотно-ионизирующих излучений на базовых установках ОИЯИ.

Для тестирования замен пар оснований использовали коллекцию из шести штаммов, которые отличаются друг от друга только заменами отдельных оснований в кодоне критической аминокислоты – глутамина Glu50 в гене *TRP5* [2]. Данная генетическая система позволяет тестировать все типы транзиций и трансверсий. Ранее было показано, что при облучении всех шести штаммов гамма-лучами наиболее эффективно индуцировались транзиции GC-AT [3], поэтому в дальнейшей работе с тяжёлыми ионами в виду ограниченности возможностей тестировали именно эту мутацию. Этот же штамм использовали при анализе возникновения прямых мутаций различной молекулярной природы в гене аргинин пермиазы *CAN1*, нарушение которого вызывает устойчивость к аналогу аргинина канаванину. Мутации сдвига рамки считывания тестировали с помощью штамма, несущего +4-мутацию сдвига рамки считывания *lys2-BglI* в гене *LYS2*. Восстановление рамки считывания в данном штамме происходит в результате выпадения или вставки нуклеотидов, число которых не кратно трем, преимущественно в трэках 5A или 4C [4].

Источником γ -излучения служил терапевтический аппарат «Рокус» (^{60}Co , 0,25 кэВ/мкм, 0,7 Гр/мин). Ускоренные пучки ионов азота ^{15}N с ЛПЭ в 67, 92, 108, 124 и 177 кэВ/мкм получали на циклотроне У-400М. Облучение проводили в дозах до 80 Гр.

Для исследуемых штаммов наблюдалась характерная для гаплоидных штаммов экспоненциальная зависимость выживаемости от дозы облучения. Зависимости относительной биологической эффективности (ОБЭ) летального действия от линейной передачи энергии (ЛПЭ) представляли собой кривые с максимумом около 100 кэВ/мкм для обоих облучаемых штаммов.

При облучении γ -лучами и ионами азота исследуемых штаммов частота возникновения генных мутаций росла с увеличением дозы и при дозе 80 Гр была выше, чем в контроле: в 11-14 раз для прямых мутаций, в 5-10 раз для мутаций сдвига рамки считывания и в 4-7 раз для транзиций. Зависимость ОБЭ мутагенного действия от ЛПЭ для мутаций сдвига рамки считывания и прямых мутаций представляла собой кривую с локальным максимумом около 100 кэВ/мкм. В рамках использованных нами значений ЛПЭ максимальные значения ОБЭ составляли для прямых мутаций $2,3 \pm 0,3$ при ЛПЭ 108 кэВ/мкм и для мутаций сдвига рамки считывания – $3,3 \pm 0,4$ при ЛПЭ 67 кэВ/мкм. При индукции замен пар оснований частота мутаций практически не зависела от ЛПЭ, исключение составила ЛПЭ 177 кэВ/мкм, при которой индукция транзиций снижается.

Из расщепов необлученных и облученных (γ -лучами и ионами азота с ЛПЭ 67 кэВ/мкм в двух дозах 20 и 80 Гр) культур отбирали мутанты. Для анализа природы мутаций индуцированных в генах *CAN1* и *LYS2* проводили секвенирование.

При исследовании спектра генных мутаций в гене *CAN1* проанализировали 144 спонтанных и индуцированных γ -излучением и тяжёлыми ионами мутантов. Были выявлены различные типы мутаций: транзиции, трансверсии, инсерции, инверсии, делеции и комплексные мутации, состоящие преимущественно из замены основания и небольшой делеции в пределах одного витка ДНК. Анализ спектра показал, что в контроле преобладали замены пар оснований, число комплексных мутаций по сравнению с ними было незначительно. При воздействии γ -лучами и тяжёлыми ионами картина менялась: снижалось число замен пар оснований, а число комплексных мутаций росло. Также заметно, что γ -лучи более эффективно индуцировали замены оснований, чем тяжёлые ионы, которые, в свою очередь, более эффективно индуцировали делеции и сложные мутации. Статистически значимым было только уменьшение замен пар оснований после облучения ионами азота в дозе 80 Гр (точный

критерий Фишера, $p < 0,05$). Анализ замен пар оснований, выявленных при секвенировании гена *CAN1*, показал, что наиболее эффективно при облучении индуцировались транзиции GC-AT и трансверсии GC-TA и AT-TA, что совпадает с данными полученными при облучении γ -лучами коллекции мутантных штаммов *trp5*.

Для тестирования мутаций сдвига рамки считывания использовали мутацию сдвига рамки *lys2-BglI*. Это специфическая система, позволяющая выявлять только определенные мутации и в определенном участке. В гене *lys2-BglI* для возникновения мутаций со сдвигом рамки считывания есть ограничения, реверсии могут возникать только в «открытом окне» вблизи инсерции и они ограничены спецификой последовательности в этом регионе [4]. Было выделено 65 независимых *Lys+*-мутантов, индуцированных тяжелыми ионами, у которых амплифицировали и секвенировали нуклеотидные последовательности гена *LYS2* в положении 171-696. Анализ показал, что в случае мутации *lys2-BglI* «открытое окно» представляет собой область размером 182 п.о. (основания 318–500), ограниченную терминирующими кодонами, фланкирующими мутацию *lys2-BglI*. Проанализированные реверсии возникали за счет $\Delta 1$ -делеций (72–79 %) и комплексных мутаций (21–28 %). Причем делеции одной пары оснований происходили в полинуклеотидных участках. Комплексные мутации часто включали две соседние мутации, чаще всего одиночную делецию и замену основания. Этот спектр был одинаковым при спонтанных мутациях и после облучения ионами азота (67 кэВ/мкм), но комплексные мутации включали крупные делеции, которые чаще встречались в последнем случае и отсутствовали в спектре прямых мутаций в гене *CAN1*.

Таким образом, было показано, что при воздействии ионизирующей радиации спектр мутаций, возникающих в генах *CAN1* и *LYS2*, меняется по сравнению со спонтанным фоном. В гене *CAN1* наблюдается снижение числа замен пар оснований и возрастание числа комплексных мутаций. В гене *LYS2* заметный рост числа комплексных мутаций не наблюдается и чаще встречаются протяжённые делеции, возможно, за счет специфики используемой системы.

Список литературы:

1. McVey M, Khodaverdian VY, Meyer D, Cerqueira PG, Heye W-D. *Annu Rev Genet.* 2016. т 23; 50: 393–421.
2. Williams T-M, Fabbri RM, Reeves JW, Crouse GF. *Genetics.* 2005. 170:1423-1426.
3. Koltovaya NA, Zhuchkina NI, Lyubimova KA. *International Journal of Bioengineering and Life Sciences/* 2018. v. 12, N 9, p. 266-271.
4. Tishkoff DX, Filosi N, Gaida GM, Kolodner RD. *Cell.* 1997. 88:253-263.