

P19-2005-170

А. В. Борейко, А. П. Булах

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ИНДУКЦИИ
ГЕННЫХ МУТАЦИЙ У *BACILLUS SUBTILIS*
И *ESCHERICHIA COLI* ПРИ ДЕЙСТВИИ
ИЗЛУЧЕНИЙ С РАЗНОЙ ЛПЭ

Борейко А. В., Булах А. П.

P19-2005-170

Сравнительное исследование индукции генных мутаций у *Bacillus subtilis* и *Escherichia coli* при действии излучений с разной ЛПЭ

Представлены результаты исследований мутагенного действия излучений с разными физическими характеристиками на бактериальные клетки с различным генотипом. На вегетативных клетках спорообразующих бактерий *Bacillus subtilis* и клетках *E. coli* показано, что закономерности индуцированного мутационного процесса у этих объектов близки между собой: дозовая зависимость для клеток дикого типа при γ -облучении имеет линейно-квадратичный характер, зависимость ОБЭ от ЛПЭ описывается кривой с локальным максимумом в области 20 кэВ/мкм. Решающую роль в реализации индуцированного мутационного процесса играет индуцибельная, склонная к ошибкам ветвь *SOS*-репарации, которая имеет место у клеток *E. coli* и *Bacillus subtilis*.

Работа выполнена в Лаборатории радиационной биологии ОИЯИ.

Сообщение Объединенного института ядерных исследований. Дубна, 2005

Boreyko A. V., Bulah A. P.

P19-2005-170

The Comparative Investigation of Gene Mutation Induction in *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* Cells after Irradiation by Different LET Radiation

The data of mutagenic action of ionizing radiation with different physical characteristics on bacterial cells with various genotypes are presented. It was shown that regularities of inducible mutagenesis in *Bacillus subtilis* and *E. coli* are consimilar. The dose-response dependence for both types of cells is described by the linear-quadratic function. The RBE on LET relationship has a local maximum at 20 keV/ μ m. The crucial role in inducible mutagenesis in *E. coli* and *Bacillus subtilis* cells is played by the error-prone *SOS*-repair.

The investigation has been performed at the Laboratory of Radiation Biology, JINR.

Communication of the Joint Institute for Nuclear Research. Dubna, 2005

Исследование закономерностей образования генных мутаций у бактерий с различным уровнем организации генетического аппарата при действии ДНК-повреждающих факторов позволяет получить важную информацию для понимания механизмов индуцированного мутагенеза у клеток различного происхождения. Известно, что многие роды бактерий, такие как *Haemophilus*, *Streptococcus*, *Methylococcus*, *Deinococcus radiodurans* (Kimbal et al., 1971; Drake, 1976; Moseley, 1983) не мутируют под действием ионизирующих излучений, ультрафиолетового света и разнообразных химических мутагенов. Привлекают внимание результаты, полученные при облучении различных репарационно-дефицитных мутантов спор *Bacillus subtilis*, у которых был обнаружен более высокий мутагенез у *recA1*-мутанта по сравнению с клетками дикого типа и *polA*-мутанта (Baltchukat and Horneck, 1991). Вместе с тем известно, что у бактерий *E. coli* мутация в гене *recA* полностью блокирует мутационный процесс. Вышеизложенные обстоятельства требуют тщательного исследования мутагенных эффектов облучения у различных видов бактерий. С учетом сказанного представляет интерес провести сравнительное исследование закономерностей индуцированного мутационного процесса у спорообразующих вегетативных клеток *Bacillus subtilis* и бактерий *E. coli* при действии ионизирующих излучений с разными физическими характеристиками. Это и явилось целью настоящей работы.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В работе использованы следующие штаммы клеток *Bacillus subtilis* дикого типа: *BS168* (*his A*, *trp C2*) и *HA 101* (*his*, *met*, *leu*), полученные из коллекции Института общей генетики РАН (Москва) и Института космической биологии и медицины (Кельн, ФРГ). Для экспериментов выращивали ночные культуры при 37 °С в NB-среде (питательный бульон «Difco» 8 г, NaCl 4 г на 1 л дистиллированной воды) до стационарной фазы (10^8 клеток/мл). Суспензию клеток отмывали и ресуспендировали в буферном растворе следующего состава: 0,01 М NaHPO_4 , 0,01 М Na_2HPO_4 , 0,2 М NaCl. В экспериментах с бактериями *E. coli* были использованы штаммы *E. coli* дикого типа: *B*, *W3110*, *X7026*, штаммы-продуценты колицинов: *T20* (*colB-K260*), *M32-T19* (*colM-K260*), *C600* (*colD*) и бактериофаг $\varphi 80v$. В работе использовали лизат вирулентного фага $\varphi 80$, имеющего титр не менее $1 \cdot 10^{10}$ фаговых частиц/мл.

На клетках *Bacillus subtilis* исследовали частоту образования $his^- \rightarrow His^+$ -ревертантов после облучения γ -квантами и ускоренными тяжелыми ио-

нами. В экспериментах с бактериями *E. coli* исследовалась частота образования прямых мутаций *tonB* и *colB* при действии излучений с разной ЛПЭ в широком диапазоне. Для выделения клеток, имеющих мутацию в *tonB*-локусе, ночную культуру выращивали в полной питательной среде (LB). Облученные клетки высевали на чашки Петри с питательной LB-средой для определения выживаемости. Для выявления мутаций засевали по $1-3 \cdot 10^8$ клеток в 100 мл жидкой питательной LB-среды. Инкубацию проводили в течение 6–8 ч при 37 °С с аэрацией, до стационарной фазы роста. Для выявления *colB^{res}φ80^{res}*-клеток до посева на чашки Петри с колицинами проводили обработку исследуемых клеток лизатом фага φ80v. Для этого к 0,9 мл φ80v лизата добавляли 0,1 мл суспензии клеток ($2-3 \cdot 10^8$ кл.). Адсорбцию проводили при 37 °С в течение 15–20 мин. Затем обработанные фагом клетки высевали на чашки Петри с селективной средой, содержащей колициновый препарат. После 36–48 ч инкубации подсчитывали число выросших колоний.

В качестве источников ионизирующих излучений использовали γ-кванты ^{137}Cs , а также ускоренные ионы гелия и углерода с разной энергией. Облучение γ-квантами ^{137}Cs проводили с мощностью дозы 20 Гр/мин. Источником многозарядных ионов служил ускоритель У-200 Объединенного института ядерных исследований. Мощность дозы тяжелых ионов составляла 12 Гр/мин. Частоту индуцированных мутаций (М) оценивали, используя следующее выражение

$$M = (m - m_0)/N,$$

где m — количество *his⁺*-ревертантов на чашку после облучения; m_0 — число ревертантов на чашке без облучения; N — количество выживших клеток на чашке после облучения.

При статистической обработке полученных результатов зависимости частоты мутирования клеток ($N_m/N(D)$, где N_m — количество мутантов, N — количество выживших клеток) от дозы облучения (D), аппроксимировали степенной или линейно-квадратичной функцией, используя стандартный статистический метод для оптимизации параметров.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 1 представлена дозовая зависимость частоты мутирования вегетативных клеток двух использованных в экспериментах штаммов *B. subtilis* дикого типа при γ-облучении. Полученные данные свидетельствуют о том, что для вегетативных клеток характерна линейно-квадратичная зависимость мутагенеза. При дозах облучения, соответствующих значениям ≥ 100 Гр, дозовая зависимость аппроксимируется линейной функцией (рис. 1, б), а при более высоких уровнях доз кривая близка к квадратичной. Из рис. 2 видно, что блокирование различных репарационных генов существенно влияет на

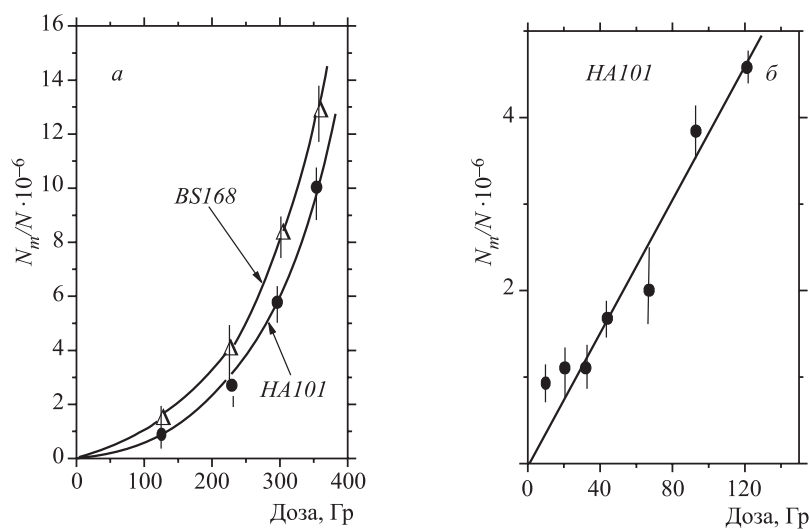


Рис. 1. Зависимость частоты мутирования $his^- \rightarrow His^+$ вегетативных клеток HA101 и BS168 от дозы γ -облучения

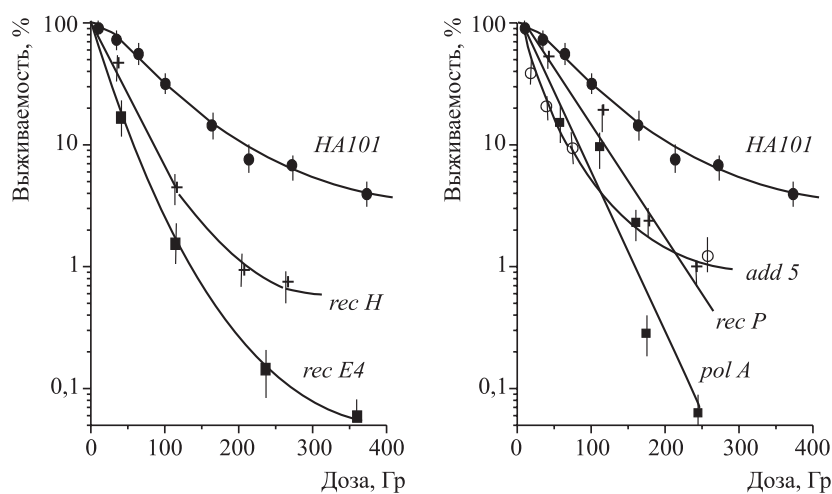


Рис. 2. Влияние мутаций в различных генах, контролирующих репарацию ДНК, на выживаемость клеток *Bacillus subtilis* при γ -облучении

радиочувствительность клеток и индуцированный мутационный процесс. У всех репарационных мутантов, использованных в экспериментах, наблюдается повышение радиочувствительности клеток. В наибольшей степени это наблюдается для штаммов *rec E* и *pol A*. Влияние мутаций *rec E* и *pol A*

по-разному сказывается на мутационном процессе у γ -облученных клеток. У *rec E*-мутантов мутагенез практически полностью подавлен, а у *pol A*-штамма частота мутирования выше, чем у клеток дикого типа (рис. 3). Штаммы, несущие мутацию в генах *rec P* и *add 5*, также проявляют большую мутабельность по сравнению с клетками дикого типа.

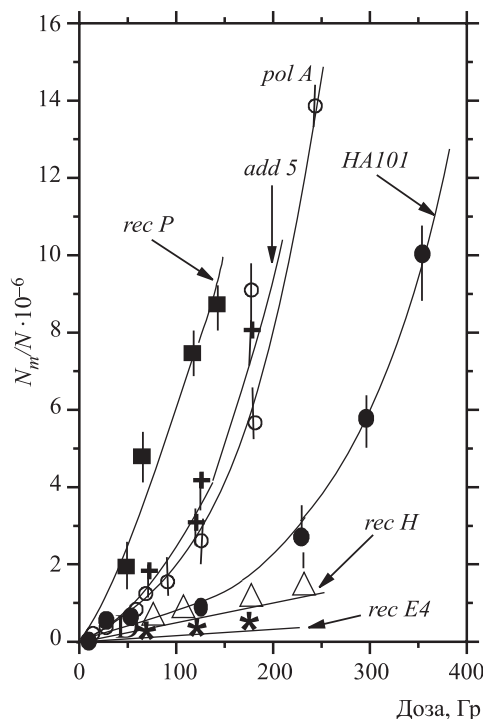


Рис. 3. Зависимость частоты мутирования различных репарационных мутантов клеток *Bacillus subtilis* при γ -облучении

Зависимости частоты мутирования генов *ton B* и *col B* от дозы γ -излучения, ускоренных ионов гелия с различной энергией и ионов углерода у клеток *E. coli* X7026 представлены на рис. 4. Как можно видеть, для всех использованных видов излучений наблюдается степенная зависимость частоты образования *ton B* и *col B*-мутаций от дозы. В логарифмическом масштабе дозовые зависимости представляют собой прямые с тангенсом угла наклона $x = 1,7-1,8$, что свидетельствует о квадратичном характере этих зависимостей. Наиболее высокая эффективность в индукции мутаций наблюдается в экспериментах с ускоренными ионами гелия с ЛПЭ = 20 кэВ/мкм. При действии ионов гелия с ЛПЭ = 78 кэВ/мкм и ускоренных ионов углерода му-

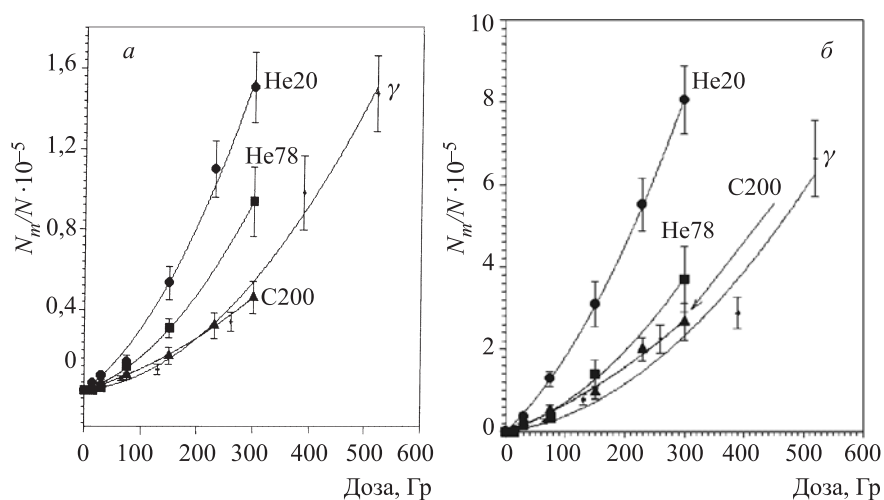


Рис. 4. Частота образования *colB*-мутаций (а) и *tonB*-мутаций (б) при действии излучений с разной ЛПЭ (He20, He78, C200 обозначают величину ЛПЭ тяжелых заряженных частиц)

тагенная эффективность снижается. Аналогичный характер дозовых кривых мутагенеза при действии излучений с разной ЛПЭ наблюдается и для клеток *Bacillus subtilis* (рис. 5).

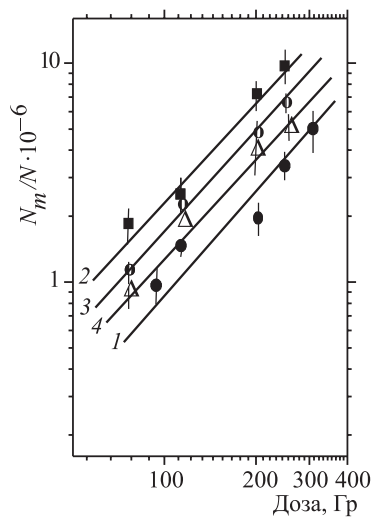


Рис. 5. Зависимость частоты мутирования $his^- \rightarrow His^+$ клеток *Bacillus subtilis* HA101 и BS168 от дозы облучения γ -квантами и ионами гелия с разной ЛПЭ (1 — γ -кванты; 2 — 22 кэВ/мкм; 3 — 42 кэВ/мкм; 4 — 72 кэВ/мкм)

Квадратичный характер кривых мутагенеза, как известно, обусловлен тем, что для образования точковых мутаций необходима реализация двух независимых друг от друга событий «попадания» — возникновения премутационного повреждения в изучаемом локусе, во-первых, и наличия повреждения, индуцирующего систему *SOS*-репарации, которая и способствует закреплению изменения в бактериальной ДНК в виде мутаций, во-вторых. Таким образом, квадратичный характер кривых мутагенеза отражает участие системы *SOS*-репарации в мутационном процессе, которая является необходимым фактором реализации репаративного мутагенеза.

Анализ результатов современных исследований, касающихся организации системы репарации у бактерий *Bacillus subtilis*, свидетельствует о том, что система восстановления повреждений ДНК у этих клеток имеет много общих черт с бактериями *Escherichia coli*. У *Bacillus subtilis* эффективно функционирует репарационный механизм, связанный с участием урацил-N-гликозилазы. Эксцизионная *polA*-зависимая репарация с участием ДНК-полимеразы, кодируемой геном *polA*, выполняет те же функции, что и у бактерий *E. coli*. Система *SOS*-репарации у клеток *Bacillus subtilis* не является узкоспецифичной для УФ-повреждений и качественно не отличается от *SOS*-системы бактерий *E. coli*. Было установлено, что *SOS*-система *Bacillus subtilis* организована более сложно, чем у клеток *E. coli*. Рекомбинационный путь репарации повреждений ДНК у клеток *Bacillus subtilis* осуществляется с участием группы *rec*-генов: *addA*, *addB*, *recA*, *recB*, *recD*, *recF*, *recU*, *recH*, *recL*, *recP*, *recR* и *recS*. Эти гены принимают участие в репарации повреждений ДНК вместе с ДНК-полимеразами, *SSB*-, *Mfd*-, *Hbsu*-белками, ДНК-лигазой, топоизомеразами и другими продуктами. У *B. subtilis* эти гены объединены в пять эпистатических групп: α , β , γ , ε и ζ . Центральная роль в этом типе репарации, как и у клеток *E. coli*, принадлежит *RecA*-белку, кодируемому геном *recE*, являющимся аналогом гена *recA* у клеток *E. coli*. *RecA*-белок у *B. subtilis*, так же как и *RecA*-белок в активированной форме у *E. coli*, расщепляет *LexA*-репрессор. *LexA*-белок по своим функциям аналогичен *LexA*-протеину у клеток *E. coli*.

У клеток *E. coli*, как известно, возникновение *SOS*-повреждения в клетке активирует конститутивный *RecA*-белок в *RecA*-протеазу (*RecA**). Повышение уровня *RecA*-протеазы приводит к дерепрессии индуцибельных генов, и прежде всего генов *recA*, *umiD*, *umiC*, а также *lexA* и других генов. Увеличение экспрессии *lexA*-гена не приводит к повышению уровня *LexA*-белка, поскольку он сразу расщепляется *RecA*-протеазой. *RecA*-протеаза в ходе *SOS*-ответа расщепляет *UmiD*-белок, переводя его в активную *UmiD'*-форму. *UmiD'* тесно связывается с *UmiC*-белком в стабильный *UmiD'*₂*C*-комплекс (*Pol V*). Этот комплекс, обладая выраженной полимеразной активностью, преодолевает различные ДНК-аддукты, делая ошибочные подстановки оснований (Reuven et al., 1999). Деградация мутагенной активности

Umu D'-субъединицы и снижение активности ДНК-полимеразы *V* позволяет клетке вернуться в стационарное состояние и репарировать повреждения безошибочными путями репарации. *Umu D₂C*-комплекс (*Umu D₂C*), включаясь в регуляцию клеточного цикла, останавливает репликативный синтез ДНК при наличии *SOS*-индуцирующих повреждений и позволяет осуществить процесс translesion synthesis (TSL). Комплекс *Umu DD'C* играет ингибирующую роль в *SOS*-мутагенезе, секвестрируя *Umu D'*-активности. Участие ДНК-полимеразы III или некоторых ее субъединиц приводит к повышению эффективности TLS. Ее участие может либо реализовываться на стадии инициации TLS, либо этот фермент способствует «протягиванию» комплекса *Umu C*, *Umu D'*, *Rec A*, *SSB* через сайты с повреждениями.

Основные характеристики мутагенеза, индуцированного излучениями с разной ЛПЭ, у бактерий *E. coli* и вегетативных клеток *Bacillus subtilis*

<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Escherichia coli</i>
Дозовая зависимость для клеток дикого типа при γ -облучении имеет линейно-квадратичный характер.	Дозовая зависимость для клеток дикого типа при γ -облучении имеет линейно-квадратичный характер.
Линейно-квадратичный тип зависимости сохраняется при возрастании ЛПЭ излучений.	Линейно-квадратичный тип зависимости сохраняется при возрастании ЛПЭ излучений.
Зависимость ОБЭ от ЛПЭ имеет локальный максимум.	Зависимость ОБЭ от ЛПЭ имеет локальный максимум.
Частота мутирования клеток <i>polA</i> -мутанта при γ -облучении выше, чем у дикого штамма.	Частота мутирования клеток <i>polA</i> -мутанта при γ -облучении выше, чем у дикого штамма.
Мутация <i>rec E</i> практически полностью блокирует мутационный процесс	Мутация <i>rec A</i> полностью блокирует мутационный процесс.
У мутанта <i>add 5</i> наблюдается повышенная по сравнению с клетками дикого типа частота индукции мутаций.	У мутанта <i>rec BC</i> наблюдается повышенная по сравнению с клетками дикого типа частота индукции мутаций.

Таким образом, закрепление премутационного повреждения в мутацию точкового типа при действии ионизирующих излучений есть результат работы различных ферментативных механизмов, и в том числе, как одного из главных, — мультиферментного комплекса, включающего в себя индуцибельную ДНК-полимеразу *V* (*Umu D₂C*), *Rec A*-протеазу, *SSB*-белки, субъединицы ДНК-полимеразы III. В последнее время близкие по своему содержанию механизмы закрепления премутационных повреждений в мутацию обнаружены и у клеток *Bacillus subtilis* (Huang-Mo Sung et al., 2003).

Суммируя полученные нами результаты исследований (таблица), можно прийти к заключению о том, что закономерности мутагенеза у вегетативных клеток *B. subtilis*, индуцированного ионизирующими излучениями с разной линейной передачей энергии, весьма близки к тем, которые выявляются при облучении бактерий *E. coli* и *Salmonella typhimurium* (Е. А. Красавин, С. Козубек, 1991). Действительно, как можно видеть из таблицы, закономерности мутагенного действия излучений, различающихся по ЛПЭ в широком диапазоне, на вегетативные клетки *Bacillus subtilis* и клетки *E. coli* аналогичны по всем использованным критериям сопоставления. Это может быть весомым аргументом в пользу того, что молекулярные механизмы, определяющие индуцированный ионизирующими излучениями мутационный процесс у этих клеток, весьма близки между собой. Решающую роль в реализации индуцированного мутационного процесса играет индуцибельная, склонная к ошибкам ветвь *SOS*-репарации, которая имеет место у клеток *E. coli* и *Bacillus subtilis*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kimball R. F., Setlow J. K., Liu M. // Mutat. Res. 1971. V. 12. P. 21–28.
2. Drake J. W. // Ann. Rev. Biochem. 1976. V. 45. P. 11–37.
3. Moseley B. E. // Photochem. Photobiol. Rev. 1983. V. 7. P. 323–334.
4. Baltschukat K., Horneck G. // Radiat. Environ. Biophys. 1991. V. 30. P. 87–103.
5. Petit M. A., Ehrlich D. // The EMBO Journal. 2002. V. 21, No. 12. P. 3137–3142.
6. Reuven N. B., Arad G., Maor-Shoshani A., Livneh Z. // J. Biol. Chem. 1999. V. 274, No. 45. P. 31763–31766.
7. Huang-Mo Sung, Yeaman G., Ross C., Yasbin R. E. Roles of YgjH and YgjW // J. Bacteriol. 2003. V. 185, No. 7. P. 2153–2160.
8. Красавин Е. А., Козубек С. Мутагенное действие излучений с разной ЛПЭ. М.: Энергоатомиздат, 1991. С. 183.

Получено 31 октября 2005 г.

Редактор *М. И. Зарубина*

Подписано в печать 12.01.2006.

Формат 60 × 90/16. Бумага офсетная. Печать офсетная.

Усл. печ. л. 0,5. Уч.-изд. л. 0,61. Тираж 220 экз. Заказ № 55173.

Издательский отдел Объединенного института ядерных исследований
141980, г. Дубна, Московская обл., ул. Жолио-Кюри, 6.

E-mail: publish@pds.jinr.ru

www.jinr.ru/publish/