

P19-2003-35

Д. В. Журавель*

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

Направлено в журнал «Радиационная биология. Радиоэкология»

*E-mail: zhuravel@cv.jinr.ru

Изучение проблемы индуцированного мутагенеза у прокариот при действии ионизирующих излучений служит необходимым фундаментом для интерпретации сложных механизмов, лежащих в основе мутационных процессов у высших организмов. С учетом этого исследования закономерностей и механизмов мутагенного действия излучений с разной линейной передачей энергии (ЛПЭ) на бактериальные клетки представляются весьма актуальными [1, 2]. В широком спектре возможных аспектов мутагенного действия излучения на бактерии *Escherichia coli* наименее изученными являются структурные мутации: делеции, инсерции и транслокации. Это вызвано тем, что структурные мутации являются генетически необратимыми.

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 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 гесA индуцированная элиминация транспозона Tn10 отсутствует полностью, а в клетках мутанта гесN – сильно редуцирована.

Задачей настоящего исследования является изучение точной эксцизии транспозона Tn10 в клетках *E. coli* при облучении ускоренными ионами с разной ЛПЭ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА

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. Для определения выживаемости была использована твердая питательная среда 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 колонии на минимальной питательной среде.

Облучение клеток

Эксперименты по облучению клеток *E. coli* тяжелыми ионами проводили на установке «Геном», сконструированной для облучения биологических объектов [8]. Установка позволяет проводить эксперименты с использованием пучков ускоренных тяжелых ионов, генерируемых ускорителем У 200 Лаборатории ядерных реакций Объединенного института ядерных исследований. Ускоритель позволяет получать ионы с энергией до 16 МэВ/нуклон [9]. 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 специальном контейнере 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, в которых произошла точная эксцизия транспозона Tn10 из локуса *cusC95*, подсчитывали через 72 часа 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 облучении ионами гелия ^4He , для которых ЛПЭ в биологическом образце составляет 100 кэВ/мкм. Ионы гелия с ЛПЭ 20 кэВ/мкм имеют меньшее значение радиочувствительности – $0,018 \text{ Гр}^{-1}$. При облучении ионами углерода ^{12}C 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 [10].

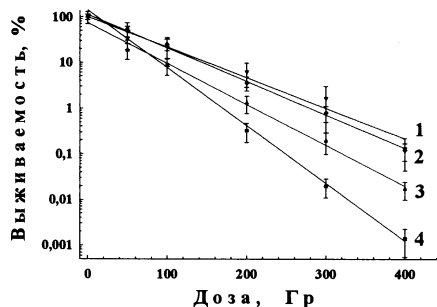


Рис. 1. Выживаемость *E. coli* при облучении ускоренными ионами:

- 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

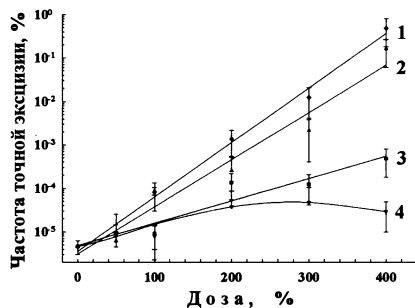


Рис. 2. Дозовые зависимости относительной частоты точной эксцизии Tn10:

- 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

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 из диапазона $10^{-10} - 10^{-4}$.

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 табл. 1, где они используются для расчета величины относительной генетической эффективности (ОГЭ).

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

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

На рис. 3 представлены зависимости относительной биологической эффективности (ОБЭ), по критерию летального эффекта, и ОГЭ, по критерию эффективности точной эксцизии от ЛПЭ. Видно, что максимально значение ОБЭ приходится на значение ЛПЭ, равное приблизительно 100 кэВ/мкм. В отличие от этого максимум ОГЭ наблюдается при меньшем значении ЛПЭ из диапазона 20 - 50 кэВ/мкм.

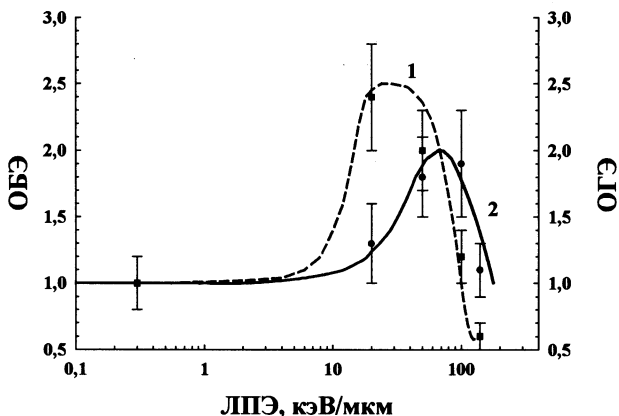


Рис. 3. Зависимости ОБЭ и ОГЭ от ЛПЭ:

1 – ОГЭ (ЛПЭ),

2 – ОБЭ (ЛПЭ)

Сопоставление полученных результатов с данными, которые были опубликованы другими авторами, позволяет оценить особенности точной эксцизии транспозона Tn10 при облучении ускоренными ионами с разной ЛПЭ.

В 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 (см. таблицу). Увеличение ОБЭ связано с увеличением выхода двуниевых разрывов ДНК,

которые являются основным летальным повреждением в клетках *E. coli* дикого типа [1]. Затем происходит уменьшение угла наклона кривых, а при облучении ускоренными ионами углерода ^{12}C ОБЭ составляет 1,1. В связи с этим была получена зависимость ОБЭ с локальным максимумом 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 [11].

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 [12,13]. 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, 14]. Авторами показано, что относительная частота точной эксцизии транспозона Tn10 может возрасть 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 вызвано увеличением выхода кластерных повреждений, которые вызываются вторичными δ -электронами вблизи прохождения трека заряженной частицы и приводят к формированию генных мутаций. Поэтому максимум ОГЭ, который измерялся по критерию эффективности точной эксцизии Tn10, сдвинут в область меньших ЛПЭ. Максимальное значение ОГЭ можно наблюдать (рис. 3) в диапазоне 20 – 50 кэВ/мкм.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Красавин Е.А.* Проблема ОБЭ и репарация ДНК. М.: Энергоатомиздат, 1989. С. 47-59.
2. *Красавин Е.А., Козубек С.* Мутагенное действие излучений с разной ЛПЭ. М.: Энергоатомиздат, 1991. С. 5.
3. *Алешкин Г.И., Марков А.П., Астафьева И.П.* // Молек. Генетика. 1983. Т. 8. С. 23-31.
4. *Aleshkin G.I., Kadzhaev K.V., Markov A.P.* // *Mutat. Res.* 1998. V. 401 №1-2. P. 179-191.
5. *Chan A., Nagel R.* // *Mutat. Res.* 1997. V. 381. №1. P. 111-115.
6. *Журавель Д.В., Борейко А.В.* // Радиобиология. 2002. Т. 42. №6. С. 636-638.
7. *Berg C.M., Curtiss R.* // *Genetics.* 1967. V.56. №3. P.503-525.
8. *Череватенко А.П.* // Труды раб. совещ. по ген. действ. корпуск. изл. ОИЯИ. Дубна. 1989. С. 300-303.
9. *Гикал Б.Н., Гульбекян Г.Г., Козлов С.И., Оганесян Р.Ц.,* // Сообщ. ОИЯИ. 9-83-311. Дубна. 1983. С. 1-12.
10. *Журавель Д.В.* // Вестн. Госуд. унив. "Дубна". 2002. №5. С. 33-37.
11. *Григорьев Ю.Г., Красавин Е.А., Рыжов Н.И.* // Радиобиология. 1971. Т. 11. №2. С. 245-248.
12. *Kleckner N., Chan R.K., Tye B.K., Botstein D.* // *Journ. of Mol. Biol.* 1977. V. 97. P. 561-565.
13. *Kleckner N.* // *Cell.* 1977. V. 11. P.11-23.

Получено 20 февраля 2003 г.

Журавель Д. В.

P19-2003-35

Индукция точной эксцизии транспозона Tn10 в клетках *E. coli* при облучении ускоренными ионами с разной ЛПЭ

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). Получены дозовые зависимости выживаемости и относительной частоты точной эксцизии. Показано, что частота точной эксцизии Tn10 является степенной функцией от дозы облучения ускоренными ионами. Проведен расчет и построены зависимости относительной биологической (ОБЭ) и относительной генетической эффективности (ОГЭ) от ЛПЭ.

Работа выполнена в Отделении радиационных и радиобиологических исследований ОИЯИ.

Препринт Объединенного института ядерных исследований. Дубна, 2003

Перевод автора

Zhuravel D. V.

P19-2003-35

Induction of the Tn10 Precise Excision in *E. coli* Cells after Accelerated Heavy Ions Irradiation

The influence of the irradiation of different kinds on the indication of the structural mutations in the bacteria *Escherichia coli* is considered. The regularities of the Tn10 precise excision after accelerated ^4He and ^{12}C ions irradiations with different linear energy transfer (LET) were investigated. Dose dependences of the survival and relative frequency of the Tn10 precise excision were obtained. It was shown, that the relative frequency of the Tn10 precise excision is the exponential function from the irradiation dose. Relative biological efficiency (RBE), and relative genetic efficiency (RGE) were calculated, and were treated as the function of the LET.

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

Preprint of the Joint Institute for Nuclear Research. Dubna, 2003

Редактор *М. И. Зарубина*
Макет *Н. А. Киселевой*

Подписано в печать 13.03.2003.

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

Усл. печ. л. 0,43. Уч.-изд. л. 0,54. Тираж 220 экз. Заказ № 53809.

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/