

ОБЪЕДИНЕННЫЙ
ИНСТИТУТ
ЯДЕРНЫХ
ИССЛЕДОВАНИЙ
ДУБНА

T 51

P19-88-777

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

РОЛЬ ГЕНОТИПА
В МУТАГЕННОМ ДЕЙСТВИИ ИЗЛУЧЕНИЙ
С РАЗНОЙ ЛПЭ НА КЛЕТКИ *E.coli*

Направлено в журнал "Радиобиология"

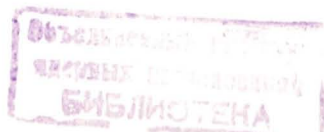
1988

Установлено, что вероятность закрепления индуцированных излучением премутационных повреждений в мутации в сильной степени зависит от функционирования репарационных систем клеток^{/1/}. Роль репарации ДНК в мутационном процессе у *E.coli*, вызванном воздействием ультрафиолетового излучения, исследована достаточно полно^{/2/}. В меньшей степени это изучено при γ -облучении клеток^{/3,4/}, и совершенно не выяснено влияние репарационного генотипа на индукцию мутаций у бактерий при действии плотноионизирующих излучений. Между тем, учитывая специфику энерговыделения ионизирующих частиц с высокой линейной передачей энергии /ЛПЭ/ в генетических структурах клеток, можно полагать, что это влияние может отличаться от такового при γ -облучении. С учетом этого целью настоящей работы являлось изучение закономерностей мутагенного действия излучений, различающихся по ЛПЭ, на клетки *E.coli* с различным репарационным генотипом. В качестве учитываемого признака изучалась индукция lac^- -мутаций.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

В экспериментах использовали следующие штаммы *E.coli* K-12: W3110 /дикий тип/, P3478 /pol A⁻/, GC 244 /lex A⁻/ и JC 5491 /rec B⁻C⁻/ . Культуру клеток выращивали в мясопептонном бульоне /производства ИЭМ им.Н.Ф.Гамалеи АМН СССР, Москва/. В качестве твердой питательной среды использовали мясопептонный агар /МПА/ производства того же института. Перед автоклавированием в МПА добавляли 2,3,5-трифенилтетразолий хлористый в концентрации 50 мг/л. После автоклавирования добавляли в среду 50 мл/л 20% раствора лактозы.

Клетки стационарной культуры осаждали центрифугированием в течение 10 мин /8000g/ и ресуспендировали в М9 буфере. Техника приготовления проб для облучения на ускорителе тяжелых ионов и γ -установке описана нами ранее^{/5/}. В экспериментах использовали ускоренные ионы гелия с ЛПЭ, равной 22, 54 и 72 кэВ/мкм и ионы дейтерия с ЛПЭ, равной 7 и 18,3 кэВ/мкм. γ -облучение проводили на установке с γ -источником ^{137}Cs , мощность дозы которого составляла 25 Гр/мин.



Учет мутантных колоний проводили под микроскопом МБС-9 при 16-кратном увеличении по методике, описанной ранее /6/. Выживаемость клеток оценивали методом макроколоний в параллельных экспериментах. Частоту мутирования клеток представляли как отношение N_m/N , где N - число выживших клеток, N_m - количество выявленных мутантов.

Зависимость частоты мутирования от дозы (D) облучения аппроксимировали степенной или линейно-квадратичными функциями:

$$N_m/N = k \cdot D^k \quad /1a/$$

$$N_m/N = \alpha \cdot D + (\beta \cdot D)^2 \quad /1б/$$

Параметры уравнений определяли методом минимизации суммы квадратов отклонений экспериментальных и теоретических величин, рассчитанных по уравнениям /1а/ и /1б/ соответственно. Величину относительной генетической эффективности /ОГЭ/, так же как и значения фактора изменения дозы /ФИД/ для *rol A*-мутанта, вычисляли с помощью метода, описанного ранее /5/. Величину ФИД для *lex A*- и *rec BC*-мутантов рассчитывали как отношение доз линейного компонента кривых мутагенеза у клеток дикого типа и линейной зависимости мутагенеза у *lex A*- и *rec BC*-мутантов.

РЕЗУЛЬТАТЫ

На рис.1а,б,в,г представлены кривые выживания клеток дикого типа и мутантов *rol A*, *lex A* и *rec BC* при γ -облучении. Видно, что генетический блок репарации одонитевых разрывов ДНК быстрого типа и эксцизионной репарации короткими фрагментами, который имеет место у *rol A*-мутанта, приводит к резкому возрастанию радиочувствительности клеток. Величина средней летальной дозы у этого штамма по сравнению с клетками дикого типа уменьшается в 5-6 раз /табл.1/. Аналогичное повышение радиочувствительности наблюдается и у мутантов *lex A* и *rec BC*, имеющих генетический блок репарации одонитевых разрывов /ОР/ ДНК медленного типа.

На рис.1а,б,в,г приведены дозовые зависимости частоты мутирования клеток *E.coli* дикого типа /а/, *rol A* /б/, *lex A* /в/ и *rec BC* /г/-мутантов при γ -облучении.

Мутация rol A. Как видно из представленных материалов /рис.1б/, мутация в гене *rol A*, во-первых, как уже указывалось, повышает радиочувствительность клеток и, во-вторых, увеличивает частоту их мутирования. Из табл.1 следует, что

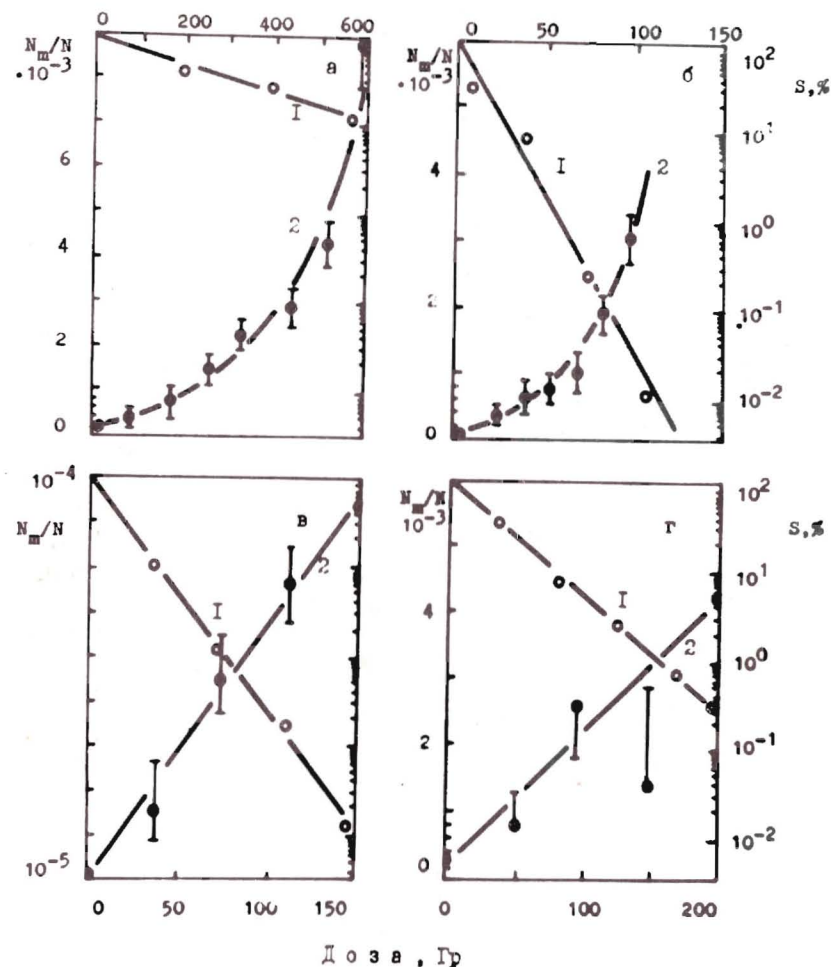


Рис.1. Влияние мутаций *rol A*, *lex A* и *rec BC* на выживаемость /1/ и частоту мутирования /2/ клеток при γ -облучении: а - дикий тип; б - *rol A*-мутант (P3478); в - *lex A*-мутант (GC244); г - *rec BC*-мутант (JC5491). По оси ординат: частота мутирования, отн.ед./слева/, выживаемость, % /справа/; по оси абсцисс: доза облучения, Гр.

ФИД_B в этом случае равен $12,5 \pm 0,7$. Характер зависимости $N_m/N(D)$ у штамма P3478 одинаков с клетками дикого типа и коэффициент $k = 1,7$ /табл.1/.

Влияние мутаций $\rho\text{ol A}$, lex A и rec BC на мутагенное действие γ -облучения

Штамм	Фенотип	D_0^{-1} $10^{-2}, \text{Гр}^{-1}$	κ	$\Phi\text{ИД}_{\alpha}$	$\Phi\text{ИД}_{\beta}$	Частота спонтанного мутирования
Hfr H	дикий тип	$1,4 \pm 0,1$	$1,9 \pm 0,3$	1	1	$(3,0 \pm 1,7) \cdot 10^{-5}$
W3110	дикий тип	$1,3 \pm 0,1$		1	1	
P3478	$\rho\text{ol A}$	$8,3 \pm 0,4$	$1,7 \pm 0,3$	-	$12,5 \pm 0,7$	$(1,3 \pm 0,8) \cdot 10^{-4}$
GC244	lex A	$6,0 \pm 0,3$	$1,0 \pm 0,1$	$0,30 \pm 0,02$	-	$(1,2 \pm 0,5) \cdot 10^{-5}$
JC5491	rec BC	$4,0 \pm 0,1$	$1,0 \pm 0,2$	$13,1 \pm 0,8$	-	$(3,3 \pm 1,1) \cdot 10^{-4}$

$$\Phi\text{ИД}_{\alpha} = \frac{\alpha_{\text{мутанга}}}{\alpha_{\text{дикого типа}}}$$

$$\Phi\text{ИД}_{\beta} = \frac{\beta^2_{\text{ро1 A}}}{\beta^2_{\text{дикого типа}}}$$

κ , α и β - параметры уравнений /1а/ и /1б/.

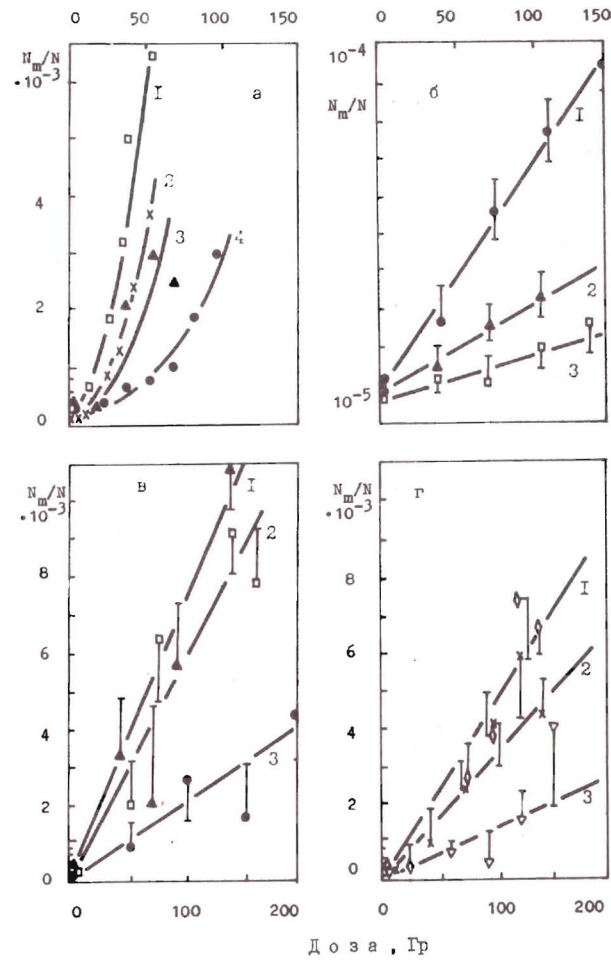


Рис.2. Зависимость частоты мутирования клеток *E. coli* P3478, GC244, JC5491 при γ -облучении и действии ускоренных ионов: а - P3478 /1 - дейтроны, ЛПЭ=7 кэВ/мкм; 2 - дейтроны, ЛПЭ=18,3 кэВ/мкм; 3 - гелий, ЛПЭ = 22 кэВ/мкм; 4 - γ -лучи/; б - GC244 /1 - γ -лучи; 2 - гелий, ЛПЭ=22 кэВ/мкм; 3 - гелий, ЛПЭ=54 кэВ/мкм/; в - JC5491 /1 - гелий, ЛПЭ=22 кэВ/мкм; 2 - гелий, ЛПЭ=54 кэВ/мкм; 3 - γ -лучи/; г - JC5491 /1 - дейтроны, ЛПЭ=7 кэВ/мкм; 2 - дейтроны, ЛПЭ=18,3 кэВ/мкм; 3 - гелий, ЛПЭ=72 кэВ/мкм/. По оси ординат: частота мутирования, отн.ед.; по оси абсцисс: доза облучения, Гр.

Влияние мутаций *rol A*, *lex A* и *rec BC* на мутагенное действие ускоренных тяжелых ионов

Вид излучения	ЛПЭ	Энергия, МэВ/нуклон	Дикий тип		<i>rol A</i>		<i>lex A</i>		<i>rec BC</i>	
			к	ОГЭ	к	ОГЭ	к	ОГЭ	к	ОГЭ
γ -излучение	0,3	-	1,9±0,3	1	1,7±0,3	1	1,0±0,2	1	1,0±0,2	1
2D_1	7,0	5,8	-	-	1,5±0,2	1,6±0,3	-	-	1,0±0,3	2,3±0,3
2D_1	18,3	1,6	-	-	1,6±0,3	1,2±0,2	-	-	1,0±0,3	1,7±0,2
4He_2	22	8,0	2,9±0,9	2,3±0,3	1,5±0,3	1,7±0,3	1,0±0,1	0,4±0,1	1,0±0,2	3,5±0,5
4He_2	54	2,5	1,9±0,5	1,6±0,2	-	-	1,0±0,1	0,2±0,08	1,0±0,3	2,9±0,4
4He_2	72	1,7	2,1±0,5	1,3±0,2	-	-	-	-	1,0±0,3	0,7±0,1
$^{12}C_6$	220	7,0	-	0,16±0,02	-	-	-	-	-	-

Мутация lex A. Мутация в гене *lex A* также вызывает повышение радиочувствительности клеток к γ -облучению, однако резко снижает частоту их мутирования. Из рис.1в видно, что в отличие от клеток дикого типа и *rol A*-мутанта, зависимость мутагенеза от дозы облучения имеет линейный характер. Коэффициент FID_{α} , рассчитанный для *lex A*-мутанта, составляет 0,30 /табл.1/

Мутация rec BC. Как уже указывалось, у штамма *rec BC*, так же как и у мутантов *rol A* и *lex A*, наблюдается высокая чувствительность клеток к γ -облучению. Вместе с тем в отличие от *lex A*-мутанта частота мутирования у *rec BC* штамма при γ -облучении выше, чем у клеток дикого типа /рис.1г/. Важным обстоятельством, на которое следует обратить особое внимание, здесь является то, что в отличие от клеток дикого типа дозовая зависимость мутагенеза у *rec BC* штамма является линейной. Следует также заметить, что у штамма JC5491 наблюдается повышенная частота спонтанного мутирования /табл.1/.

При действии ускоренных ионов дейтерия и гелия на репарационные мутанты *E.coli* в основном повторяются те же закономерности мутагенеза, выявленные при γ -облучении. На рис.2а представлены дозовые кривые мутагенеза клеток *rol A*-мутанта при облучении ионами дейтерия и гелия. Видно, что тяжелые заряженные частицы обладают несколько большей мутагенной эффективностью по сравнению с γ -излучением ^{137}Cs /табл.2/. Зависимость частоты мутирования клеток штамма P3478 от дозы ускоренных ионов имеет степенной вид / $k = 1,5$ /, так же как и при γ -облучении. Коэффициенты ОГЭ дейтронов и ионов гелия соответственно составляют 1,6±9,3 и 1,7±0,3 /табл.2/.

Мутагенная эффективность ионов гелия при облучении клеток штамма GC244, как это видно из рис.2б, меньшая, чем при γ -облучении. Коэффициент ОГЭ при этом составляет 0,4±0,1 /табл.2/. При возрастании ЛПЭ ионов с 22 до 54 кэВ/мкм величина ОГЭ снижается.

Мутагенное действие дейтронов и ионов гелия на штамм JC5491 проявляется в следующем /рис.2в,г/. При увеличении ЛПЭ частиц до 20 кэВ/мкм наблюдается возрастание коэффициентов ОГЭ, а затем отмечается постепенное снижение мутагенной эффективности частиц с дальнейшим повышением ЛПЭ. Величины коэффициентов ОГЭ приведены в табл.2.

ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные нами материалы свидетельствуют о том, что влияние мутаций *rol A*, *lex A* и *rec BC* на выживаемость клеток и частоту образования прямых мутаций в лактозном опероне при

действию ионизирующих излучений различно. Видно, что чувствительность использованных репарационных мутантов существенно выше по сравнению с клетками дикого типа, в то же время частота мутирования при облучении у них резко различна.

У мутанта *rol A*, как известно, имеется блок быстрой репарации *OR* ДНК и эксцизионной репарации короткими фрагментами, который обусловлен отсутствием ДНК полимеразы^{1/}. Из рис.1б и 1а видно, что при γ -облучении этого штамма по сравнению с клетками дикого типа наблюдается возрастание чувствительности и повышение частоты мутирования. Установлено, что высокая радиочувствительность *rol A*-мутанта обусловлена увеличением выхода энзиматических двуниевых разрывов /ЭДР/ ДНК, образующихся из первичных γ -сайтов, не восстановленных из-за отсутствия *rol A*-зависимой репарации^{7/}. Дозовая зависимость мутагенеза у этого штамма, так же как и у клеток дикого типа, имеет степенной вид. Возможные механизмы, обуславливающие квадратичный характер этой зависимости, обсуждались нами ранее^{6/}. Указывалось, что важную роль в формировании квадратичного характера зависимости $N_m/N(D)$ играет индуцибельная мутагенная ветвь *SOS*-репарации. Тот факт, что у *rol A*-мутанта, как и у клеток дикого типа, дозовые кривые мутагенеза имеют одинаковый вид, может говорить о том, что у *rol A*-мутанта индуцибельная *SOS*-система работает столь же эффективно, что и у клеток дикого типа. Действительно, эксперименты с индукцией профага λ у мутанта *P3478* свидетельствуют о справедливости этого положения^{8/}. При анализе данных, касающихся радиочувствительности и индуцированной γ -излучением мутабельности у *rol A*-мутанта, необходимо обратить внимание на следующее обстоятельство. Как видно из табл.1, величина фактора изменения дозы, выявленная для клеток этого штамма по выживаемости и по мутабельности, примерно одинакова. Это может указывать на то, что индуцированные облучением γ -сайты в равной мере участвуют в формировании летальных и мутационных событий. Премутационными повреждениями у клеток *E.coli* служат главным образом измененные основания^{9/}. Однониевые и двуниевые разрывы ДНК премутационными событиями не являются^{10/}. Повреждения оснований, составляющие наиболее частый тип нарушений структуры ДНК, у *rol A*-мутанта могут удаляться после инсцизии только в процессе *rec A - lex A*-зависимой репарации. В результате этого у *rol A*-мутанта имеет место повышенный выход ЭДР ДНК, обуславливающий возрастание радиочувствительности клеток, увеличение частоты их мутирования. Последнее обстоятельство, как можно полагать, обусловлено большим количеством премутационных повреждений, удаляемых в ходе мутагенной *rec A - lex A*-зависимой репарации.

Сопоставляя полученные нами данные с результатами других авторов, необходимо отметить следующее. При УФ-облучении штамма *P3478* частота мутирования по разным локусам не отличается от клеток дикого типа^{4,11/}. В этой связи можно предположить, что различные спектры премутационных повреждений, а также повреждений, участвующих в формировании *SOS*-сигнала при УФ- и γ -облучении, обуславливают эти различия. При γ -облучении мутанта показано^{3/}, что различия в мутагенезе заметно выражены по сравнению с клетками дикого типа у клеток в логарифмической фазе роста. Однако в стационарной фазе эти различия не выявляются.

При облучении изогенной пары штаммов *W3110* и *P3478* ускоренными ионами гелия выявлено, что частота мутирования клеток дикого типа и *rol A*-мутанта более высокая по сравнению с γ -облучением. Причины возрастания относительной генетической эффективности с увеличением ЛПЭ рассмотрены нами ранее^{6/}. Здесь лишь заметим, что некоторое возрастание величины ОГЭ отмечается и в экспериментах с *rol A*-мутантом. Последнее обстоятельство, по-видимому, связано с тем, что "комплексные" повреждения ДНК, которые не восстанавливаются *rol A*-зависимым типом репарации, играют заметную роль в мутагенном действии излучений с высокой ЛПЭ.

Анализ материалов, представленных на рис.1в и в табл.1, показывает, что у *lex A*-мутанта, так же как и у мутанта *rol A*, выявляется высокая чувствительность клеток к облучению. Известно, что повышенная по сравнению с клетками дикого типа радиочувствительность *lex A*-мутанта связана с отсутствием медленной репарации^{1/}. Блок медленной репарации, являющейся частью интегрального *SOS*-ответа клеток, обусловлен отсутствием индуцибельного синтеза *Rec A*-белка вследствие невозможности расщепления репрессора *Lex A*-белка вследствие невозможности расщепления репрессора *Lex A*-белка *Rec A*-протеазой. Вместе с тем известно, что у *lex A*-мутанта определенный уровень *Rec A*-белка имеется^{1/}. Указанные обстоятельства позволяют ожидать у *lex A*-мутанта резкое снижение, по сравнению с клетками дикого типа, частоты мутирования и отсутствие квадратичной зависимости $N_m/N(D)$. Как видно из рис.1в и табл.1, это действительно имеет место. Частота мутирования при γ -облучении штамма *lex A* резко снижена и дозовая зависимость мутагенеза носит линейный характер. Эти особенности проявления индуцированного облучением мутагенеза у клеток *lex A* можно связать с подавлением мутагенной ветви *SOS*-репарации и, вероятно, с невозможностью дерепрессии гена *umu C*, находящегося под негативным контролем *Lex A*-протеина. Линейная зависимость $N_m/N(D)$ у клеток этого штамма, как можно полагать, складывается из репликативного мутагенеза и, видимо, небольшого вклада

мутагенной ветви SOS-репарации, которая реализуется на конститутивном уровне Rec A-белка. Резкое снижение частоты мутирования у lex A-мутанта при γ -облучении выявлено и в работах других авторов^{/1/}. При облучении lex A-мутанта ускоренными ионами гелия видно, что мутагенное действие плотноионизирующих частиц менее выражено по сравнению с γ -облучением. Это обстоятельство обусловлено тем, что с увеличением ЛПЭ возрастают флуктуации энергии частиц по чувствительным структурам клеток, приводящие к снижению величины относительной генетической эффективности частиц /табл.2/. Аналогичная картина снижения величины ОГЭ выявлена нами и у клеток дикого типа при действии ускоренных ионов углерода^{/6/}. Можно ожидать, что при дальнейшем возрастании ЛПЭ излучений значения ОГЭ у lex A-мутанта будут снижаться. Более подробно роль флуктуации энергии излучений, различающихся по ЛПЭ, в их мутагенном действии на клетки E.coli рассмотрена нами ранее^{/6/}.

Влияние мутации rec BC на выживаемость и индуцированный γ -облучением мутационный процесс проявляется следующим образом. Во-первых, так же, как и у мутантов pol A и lex A, наблюдается повышенная чувствительность клеток к γ -облучению /рис.1г/. Во-вторых, в отличие от клеток дикого типа и pol A-мутанта имеет место линейный тип зависимости мутагенеза от дозы облучения. В-третьих, у rec BC-мутанта выявляется больший, чем у клеток дикого типа, индуцированный мутагенез, и, в-четвертых, отмечается повышенный темп спонтанного мутирования клеток. У rec BC-мутанта, как известно, отсутствует самая мощная экзонуклеаза клетки - экзонуклеаза U, которая осуществляет обширную деградацию нитей ДНК. Клетки этого штамма характеризуются высокой чувствительностью к γ -облучению при низкой деградации ДНК. Данное обстоятельство может указывать на то, что не двунитевые разрывы ДНК /энзиматические или прямые/ играют решающую роль в летальном действии γ -облучения. Вследствие того, что репарация медленного типа у rec BC-мутанта подавлена, можно полагать, что летальные события у этого штамма формируются из одностранных разрывов ДНК, не восстанавливаемых pol A-зависимой репарацией. Как указывалось выше, такими могут быть "комплексные" повреждения ДНК^{/3/}. Линейный характер зависимости Nm/N(D) указывает на то, что у rec BC-мутанта индуцибельная мутагенная ветвь SOS-репарации не принимает участия в мутационном процессе. Действительно, судя по индукции профага λ γ -облучением, у этого штамма SOS-ответа не наблюдается^{/8/}. Повышенная по сравнению с клетками дикого типа частота индуцированных мутаций может указывать, с одной стороны, на наличие в геноме большего числа неотрепарированных премутационных повреждений, с другой - на возможное сни-

жение корректорских функций ДНК-полимеразы III. В этой связи можно отметить указания на то, что rec BC-экзонуклеаза и ДНК-полимераза III работают в совместном мультиферментном комплексе^{/12/}. Поскольку у rec BC-мутанта наблюдается повышенная частота спонтанного мутирования, предположение о снижении корректорских функций ДНК-полимеразы III у этого штамма, по-видимому, не лишено оснований.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о сложном и неоднозначном влиянии репарации ДНК на мутационный процесс у E.coli, индуцированный излучениями с разной линейной передачей энергии. Решающую роль в нем играет индуцибельная мутагенная ветвь SOS-репарации. Особенности проявления мутаций у клеток E.coli с различным генотипом при действии ускоренных ионов гелия обусловлены характером передачи энергии тяжелых заряженных частиц генетическим структурам клеток.

ЛИТЕРАТУРА

1. Жестяников В.Д. Репарация ДНК и ее биологическое значение. Л.: Наука, 1979.
2. Witkin E. - Bacteriol. Rev., 1976, v.40, No.4, p.869.
3. Bridges B.A., Mottershead R.P. - Mut.Res., 1971, v.13, p.1.
4. Kondo S. et al. - Genetics, 1976, v.66, p.187.
5. Токарова Б. и др. ОИЯИ, P19-87-813, Дубна, 1987.
6. Амиртаев К.Г. и др. ОИЯИ, P19-88-191, Дубна, 1988.
7. Bonura T., Smith K.C. - Int.J.Radiat.Biol., 1976, v.29, No.3, p.293.
8. Бонев М., Козубек С., Красавин Е.А. ОИЯИ, P19-88-151, Дубна, 1988.
9. Doudney C.O. Photochemistry and Photobiology of Nucleic Acids. Acad. Press, New York, 1976, v.2, p.309.
10. Бреслер С.Е. - Генетика, 1976, т.12, № 12, с.153.
11. Skavronskaya A.G., Smirnov G.B. - Mut.Res., 1975, v.21, p.311.
12. Тарасов В.А. Молекулярные механизмы репарации и мутагенеза. М.: Наука, 1982.

Рукопись поступила в издательский отдел
1 ноября 1988 года.