

УДК 612.014.482

ЗАКОНОМЕРНОСТИ ТОЧНОЙ ЭКСЦИЗИИ ТРАНСПОЗОНА Tn10 В КЛЕТКАХ *E. COLI* ПРИ ОБЛУЧЕНИИ УСКОРЕННЫМИ ИОНАМИ С РАЗНОЙ ЛПЭ

А. В. Борейко, Д. В. Журавель

Объединенный институт ядерных исследований, Дубна

Рассматривается влияние излучений с разными физическими характеристиками на индукцию структурных мутаций у бактерий *Escherichia coli*. Исследованы закономерности точной эксцизии транспозона Tn10 при облучении ускоренными ионами ^4He и ^{12}C с разной линейной передачей энергии (ЛПЭ). Изучены дозовые зависимости выживаемости клеток и относительной частоты точной эксцизии транспозона. Показано, что зависимость частоты точной эксцизии Tn10 от дозы облучения ускоренными ионами описывается степенной функцией. Определены зависимости относительной биологической эффективности (ОБЭ) излучений от величины ЛПЭ частиц по критерию выживаемости клеток и эксцизии транспозона.

The induction of structural mutations in bacteria *Escherichia coli* by ionizing radiation with different physical characteristics is considered. The regularities of precise transposon Tn10 excision after ^4He and ^{12}C heavy ions with different linear energy transfer (LET) are studied. The dose-response relationships for survival cells and transposon excision are obtained. It is shown that the frequency of precise transposon Tn10 excision as a function of the dose of heavy ions is described by a power function. The dependences of relative biological effectiveness (RBE) on LET for survival cells and transposon excision are studied.

ВВЕДЕНИЕ

Исследование закономерностей индуцированного мутагенеза у прокариот при действии ионизирующих излучений разного качества служит необходимым фундаментом при интерпретации сложных механизмов, лежащих в основе мутационных процессов у высших организмов. В этой связи исследования закономерностей и механизмов мутагенного действия излучений с разной ЛПЭ на бактериальные клетки представляются весьма актуальными [1, 2]. К числу наименее изученных вопросов радиационной генетики прокариот относятся исследования закономерностей возникновения структурных мутаций: делеций, инсерций, транслокаций. Это связано как с методическими трудностями выявления таких изменений генетических структур, так и с относительно низкой частотой (по сравнению с генными мутациями) образования структурных мутаций. Закономерности индукции структурных мутаций у клеток прокариот излучениями с высокой ЛПЭ практически не изучены.

В клетках *E. coli* структурные мутации с высокой частотой возникают при транспозиции мобильных элементов. Транспозиция является специфичным SOS-мутагенным процессом, который индуцируется химическими мутагенами [3], ультрафиолетовым светом

[4, 5], а также ионизирующей радиацией. Ранее нами выполнены исследования индуцированной эксцизии транспозона Tn10 в клетках с нормальным репарационным генотипом и у гес-мутантов *E. coli* при действии γ -излучения ^{137}Cs [6]. Была получена дозовая зависимость относительной частоты элиминации транспозона Tn10, имеющая форму кривой с насыщением. Показано, что большое значение в процессе эксцизии имеют индуцибельные гены репарации: в клетках мутанта гесА индуцированная элиминация транспозона Tn10 отсутствует полностью, а в клетках мутанта гесN — сильно редуцирована.

Задачей настоящего исследования являлось изучение точной эксцизии транспозона Tn10 в клетках *E. coli* при облучении ускоренными ионами в широком диапазоне ЛПЭ частиц.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

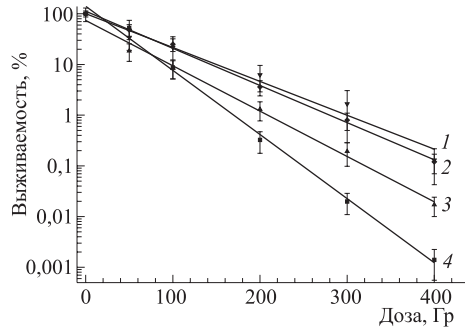
Бактериальные среды, штаммы. Для получения суспензии бактериальных клеток была использована жидкая питательная среда Luria-Bertrani (LB), содержащая: 0,5 % дрожжевого экстракта, 1 % хлорида натрия и 1 % триптона. При определении выживаемости бактерий использовали твердую питательную среду LB с добавлением 1,5 % бактоагара, произведенного фирмой «Difco», США. При анализе реверсий, вызванных точной эксцизией транспозона Tn10, использовали минимальную питательную среду M56, приготовленную на основе солевого буфера: 11,4 г/л $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 2,7 г/л KH_2PO_4 , 1 г/л $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 100 мг/л $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 7 мг/л $\text{CaNO}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ и 0,2 г/л D-глюкозы. В качестве тест-системы для анализа точной эксцизии транспозона Tn10 был использован бактериальный штамм DB 5872 [7]. Он несет мутацию гена *cusC95*, который определяет потребность клетки в цистеине. Мутация получена методом встраивания транспозона Tn10 и приводит к тому, что клетки не образуют колоний на минимальной питательной среде.

Облучение клеток. Эксперименты по облучению клеток *E. coli* тяжелыми ионами проводили на установке «Геном», сконструированной для облучения биологических объектов [8]. Для индукции точной эксцизии были использованы ионы гелия ^4He с ЛПЭ: 20, 50 и 100 кэВ/мкм — и ускоренные ионы углерода ^{12}C с ЛПЭ 200 кэВ/мкм. Клеточную суспензию наносили на микропористый фильтр, помещенный в специальный контейнер на поверхности агаризованной среды, затем облучали пучком ускоренных ионов. После облучения фильтр, содержащий на своей поверхности бактериальные клетки, встряхивали в 1 мл буфера M56, отбирали 100 мкл для определения выживаемости, а остальное количество высевали на поверхность минимальной питательной среды M56 с агаром. Макроколонии, формирующиеся из клеток, в которых произошла точная эксцизия транспозона Tn10 из локуса *cusC95*, подсчитывали через 72 ч инкубации при 37 °С.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 1 представлены кривые выживаемости при облучении использованными видами излучений. Как можно видеть, максимальное значение радиочувствительности клеток $0,027 \text{ Гр}^{-1}$ выявлено при действии ионов гелия ^4He , для которых ЛПЭ в биологическом образце составляет 100 кэВ/мкм. Ионы гелия с ЛПЭ 20 кэВ/мкм имеют

Рис. 1. Выживаемость бактерий *E. coli* при облучении ускоренными ионами: 1 — ^{12}C , ЛПЭ = 200 кэВ/мкм; 2 — ^4He , ЛПЭ = 20 кэВ/мкм; 3 — ^4He , ЛПЭ = 50 кэВ/мкм; 4 — ^4He , ЛПЭ = 100 кэВ/мкм



меньшее значение радиочувствительности — 0,018 Гр. При облучении ионами углерода с ЛПЭ 200 кэВ/мкм получено минимальное значение радиочувствительности, равное $0,015 \text{ Гр}^{-1}$, которое незначительно превышает радиочувствительность *E. coli* при γ -облучении ^{137}Cs [9].

На рис. 2 представлены зависимости относительной частоты точной эксцизии транспозона Tn10 от дозы облучения ускоренными ионами. Видно, что относительная частота точной эксцизии транспозона является степенной функцией. Для кривых, полученных при облучении ускоренными ионами гелия ^4He с ЛПЭ 20, 50 и 100 кэВ/мкм можно ввести общий вид функции:

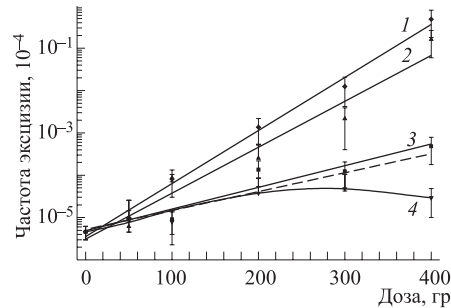
$$\frac{N}{N_R} = 10^{kD+C},$$

где отношение числа реверсий к общему числу выживших клеток N/N_R является относительной частотой точной эксцизии транспозона Tn10. Степенным аргументом этой функции является доза (D), которая вместе с коэффициентами (k, C) входит в показатель таким образом, чтобы он оказался безразмерной величиной в диапазоне $10^{-10} - 10^{-4}$.

По кривым, которые описывают зависимости относительной частоты точной эксцизии транспозона Tn10 от дозы облучения ускоренными ионами, были определены обратные значения дозы D_R^{-1} , при которых относительная частота точной эксцизии транспозона возрастает на один порядок. Эти значения представлены в таблице, и по ним рассчитаны величины относительной генетической эффективности (ОГЭ) частиц.

На рис. 3 представлены зависимости ОБЭ, по критерию летального эффекта, и ОГЭ, по критерию эффективности точной эксцизии транспозона от ЛПЭ. Видно, что максимально значение ОБЭ приходится на значение ЛПЭ, равное около 100 кэВ/мкм. В отличие от этого, максимум ОГЭ наблюдается при меньшем значении ЛПЭ — в диапазоне 20–50 кэВ/мкм.

Рис. 2. Дозовые зависимости относительной частоты точной эксцизии Tn10 при действии ускоренных тяжелых ионов: 1 — ^4He , ЛПЭ = 20 кэВ/мкм; 2 — ^4He , ЛПЭ = 50 кэВ/мкм; 3 — ^4He , ЛПЭ = 100 кэВ/мкм; 4 — ^{12}C , ЛПЭ = 200 кэВ/мкм. Пунктирной линией показана нормировка по γ -излучению



Значения радиочувствительности, коэффициентов ОБЭ и ОГЭ при облучении ускоренными ионами с разной ЛПЭ

Вид излучения	ЛПЭ, кэВ/мкм	D_0^{-1} , Гр ⁻¹	D_R^{-1} , Гр ⁻¹	ОБЭ	ОГЭ
γ -излучение ¹³⁷ Cs	0,3	0,014 ± 0,003	0,005 ± 0,001	1,0 ± 0,2	1,0 ± 0,2
⁴ He	20	0,018 ± 0,004	0,012 ± 0,003	1,3 ± 0,4	2,4 ± 0,6
⁴ He	50	0,025 ± 0,005	0,010 ± 0,002	1,8 ± 0,3	2,0 ± 0,4
⁴ He	100	0,027 ± 0,006	0,006 ± 0,002	1,9 ± 0,5	1,2 ± 0,4
¹² C	200	0,015 ± 0,004	0,003 ± 0,001	1,1 ± 0,4	0,6 ± 0,2

Сопоставление полученных результатов с данными, ранее опубликованными другими авторами, позволяет оценить особенности точной эксцизии транспозона Tn10 при облучении ускоренными ионами с разной ЛПЭ. В нашей работе получены экспоненциальные зависимости выживаемости клеток *E. coli* от дозы облучения ускоренными ионами (рис. 1). При облучении ускоренными ионами гелия с ЛПЭ от 20 до 100 кэВ/мкм наблюдается увеличение угла наклона дозовой зависимости выживаемости. При этом ОБЭ по критерию летального выхода увеличивается от значения 1,3 до значения 1,9 (таблица). Возрастание коэффициентов ОБЭ связано с увеличением выхода двунитевых разрывов ДНК, которые являются основными летальными повреждениями в клетках *E. coli* дикого типа [1].

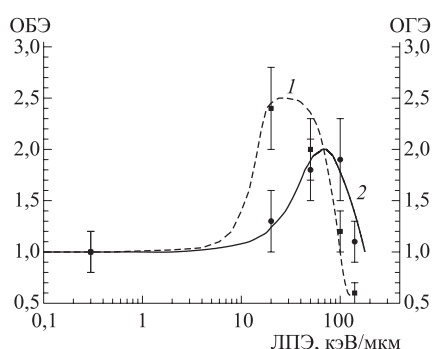


Рис. 3. Зависимости ОБЭ и ОГЭ от ЛПЭ: 1 — ОГЭ (ЛПЭ); 2 — ОБЭ (ЛПЭ)

Дальнейшее увеличение ЛПЭ частиц приводит к уменьшению угла наклона кривых, а при облучении ускоренными ионами углерода ОБЭ составляет 1,1. Зависимость ОБЭ (ЛПЭ) вследствие этого имеет локальный максимум при значении ЛПЭ, равном приблизительно 100 кэВ/мкм. Такой характер зависимости согласуется с результатами других авторов, которые ранее исследовали радиочувствительность *E. coli* при облучении ускоренными ионами [10].

В отсутствие облучения частота точной эксцизии не превышает 10^{-10} – 10^{-8} на клетку *E. coli*. Этот параметр был определен для точной эксцизии транспозона Tn10 из различных положений на бактериальной хромосоме [11]. При увеличении дозы облучения происходит индукция относительной частоты точной эксцизии транспозона до значения 10^{-4} событий на клетку. Впервые эффект индукции был продемонстрирован при обработке химическими мутагенами и облучении разными дозами ультрафиолетового света [3, 4]. Авторами показано, что относительная частота точной эксцизии транспозона Tn10 может возрастать до 10^{-5} событий на клетку. Точная эксцизия при облучении ультрафиолетовыми лучами вызывается SOS-ответом клетки на увеличение выхода повреждений ДНК — преимущественно тиминовых димеров. В случае облучения ускоренными ионами значительное увеличение относительной частоты точной эксцизии, по-видимому, вызвано увеличением выхода кластерных повреждений одной нити ДНК [2], вызываемых δ -электронами треков тяжелых заряженных частиц и индуцирующих SOS-ответ клеток.

Выход таких повреждений в зависимости от ЛПЭ частиц описывается кривыми с локальным максимумом, положение которого варьирует в зависимости от степени тяжести индуцируемых повреждений ДНК [12]. Из представленных материалов следует, что по сравнению с летальным эффектом облучения, максимум зависимости ОГЭ (ЛПЭ) сдвинут в область меньших значений ЛПЭ. Это связано с тем обстоятельством, что максимальные значения выхода двунитевых разрывов ДНК на единицу дозы облучения приходятся на значения ЛПЭ, равные ≈ 200 кэВ/мкм. Максимальные значения выхода кластерных повреждений одной нити ДНК реализуются при существенно меньших величинах ЛПЭ частиц. Вследствие этого максимальные величины ОГЭ, определяемые по критерию эффективности точной эксцизии Tn10, сдвинуты в область меньших значений ЛПЭ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Красавин Е. А. Проблема ОБЭ и репарация ДНК. М., 1989. С. 193.
2. Красавин Е. А., Козубек С. Мутагенное действие излучений с разной ЛПЭ. М., 1991. С. 183.
3. Аleshkin Г. И., Марков А. П., Астафьева И. П. Индукция правильного вырезания транспозонов Tn1 и Tn10 УФ-светом и 4-нитрохинолин-N-оксидом в клетках *E. coli* // Молекулярная генетика. 1983. Т. 8. С. 23–31.
4. Aleshkin G. I., Kadzhaev K. V., Markov A. P. High and low UV-dose responses in SOS-induction of the precise excision of transposons Tn1, Tn5, and Tn10 in *E. coli* // Mutat. Res. 1998. V. 401, No. 1–2. P. 179–191.
5. Chan A., Nagel R. RecN SOS gene and induced precise excision of Tn10 in *E. coli* // Mutat. Res. 1997. V. 381, No. 1. P. 111–115.
6. Журавель Д. В., Борейко А. В. Закономерности эксцизии транспозона Tn10 в клетках *rec*-мутантов *E. coli* при γ -облучении // Радиобиология. 2002. Т. 42, № 5. С. 488–491.
7. Berg C. M., Curtis R. Transposition derivatives of an Hfr strain of *Escherichia coli* K-12 // Genetics. 1967. V. 56, No. 3. P. 503–525.
8. Череватенко А. П. Физико-дозиметрическая установка «Геном» для проведения радиобиологических экспериментов на пучках тяжелых ионов циклотрона У200 ОИЯИ // Тр. рабоч. совещ. по генетическому действию корпускул. излучений. Дубна, 1989. С. 300–303.
9. Журавель Д. В. Индукция генетических перестановок в бактериях // Вестн. междунар. ун-та «Дубна». 2002. № 5. С. 33–37.
10. Григорьев Ю. Г. и др. Исследование радиочувствительности *E. coli* В при облучении тяжелыми ионами // Радиобиология. 1971. Т. 11, № 2. С. 245–248.
11. Kleckner N. DNA sequence analysis of Tn10 insertions: origin and role of 9 bp flanking repetitions during Tn10 translocation // Cell. 1977. V. 11. P. 11–23.
12. Michalik V. Model of DNA damage induced by radiations of various qualities // Intern. J. Radiat. Biol. 1992. V. 62. P. 9–20.

Получено 25 октября 2004 г.