

♀
объединенный
институт
ядерных
исследований
дубна

P19-88-352

Е.А.Красавин, С.Козубек, К.Г.Амиртаев,
Б.Токарова

"ПРИНЦИП ПОПАДАНИЯ"
И МУТАГЕННОЕ ДЕЙСТВИЕ
ИОНИЗИРУЮЩИХ ИЗЛУЧЕНИЙ
РАЗНОГО КАЧЕСТВА
НА БАКТЕРИАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ

Направлено в сборник "Онтогенез,
эволюция, биосфера", издательство "Наука"

1988

Успехи в изучении молекулярных механизмов радиационного мутагенеза, достигнутые в последние годы, позволяют сегодня в полной мере осмыслить глубину и фундаментальность важнейшего методологического принципа — "принципа попадания", сформулированного в классических работах Н.В.Тимофеева-Ресовского¹¹⁻¹³. В настоящее время стало еще более очевидным, что лишь на основе разработанных положений возможна интерпретация сложных и неоднозначных закономерностей индукции генных мутаций у клеток с различным генотипом при действии ионизирующих излучений разного качества.

В основе принципа попадания, как известно, лежит положение о том, что радиационно-индуцированные эффекты возникают в результате дискретных актов передачи энергии уникальным биологическим структурам клеток — случайных "попаданий" квантов энергии в "чувствительные мишени". "Попаданием", вызывающим летальный эффект, может служить либо одна ионизация, либо группа ионизаций, образующихся при поглощении кванта энергии или при прохождении частицы через чувствительную структуру клетки. В отличие от летального события, мутация может реализоваться лишь при соблюдении двух условий: во-первых, при передаче энергии чувствительной структуре клетки и, во-вторых, при сохранении ее жизнеспособности, т.е. нелетальности данного попадания. Согласно развитым положениям, мутационное событие есть результат случайного попадания кванта энергии в дискретную единицу наследственности — ген, вследствие чего происходит его необратимое изменение, фенотипически выявляемое в виде мутации. Мутагенная эффективность излучений в рамках классических представлений определялась размерами соответствующих мишеней-генов и физических характеристик излучений.

Представление о том, что попаданием является одна ионизация или узколокализованная группа ионизаций в генетических структурах клетки приводит к заключению о том, что кривая доза — эффект должна иметь линейный характер. Действительно, справедливость этого положения была убедительно показана в экспериментах на различных организмах. Однако в более поздних работах наряду с линейными были выявлены и зависимости нелинейного типа¹⁴⁻¹⁶. Из этого следует, что "попадание" или выделение энергии в генах и фиксация возникающего повреждения в виде мутации неоднозначно связаны между собой. То есть элементарные повреждения генов при действии ионизирующих излучений

не реализуются непосредственно в виде мутаций, а возникают вначале в форме премутационных повреждений. Оказалось, что вероятность закрепления таких повреждений в мутацию в сильной степени зависит от процессов протекания клеточного метаболизма и в конечном счете от систем пострадиационного восстановления.

Ранние работы по учету частоты мутирования у микроорганизмов под влиянием излучений в условиях модифицирующего действия факторов физической, химической и биологической природы выявили важную роль пострадиационного восстановления в мутационном процессе. После выделения и идентификации мутантов с различными дефектами в системе репарации ДНК началось интенсивное изучение роли репарационных процессов в индуцированном мутагенезе. На основании полученных результатов можно было прийти к выводу о важной роли как физических, так и биологических факторов в мутагенном действии излучений. С учетом этих обстоятельств роль физического фактора в мутационном процессе можно было изучать, используя ионизирующие излучения с разными физическими характеристиками, а роль биологического фактора — используя различные репарационные мутанты клеток.

В экспериментах на бактериях с различным генотипом было установлено, что нелинейные дозовые кривые мутагенеза (N_m/N) наблюдаются довольно часто и выявляются при учете как обратных, так и прямых мутаций. Так, в работах¹⁷⁻¹⁸ на клетках *E.coli* WP-2 установлено, что выход триптофановых ревертантов в зависимости от дозы облучения описывается степенной зависимостью. Квадратичная дозовая зависимость при γ -облучении была выявлена и в опытах по индукции *vir*-мутантов у фага λ_{11} Бреслером с соавторами¹⁹. Аналогичные результаты были получены при изучении реверсии мутации *his4* у клеток *E.coli* в работе¹⁰, выхода прямых мутаций в регуляторном *lacI* гене лактозного оперона *E.coli*¹¹, образования гистидиновых ревертантов и прямых мутаций устойчивости к рифампицину¹².

Степенные дозовые зависимости мутагенеза в течение долгого времени являлись мучительной проблемой для специалистов. Для их объяснения были предложены две основные гипотезы. Согласно гипотезе С.Е.Бреслера¹³ начальной премутационной структурой являются два повреждения ДНК, расположенные на комплементарных нитях и смещенные относительно друг друга на некоторое расстояние вдоль цепи ДНК. После эндонуклеазного надрезания нити ДНК вблизи одного повреждения и последующей экзонуклеазной расчистки возможно, что второе повреждение окажется напротив экзонуклеазной бреши. Последующая полимеразная застройка бреши в этом случае может с известной вероятностью произойти с ошибочной подстановкой основания напротив поврежденного. Второе повреждение, подвергнутое эксцизии, будет дополнено при ресинтезе комплементарной нити и мутация закреп-

пится. В рамках этой гипотезы можно объяснить квадратичный характер зависимости $N_m/N(D)$. Существенную роль в этой гипотезе играет длина экзонуклеазной расщипки.

В работе Виткин¹⁴ было предложено альтернативное объяснение квадратичной зависимости $N_m/N(D)$ при УФ-облучении. Согласно ему два повреждения ДНК взаимодействуют между собой следующим образом: одно из них возникает в исследуемом гене и является премутационным повреждением, второе, образующееся в любом участке генома, запускает SOS-систему, в результате работы которой мутация закрепляется.

Вместе с тем предложенным объяснениям противоречит ряд важных обстоятельств. Первой гипотезе должна удовлетворять большая длина экзонуклеазной деградации ДНК в процессе репарации премутационных сайтов. Микродозиметрический анализ ситуации показывает, что эта длина должна достигать $\sim 10^5$ нуклеотидов, что маловероятно для клеток с нормальным репарационным генотипом. Второй гипотезе должно удовлетворять условие индуцибельности генов SOS-системы до доз порядка нескольких сотен Гр.

Для выяснения относительной роли физического и биологического факторов в индуцированном мутационном процессе нами были приняты исследования индукции прямых и обратных мутаций у клеток *E.coli* и сальмонеллы излучениями с разной линейной передачей энергии (ЛПЭ).

Результаты исследований образования прямых мутаций в лактозном опероне клеток *E.coli* представлены на рис.1,2. Как можно видеть из рис.1, зависимости $N_m/N(D)$ для всех использованных типов излучений являются квадратичными. При этом эффективность излучений с разной ЛПЭ различна:

Рис.1. Зависимость частоты мутирования клеток *E.coli* *Hfr H* от дозы облучения разными типами излучений в логарифмическом масштабе: 1 – ионы гелия, ЛПЭ = 22 кэВ/мкм, 2 – ионы гелия, ЛПЭ = 54 кэВ/мкм, 3 – ионы гелия, ЛПЭ = 72 кэВ/мкм, 4 – γ -лучи, 5 – ионы углерода, ЛПЭ = 220 кэВ/мкм. По оси абсцисс: доза облучения, Гр, по оси ординат: частота мутирования, отн.ед.

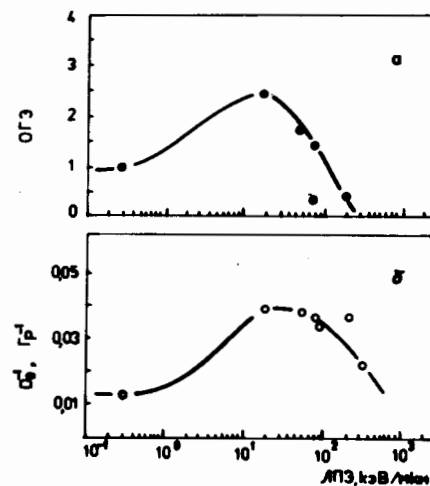
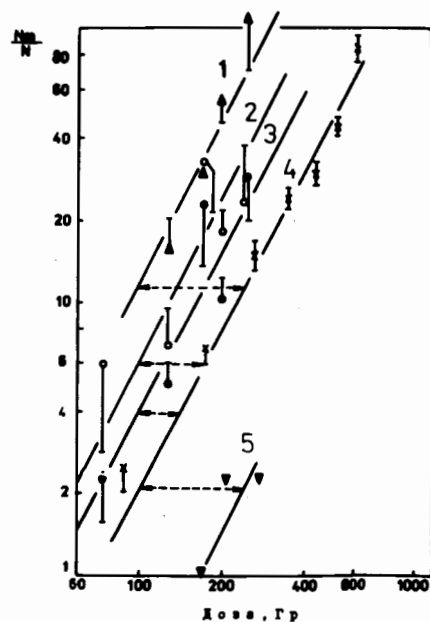


Рис.2. Зависимость относительной генетической эффективности (а) и радиочувствительности клеток (б) от ЛПЭ. По оси абсцисс: ЛПЭ, кэВ/мкм; по оси ординат: ОГЭ (а) и радиочувствительность, Гр^{-1} (б).

максимальна для ионов гелия с ЛПЭ, равной 22 кэВ/мкм, и с дальнейшим увеличением ЛПЭ снижается. Смещение дозовых зависимостей относительно кривой при γ -облучении на рис.1 можно определить как относительную генетическую эффективность (ОГЭ).

На рис.2 представлены зависимости ОГЭ (ЛПЭ) и радиочувствительности клеток (D_0^{-1}) от ЛПЭ. Как видно из рисунка, обе эти зависимости имеют максимум.

Полученные данные о характере зависимости частоты индуцированных мутаций от дозы γ -облучения и ускоренных тяжелых ионов позволяют прийти к следующему заключению. Поскольку образование мутаций происходит в процессе репарации случайно распределенных первичных премутационных повреждений ДНК, и такими повреждениями являются измененные основания, то характер зависимости выхода этих повреждений от ЛПЭ будет определять тип зависимости ОГЭ (ЛПЭ). Выход поврежденных оснований с ростом ЛПЭ излучений снижается¹⁵. Это обстоятельство должно приводить к ниспадающему характеру зависимости ОГЭ (ЛПЭ), что не согласуется с нашими экспериментальными результатами. В отличие от гипотезы Бреслера, гипотеза Виткин допускает квадратичный характер кривых $N_m/N(D)$ и при относительно небольшом выходе первичных повреждений ДНК. Необходимым условием здесь является наличие повреждений, запускающих SOS-систему, которые могут образовываться в любом участке генома. Такими повреждениями могут быть некоторые типы однонитевых разрывов ДНК со сложной структурой концевых групп, выход которых с ростом ЛПЭ должен увеличиваться. Следовательно, наши результаты косвенно свидетельствуют в пользу гипотезы Виткин. В соответствии с этой гипотезой важную роль в мутагенном действии излучений должен играть фактор биологической природы: репарационная система клеток, а именно индуцибельная мутагенная ветвь SOS-репарации. С учетом этого рассмотрим влияние конкретных нарушений в системе репа-

рации ДНК в индуцированном мутационном процессе, вызванном действием ионизирующих излучений.

Мутация *polA*. Исследования влияния мутации *polA* на частоту мутирования клеток *E.coli* при действии ионизирующих излучений показали¹¹⁶⁻¹⁸, что у *polA*-мутантов при γ -облучении частота мутаций существенно не меняется по сравнению с клетками дикого типа. В наших экспериментах получены аналогичные результаты. С ростом ЛПЭ мутагенная эффективность излучений, так же как и для клеток дикого типа, сначала возрастает и затем снижается.

Мутация *recA* и *lexA*. Мутагенная эффективность различных агентов физической и химической природы, как известно, в сильной степени зависит от активности генов *recA* и *lexA*¹¹⁹⁻²⁰. Установлено, что мутагенное действие УФ-света на *E.coli* полностью определяется активностью генов *recA* и *lexA*¹²¹. Полученные разными авторами материалы позволили сделать предположение о том, что индуцированный мутационный процесс находится в теснейшей связи с другими индуцибельными функциями, находящимися под контролем генов *recA* и *lexA*. В наших экспериментах установлено, что наличие *lexA*-мутации практически полностью подавляет мутационный процесс.

Мутация *recBC*. В наших экспериментах с мутантом *recBC* выявлено, что зависимость $N_m/N(D)$ при γ -облучении в отличие от клеток дикого типа имеет линейный характер. При этом частота мутирования клеток этого типа оказалась выше частоты мутирования клеток дикого типа при одинаковых дозах облучения. С ростом ЛПЭ излучений мутагенная эффективность снижается.

Согласно гипотезе Виткин для объяснения зависимости ОГЭ (ЛПЭ) с максимумом необходимо предположить аналогичную зависимость либо для выхода премутационных повреждений, либо для выхода повреждений, являющихся сигналом для SOS-системы, либо и того, и другого. Нами экспериментально были проверены эти возможности.

Первичные этапы фиксации выделенной в микроструктурах клетки энергии в премутационные повреждения позволяет исследовать тест-система, предложенная Эймсом¹²²⁻²³. Эта система характеризуется наличием нескольких штаммов, позволяющих различать различные мутационные события: сдвиг рамки считывания (штаммы TA97 и TA98); замена пары оснований Г-Ц (штамм TA100); замена пары оснований А-Т (штамм TA102). Таким образом, исследуя мутагенное действие излучений с разной ЛПЭ на эти штаммы, можно определить выход различных типов мутационных событий от ЛПЭ. Результаты таких экспериментов представлены на рис.3-4. Как видно, для штамма TA98 зависимость выхода мутаций от ЛПЭ характеризуется кривой ниспадающего типа, в то же время для клеток TA102 мутагенная эффектив-

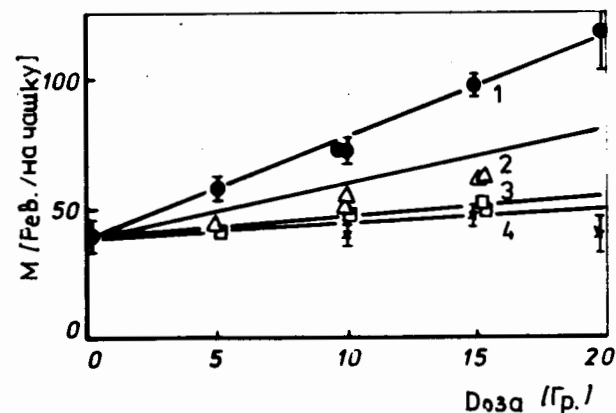


Рис.3. Зависимость частоты мутирования клеток *Salmonella typhimurium* TA98 от дозы облучения излучениями с разными ЛПЭ: 1 — γ -лучи, 2 — ионы гелия, ЛПЭ=22 кэВ/мкм, 3 — ионы гелия, ЛПЭ = 54 кэВ/мкм, 4 — α -частицы, ЛПЭ=110 кэВ/мкм. По оси абсцисс: доза, Гр; по оси ординат: частота мутирования, количество реверсий на чашку.

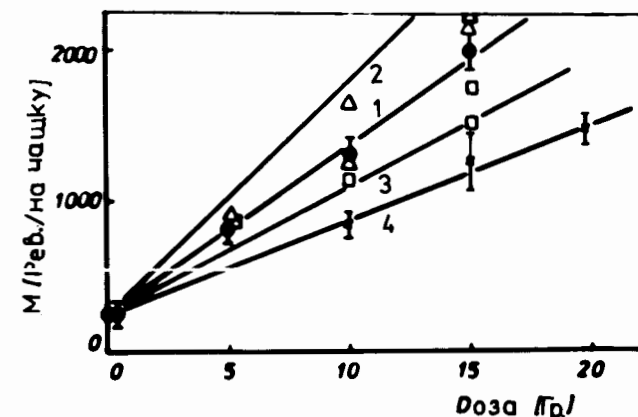


Рис.4. Зависимость частоты мутирования клеток *Salmonella typhimurium* TA102 от дозы облучения излучениями с разными ЛПЭ. Обозначения аналогичны обозначениям на рис.3.

ность излучений с ЛПЭ до 100 кэВ/мкм остается практически неизменной по сравнению с γ -облучением.

Результаты наших экспериментов позволяют предположить, что событиями попадания могут являться различные повреждения и их спектр при действии излучений с разной ЛПЭ может быть различным. Возрастание эффективности излучений с ростом ЛПЭ в индукции прямых мутаций, по-видимому, связано с тем, что выход повреждений, приводящих к замене пар оснований, не меняется в широком диапазоне значений ЛПЭ, и они являются основными премутационными событиями при фиксации прямых мутаций.

Зависимость SOS-индукции от ЛПЭ излучений исследовалась методом SOS-хромотеста¹²⁴. С его помощью по активности β -галактозидазы, вырабатываемой *lacZ* локусом, встроенным в ген *su1A* и находя-

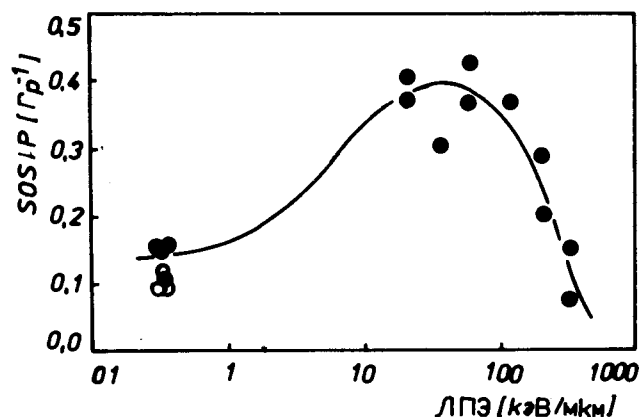


Рис.5. Зависимость SOSIP от ЛПЭ излучений. По оси абсцисс: ЛПЭ, кэВ/мкм; по оси ординат: SOSIP, Gr⁻¹.

щимся под негативным контролем продукта гена *lexA*, можно судить об интенсивности SOS-ответа. Мерой SOS-ответа в этой методике является величина SOSIP, зависимость которой от ЛПЭ представлена на рис.5. Видно, что с увеличением ЛПЭ значения SOSIP возрастают и достигают максимальной величины при ЛПЭ = 50 кэВ/мкм. При дальнейшем возрастании ЛПЭ величина SOSIP уменьшается^{12 51}. Следовательно, полученные результаты свидетельствуют о возрастании выхода повреждений, запускающих SOS-систему.

Таким образом, полученные к настоящему времени материалы о путях и особенностях реализации генных мутаций у прокариот при действии излучений разного качества свидетельствуют о сложном и многоэтапном характере мутационного процесса. Сейчас не вызывает сомнений, что первичные повреждения генетических структур, образующиеся в результате попадания в них квантов энергии, являются лишь первым звеном в сложной последовательной цепи событий, которые в ходе репарации первичных повреждений трансформируются в проявляемые мутации. Форма зависимости частоты образования мутаций от дозы облучения определяется эффективностью экспрессии индуцибельных генов, влияющих на осуществление репарационных процессов. Сам же процесс репарации ДНК является не только фактором, модифицирующим частоту образования мутаций, а представляет собой необходимое условие реализации индуцированного мутационного процесса. Полученные нами данные свидетельствуют о том, что механизмы образования генных мутаций у прокариот при γ -облучении и действии тяжелых ионов аналогичны. Это обусловлено тем, что в формировании мутаций принимает участие, по-видимому, лишь δ -электронный компонент треков тяжелых заряженных частиц. Спектр же энерговыделения δ -электронов в генетических структурах близок по своему характеру к энерговыделению при γ -облучении. Пересечение нити ДНК сердцевинной трека, как

известно, приводит к возникновению двуникового разрыва ДНК и заканчивается гибелью клетки. С учетом этого обстоятельства становится понятным аналогичный характер кривых мутагенеза у клеток *E.coli* при γ -облучении и действии тяжелых ионов. Различия в мутагенном действии тяжелых ионов и γ -излучения на бактерии заключаются лишь в их разной относительной генетической эффективности. Увеличение коэффициентов ОГЭ с ростом ЛПЭ до определенных значений, очевидно, связано с возрастанием выхода повреждений ДНК, восстанавливаемых лишь с участием мутагенной ветви репарации. Такие повреждения, по-видимому, являются тем молекулярным субстратом, который, во-первых, с большой вероятностью может закрепиться в мутацию и, во-вторых, в большей степени индуцирует мутагенную репарацию клеток. Наши исследования с SOS-хромостом убедительно подтверждают эту точку зрения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Timofeeff-Ressovsky N.W. – *Biol. Rev. Cambridge Philos. Soc.*, 1934, 9, p.411.
2. Timofeeff-Ressovsky N.W., Zimmer K.G. *Das Trefferprinzip in der Biologie*. Leipzig, S. Hirzel Vrl, 1947.
3. Тимофеев-Ресовский Н.В., Иванов В.И., Корогодин В.И. *Применение принципа попадания в радиобиологии*. М.: Атомиздат, 1969.
4. Demerec M., Latarjet R. *Mutations in Bacteria Induced by Radiation*. Cold Spring Harbor Sympos. Quant. Biol., 1946, 11, p. 38.
5. Kubitschek H.E., Venters D. – *Mutat. Research*, 1974, 23, p. 297.
6. Bresler S.E. et al. *Mutat. Research*, 1975, 29, p. 1.
7. Bridges B.A., Mottershead R. – *Mol. Gen. Genet.*, 1978, 162, p.35.
8. Bridges B.A. et al. – *Mol. Gen. Genet.*, 1968, 103, p.266.
9. Bresler S.E. et al. – *Mut. Research*, 1975, 29, p.1.
10. Kato T., Nakano E. – *Mutat. Research*, 1981, 83, p.307.
11. Glickman B.W. et al. – *Mutat. Research*, 1980, 69, p.1.
12. Бреслер С.Е. и др. – *Генетика*, 1985, 21, с.384.
13. Бреслер С.Е. – *Генетика*, 1976, 12, с.1.
14. Witkin E.M. – *Bacterial. Rev.*, 1976, 40, p.869.
15. Козубек С., Красавин Е.А. ОИЯИ, P19-85-749, Дубна, 1985.
16. Kato T., Kondo S. – *Mut. Research*, 1967, 4, p. 253.
17. Kondo S. et al. – *Genetics*, 1970, 66, p.187.
18. Bridges B.A., Mottershead R.P. – *Heredity*, 1972, 29, p.203.
19. Miura A., Tomizawa J. – *Mol. Gen. Genet.*, 1968, 103, p.1.
20. Witkin E.M. – *Science*, 1966, 152, p.1345.
21. Witkin E.M. – *Mutat. Res.*, 1969, 8, p.9.

22. Ames B.N. – In: *Mutagenic effects of environmental contaminants* (E. Sutton and M. Harris, eds.) Academic Press, New York, 1972, p.57.
23. Maron D.M., Ames B.N. – *Mut. Res.*, 1983, 113, p.173.
24. Quillardet P. et al. – *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1982, 79, p.5971.
25. Козубек С. и др. ОИЯИ, Р19-87-215, Дубна, 1987.

Рукопись поступила в издательский отдел
19 мая 1988 года.

P19-88-352

Красавин Е.А. и др.
 "Принцип попадания" и мутагенное действие
 ионизирующих излучений разного качества
 на бактериальные клетки

Рассматривается роль важнейшего методологического принципа — принципа попадания, сформулированного в работах Н.В.Тимофеева-Ресовского, в современных представлениях о мутагенном действии ионизирующих излучений разного качества на бактериальные клетки. Представлены экспериментальные результаты, свидетельствующие о том, что мутагенное действие излучений обусловлено как фактором физической природы (характеристиками излучений и геометрией мишени), так и фактором биологической природы (репарационными системами клеток).

Работа выполнена в Лаборатории ядерных проблем ОИЯИ.
 Препринт Объединенного института ядерных исследований. Дубна 1988

Перевод О.С.Виноградовой

P19-88-352

Krasavin E.A. et al.
 The "Hit Principle" and the Mutagenic Action
 of Ionizing Radiation of different Quality
 on Bacterial Cells

The role of the most important methodological principle — the hit principle, worked out by N.V.Timofeeff-Ressovsky, in recent understanding of the mutagenic action of ionizing radiation of different quality on bacterial cells has been discussed. Experimental results are presented which show that mutagenic action of ionizing radiation is determined by the influence of factors of both physical nature (the parameters of radiation and the geometry of a target) and biological nature (repair systems in cells).

The investigation has been performed at the Laboratory of Nuclear Problems, JINR.
 Preprint of the Joint Institute for Nuclear Research. Dubna 1988