

P19-2000-110

А.В.Борейко, А.П.Булах, Е.А.Красавин

**ЗАКОНОМЕРНОСТИ
МУТАГЕННОГО ДЕЙСТВИЯ γ -ИЗЛУЧЕНИЯ
НА ВЕГЕТАТИВНЫЕ КЛЕТКИ *BACILLUS SUBTILIS*
С РАЗНЫМ РЕПАРАЦИОННЫМ ГЕНОТИПОМ**

Известно, что частота образования мутаций от дозы облучения у клеток *Escherichia coli* определяется участием ряда индуцибельных генов, влияющих на осуществление репарации повреждений ДНК. При этом процессы репарации являются не только фактором, модифицирующим частоту возникновения мутаций, но и составляют необходимое условие реализации индуцированного мутационного процесса. Установлено [1-3], что у спорообразующих бактерий *Bacillus subtilis*, как и у клеток *Escherichia coli*, индуцированный мутагенез сильно зависит от состояния различных структурных и регуляторных генов. У *Bacillus subtilis* организация и взаимодействие таких генов оказываются более сложными по сравнению с SOS-системой бактерий *Escherichia coli*. Влияние репарационных генов на радиационно-индуцированный мутагенез у клеток *Bacillus subtilis* в споровом и вегетирующем состояниях, по-видимому, также может проявляться неоднозначно. В этой связи представляются важными исследования закономерностей мутагенеза у спорообразующих бактерий при облучении в вегетирующем и споровом состояниях, изучение влияния на этот процесс репарационных генов. С учетом этого привлекают внимание исследования радиационного мутагенеза на репарационно - дефицитных штаммах спор *Bacillus subtilis* [4], где было показано, что частота образования мутаций у *recA*-мутанта выше, чем у клеток дикого типа. Эти наблюдения противоречат многочисленным экспериментам, проведенным на репарационных мутантах бактерий *Escherichia coli*. В связи с вышеизложенным целью настоящей работы явилось изучение особенностей образования мутаций у разных репарационных мутантов вегетативных клеток *Bacillus subtilis* и сопоставление их с ранее полученными результатами на бактериях *Escherichia coli*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использованы различные штаммы клеток *Bacillus subtilis* дикого типа и репарационно - дефицитные мутанты (табл. 1): BS 168, rec H, gsy 908, любезно предоставленные А.А.Прозоровым (Институт общей генетики РАН, Москва), и HA 101, HA 101F, полученные от Г. Хорнек (Институт космической биологии и медицины, Кёльн, ФРГ).

Таблица 1

Штаммы *Bacillus subtilis*, использованные в экспериментах

Штамм	Генотип
BS 168	<i>hisA, trpC2</i>
rec H	<i>hisH, recH342</i>
gsy 908	<i>argF4, hisA1, recE4</i>
gsy 2258	<i>hisH, metB5, add5</i>
HA 101	<i>his, met, leu</i>
HA 101F	<i>polA1, his, met, leu</i>

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 M NaH_2PO_4 , 0,01 M Na_2HPO_4 , 0,2 M NaCl.

Для γ -облучения использовали источник ^{137}Cs с мощностью дозы ~24 Гр/мин (установка «Свет»). Облучение клеточных суспензий проводили в стеклянных пробирках при температуре 4° С. После облучения клеточные суспензии десятикратно концентрировали путем центрифугирования и рассеивали на чашки Петри с минимальной твердой питательной средой Спицайзена [5]. Мутантные колонии подсчитывали через 72 ч инкубации при температуре 37° С. Для определения выживаемости клеток аликвоты

после соответствующего разведения помещали на LB - агар. Колонии подсчитывали после 15 ч инкубации при температуре 37°C.

Частоту индуцированных мутаций (M) оценивали согласно [6], используя следующую формулу:

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

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 [7].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис.1 приведены дозовые кривые выживания и частота мутирования двух штаммов *B.subtilis* дикого типа. В отличие от линейных зависимостей мутагенеза, наблюдаемых при облучении клеток в споровом состоянии [4], для вегетативных клеток выявляются линейно-квадратичные зависимости. Линейный участок этой кривой для штамма HA 101 реализуется в диапазоне доз, достигающих 100 Гр. При более высоких дозах выявляется зависимость, близкая к квадратичной.

Мутация в *rolA*-гене приводит к тому, что радиочувствительность клеток резко повышается и существенно возрастает частота мутирования клеток этого штамма (рис.2). Дозовая зависимость мутагенеза при этом имеет линейно-квадратичный характер, так же как и у клеток дикого типа.

Хорошо известно, что блокирование *recA*- и *lexA*-генов у клеток *E.coli* полностью инактивирует индуцибельный мутационный процесс [7]. В наших

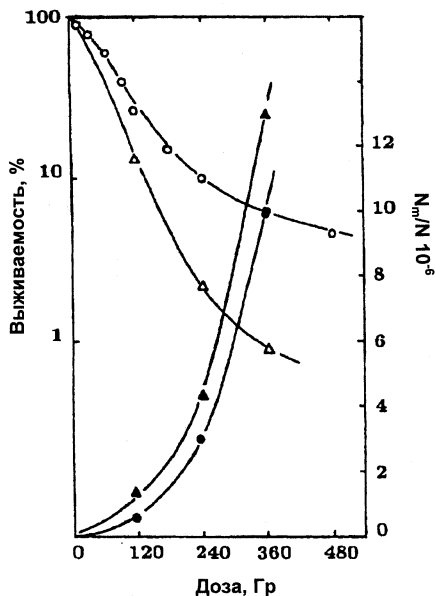


Рис. 1. Зависимость выживаемости и частоты мутирования клеток HA 101 (○, ●) и BS 168 (△, ▲) от дозы γ -облучения.

По оси ординат: выживаемость, % (слева); частота мутирования (справа)

экспериментах мы использовали штаммы с мутациями в различных генах: *recP*, *recH*, *recE4*, *add5*, принадлежащих к разным эпистатическим группам [8-10]. Полученные результаты свидетельствуют о том, что все мутации в перечисленных генах повышают клеточную радиочувствительность и по-разному влияют на индукцию ревертантов у бактерий *B.subtilis*. Как видно из рис.3, мутации *add5* и *recP* увеличивают частоту возникновения реверсий по сравнению с клетками дикого типа, а мутации *recE* и *recH*, наоборот, резко ее снижают. Следует заметить, что мутация *recE* полностью блокирует мутационный процесс.

С учетом полученных данных можно сравнить особенности радиационного мутагенеза у клеток *B.subtilis* и *E.coli* (табл.2).

Из представленных данных следует, что закономерности радиационно-индуцированного мутагенеза у вегетативных клеток *B.subtilis*

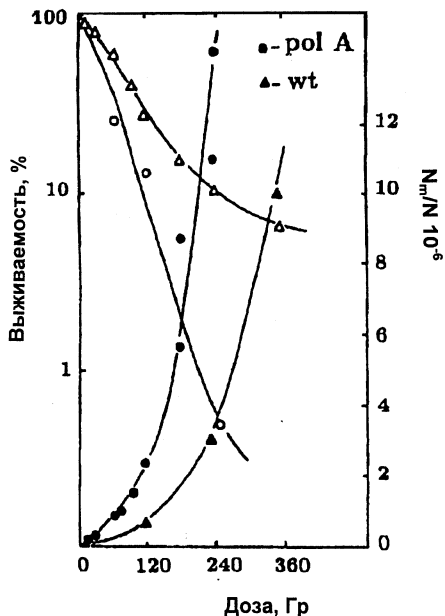


Рис. 2. Зависимость выживаемости и частоты мутирования клеток дикого типа НА 101 и *pol A*-мутанта от дозы γ -облучения. По оси ординат: выживаемость, % (слева); частота мутирования (справа)

и бактерий *E.coli* весьма сходны между собой. В этой связи необходимо заметить, что и пути репарации повреждений ДНК у этих видов бактерий также весьма сходны. Установлено, что у клеток *B.subtilis* имеется три главных пути репарации [8,10]. Первый путь связан с репарацией специфических повреждений ДНК с участием урацил-N-гликозилазы. Второй путь является эксцизионной репарацией повреждений ДНК. Так же, как и у *E.coli* эта репарация протекает с участием ДНК-полимеразы I. Более сложно, чем у *E.coli*, как об этом свидетельствуют исследования последних лет [8-10], организован рекомбинационный тип репарации повреждений с участием группы *rec*-генов: *addA*, *addB*, *recA*, *recB*, *recD*, *recF*, *recU*, *recH*, *recL*, *recP*, *recR* и *recS*. Эти гены принимают участие в репарации

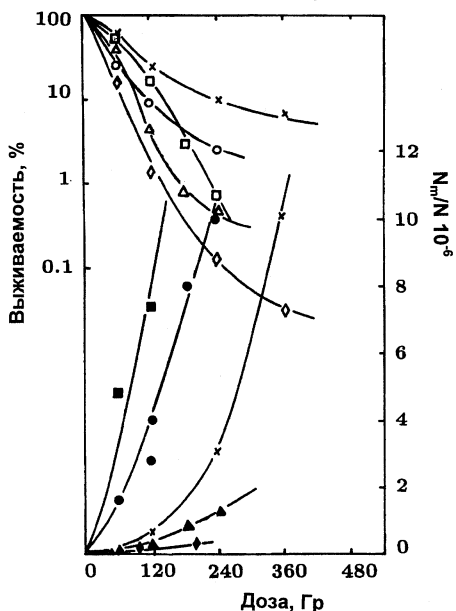


Рис.3. Зависимость выживаемости и частоты мутирования клеток штаммов *rec P* (■, □), *add5* (○, ●), *rec H* (△, ▲), *rec E4* (◇, ◇) и HA 101 (x) от дозы γ -облучения. По оси ординат: выживаемость, % (слева), частота мутирования (справа)

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 (рис. 4): α , β , γ , ϵ и ζ . Центральная роль в этом типе репарации, как и у клеток *E. coli* принадлежит *RecA*-белку, кодируемому геном *recA* (ранее называемом геном *recE*) и другим генам, кодирующим синтез белков, вовлекаемых в рекомбинационную репарацию. *RecA*-белок *B. subtilis*, как и аналогичный продукт у *E. coli*, полностью контролирует генетическую рекомбинацию и в активированной форме осуществляет расщепление некоторых репрессоров индуцибельных генов. Следует заметить, что *RecE*-белок, как показано в опытах *in vitro*, не расщепляет репрессор λ . Мутанты, подобные мутантам *lexA*, у *E. coli* у клеток *B. subtilis* не получены, однако, у них выделен *LexA*-подобный репрессор, называемый Z-белком [8].

Сравнительные характеристики радиационно-индуцированного мутагенеза у клеток *E. coli* и *B.subtilis*.

Escherichia coli	Bacillus subtilis
1. Дозовые зависимости для клеток дикого типа носят линейно - квадратичный характер	1. Дозовые зависимости для клеток дикого типа носят линейно - квадратичный характер
2. Линейно-квадратичная форма дозовых зависимостей сохраняется с ростом ЛПЭ	2. Линейно-квадратичная форма дозовых зависимостей сохраняется с ростом ЛПЭ
3. Зависимость ОБЭ (ЛПЭ) имеет локальный максимум	3. Зависимость ОБЭ (ЛПЭ) имеет локальный максимум
4. Частота мутирования у <i>polA</i> -мутанта выше, чем у дикого типа	4. Частота мутирования у <i>polA</i> -мутанта выше, чем у дикого типа
5. Мутация <i>recA</i> полностью блокирует мутагенез	5. Мутация <i>recE</i> полностью блокирует мутагенез

Эпистатические группы γ , ϵ и ζ слабо изучены и, по-видимому, не имеют аналогов у клеток *E.coli*. К эпистатической группе α относятся гены *recF*, *recL*, *recR*, *recO*, *recN* [10]. Группа β включает в себя гены *addA* и *addB*, кодирующие субъединицы многофункционального фермента *AddAB*, аналогичного ферменту экзонуклеаза V у бактерий *E.coli*. Гены *recP* и *recH* принадлежат к эпистатической группе γ , а гены *recB*, *recD* и *recU* относятся к группе ϵ . *RecS*-ген включен в эпистатическую группу ζ . *RecH*-группа контролирует, по-видимому, АТФ-зависимую ДНК-азу и также принимает участие в медленном типе репарации. Группа генных продуктов (*RecB* и *RecG*) принимает участие в заключительных шагах генетического обмена

Рис. 4. *Rec* - гены клеток *B.subtilis*, принадлежащие к разным эпистатическим группам

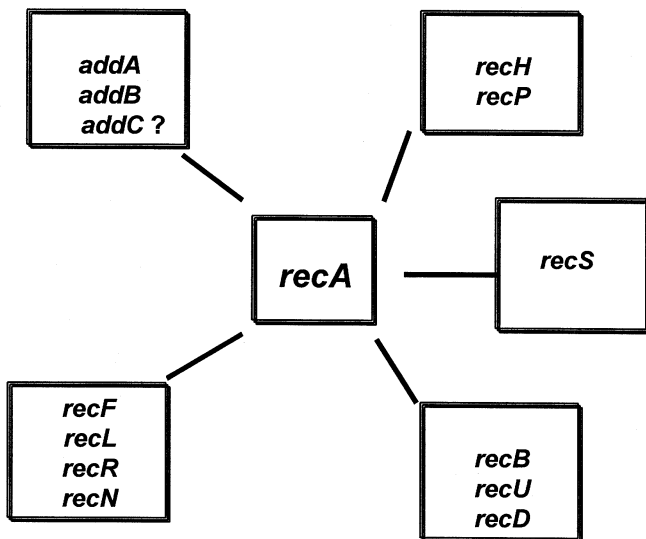


Таблица 3

Максимальные значения индукции профага и эффективности трансформации у различных штаммов *B.subtilis* [11]

Генотип	Максимальные значения индукции профага $\phi 105$ при УФ-облучении	Эффективность трансформации
<i>rec</i> ⁺	171	1
<i>recA (recE4)</i>	0,5	$\ll 0,0001$
<i>recH</i>	137	0,65
<i>recP</i>	11,2	0,31
<i>add5</i>	64	0,74
<i>polA</i>	85	0,61

и является, вероятно, кофактором продуктов генов *recH*, *recR*, *recF* и *addA*.

Некоторые характеристики репарационно-дефицитных мутантов, использованных в наших экспериментах, приведены в табл.3. Видно, что мутация *recE4* полностью подавляет индукцию профага и генетическую рекомбинацию. В наших экспериментах эта мутация также блокировала и индуцированный мутационный процесс.

Таким образом, на основании полученных нами результатов можно сделать следующие выводы:

1. Закономерности радиационно-индуцированного мутагенеза у вегетативных клеток *Bacillus subtilis* весьма сходны с мутагенезом, наблюдаемым у клеток *Escherichia coli*. В обоих случаях решающую роль в этом процессе играет индуцибельная SOS-система, контролируемая рядом структурных и регуляторных генов.
2. Различное влияние ряда *rec*-генов, принадлежащих к разным эпистатическим группам, на индуцированный излучением мутационный процесс у клеток *Bacillus subtilis*, вероятно, отражает сложную организацию их репарационной SOS-системы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Yasbin R.E. // Mol.Gen.Genet. 1977. V.153. P.211-225.
2. Tanooka H. // Mutat. Res. 1979. V.64. P.433-435.
3. Самойленко И.И.// Радиобиология. 1983. т.23. с.21-26.
4. Baltschukat K., Horneck G.// Radiat. Environ. Biophys. 1991. V.30. P.87-103.
5. Spizizen J. // Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 1958. V.44. P.1072-1078.
6. Kondo S., Ichikawa H., Iwo K., Kato T. // Genetics. 1970. V.66. P.187-217.
7. Красавин Е.А., Козубек С. Мутагенное действие излучений с разной ЛПЭ. М.:Энергоатомиздат, 1991.183 с.

8. Alonso J.C., Stiege A.C., Luder G. // Mol.Gen.Genet. 1993. V.239. P.129-136.
9. Fernandez S., Sorokin A., Alonso J.C.// Journal of Bacteriol. 1998. V.180. P.3405-3409.
10. Fernandez S., Kobayashi Y., Ogasawara N., Alonso J.C.// Mol.Gen.Genet. 1999. V.261. P.567-573.
11. Alonso J.C., Tailor R.H. and Luder G.,// Journal of Bacteriol., 1988, V. 170. P.3001-3007.

Рукопись поступила в издательский отдел
19 мая 2000 года.

Изучены закономерности индукции мутаций $his^- \rightarrow his^+$ при γ -облучении у вегетативных клеток *Bacillus subtilis* с разной способностью к репарации повреждений ДНК: клеток дикого типа, *polA1*, *recE4*, *recA*, *recP*, *add5*, *recH*. Показано, что радиационно-индуцированный мутагенез определяется репарационным генотипом клеток и блокирование различных репарационных генов по-разному проявляется у репарационно-дефицитных штаммов. Мутагенез клеток *polA*, так же как и клеток дикого типа, характеризуется линейно-квадратичной дозой кривой и более высокой, по сравнению с последними, частотой мутирования. Дефект в генах *rec*, принадлежащих к разным эпистатическим группам, по-разному влияет на индуцированный мутационный процесс. Мутации *add5* и *recP* увеличивают частоту возникновения реверсий по сравнению с клетками дикого типа, а мутации *recE* и *recH*, наоборот, резко ее снижают. Различное влияние *rec*-генов, принадлежащих к разным эпистатическим группам, на индуцированный мутагенез у клеток *Bacillus subtilis*, вероятно, отражает сложную организацию их репарационной SOS-системы.

Работа выполнена в Отделении радиационных и радиобиологических исследований ОИЯИ.

Сообщение Объединенного института ядерных исследований. Дубна, 2000

Перевод авторов

The regularities of induction of $his^- \rightarrow his^+$ mutations in vegetative *Bacillus subtilis* cells with different repair capacity after γ -irradiation have been studied. The wild type cells, *polA1*, *recE4*, *recA*, *recP*, *add5*, *recH* were used in experiments. It was shown that radiation-induced mutagenesis is determined by a repair genotype of cells. The blocking of different reparation genes is reflected on mutagenesis ratio by the various ways. A frequency of induction mutations in *polA* strain is higher than in wild type cells and it is characterized by the linearly-quadratic dose curve. The different *rec* strains that belong to various epistatic groups reveal an unequal mutation induction. The *add5* and *recP* strains are characterized by the high-level induction mutations in contrast with the wild type cells. The mutagenesis in *recE* and *recH* strains, on the contrary, sharply reduces. The different influence of *rec* genes inhering to various epistatic groups on mutagenesis in *Bacillus subtilis* cells probably reflects the complex organization of their SOS repair system.

The investigation has been performed at the Division of Radiation and Radiobiological Research, JINR.

Communication of the Joint Institute for Nuclear Research. Dubna, 2000

Редактор Е.Ю.Шаталова. Макет Н.А.Киселевой

Подписано в печать 19.06.2000
Формат 60 × 90/16. Офсетная печать. Уч.-изд. листов 0,62
Тираж 230. Заказ 52088. Цена 75 к.

Издательский отдел Объединенного института ядерных исследований
Дубна Московской области