

P19-2000-109

А.П.Булах, А.В.Борейко

ЗАКОНОМЕРНОСТИ ИНДУКЦИИ
ДЕЛЕЦИОННЫХ МУТАЦИЙ
У КЛЕТОК *E. coli* ПРИ ДЕЙСТВИИ γ -ИЗЛУЧЕНИЯ

Выяснение закономерностей и механизмов образования мутаций в клетках различных организмов при действии ионизирующих излучений разного качества является одной из актуальных задач радиационной генетики. Механизмы радиационного мутагенеза наиболее детально изучены у бактериальных клеток. Как известно, существует два основных типа мутаций: генные (или точковые) и структурные. Накоплен большой фактический материал, касающийся индукции точковых мутаций в бактериальных клетках при действии излучений с разной линейной передачей энергии (ЛПЭ) [1,2]. Показано, что точковые мутации у бактерий *Escherichia coli* и *Salmonella typhimurium* формируются преимущественно из “комплексных” повреждений ДНК, и это определяет специфику мутагенного действия излучений, различающихся по ЛПЭ. Однако закономерности и механизмы образования структурных мутаций, а также природа первичных повреждений ДНК, ведущих к возникновению структурных перестроек бактериальной хромосомы, в частности, образованию делеций, остаются слабо изученными.

Предварительные замечания

Существует несколько подходов к решению проблемы образования структурных мутаций у прокариот. Один из них основан на определении делеций непосредственно в бактериальной хромосоме, другой - на изучении формирования делеций в искусственно сконструированных, с использованием плазмид и эписом, тест-системах. В первом случае можно использовать следующие критерии для выявления делеционных мутантов: неспособность образовывать реверсии или же определять одновременное образование мутаций в двух соседних генах. Полное отсутствие ревертантов расценивают как показатель наличия делеции. Образование же обратных мутаций служит показателем точечной природы мутаций вне зависимости от того, что явилось причиной обратной мутации: восстановление исходного генотипа или супрессорная мутация. С помощью этого метода была проведена оценка

частоты образования делеций при ультрафиолетовом (УФ) облучении *E.coli* K-12 в работе [3]. Было показано, что около 30% *Lac*-мутаций являются делециями. В работе [4] показано, что среди *Lac*-мутаций у *E.coli*, индуцированных некоторыми химическими мутагенами и УФ-излучением, на долю делеций приходится от 15 до 20% от общего числа *Lac*-мутаций. С использованием этого же метода установлено [5], что среди γ -индуцированных *Lac*-мутаций 1/3 приходится на долю делеций.

Используя тест-систему, основанную на изучении индукции прямых мутаций во фланкирующих генах бактериальной хромосомы в районе *tonB*-локуса, в работе [6] были установлены частоты образования спонтанных, а также УФ- и γ -индуцированных *tonB*- и *tonBtrp*-делеционных мутаций. Показано, что структура хромосомы вблизи *trp*-оперона и температура инкубации культуры сильно влияют на частоту образования делеций в этой области, причем частота спонтанных *tonBtrp*-делеций варьирует в различных штаммах от 10^{-8} до 10^{-6} . Следует отметить, что *polA*-мутация значительно увеличивала выход делеций. Кроме того, отмечалось, что в некоторых случаях для формирования длинных *tonBtrp*-делеций в клетках *E.coli* В абсолютно не требовалось участия продуктов *recA*- и *recB*-генов.

В работе [7] изучались дозовые зависимости выхода делеционных мутаций при УФ- и γ -облучении и роль *polA*- и *гес*-генов в процессах формирования делеций. Однако γ -индуцированные множественные изменения хромосомы, которые они расценивали как показатель мультилокусных делеций, в настоящее время, в свете новых данных о функции белка *TonB* и “тонкой” доменной структуры *tonB*-гена [8-11], рассматривают как происходящие в одном *tonB*-локусе. Вследствие этого соотношение “коротких” *tonB colB^r*- и длинных *tonBtrp*-делеций, по всей видимости, в данной работе определяется не точно.

В работе [12] была определена зависимость между репарацией γ -индуцированных двунитевых разрывов (ДР) ДНК и индукцией длинных делеций в специально сконструированной с использованием эписомы,

интегрированной в бактериальную ДНК системе. Было показано, что в диапазоне доз 25-200 Гр частота образования делеций линейно возрастала с дозой облучения, как и индукция ДР ДНК. В то же время дозовая зависимость мутаций типа замены оснований и “сдвига рамки считывания” описывалась нелинейной функцией. В этих работах было показано, что, подобно восстановлению ДР ДНК, которое абсолютно зависимо от функционирования *recA*-, *recB*-, *recC*- и *lexA*-генов, для формирования делеций необходим продукт гена *hesB* и прерадиационное культивирование в богатой ростовой среде. Эти условия не были необходимы для формирования мутаций типа замен оснований или “сдвига рамки считывания”.

В работах [13,14], проведенных на бактериальных клетках *E.coli*, лизогенизированных специально сконструированным фагом, несущим нуклеотидную последовательность *colE1-ori*, фланкированную *lacZ*- и *tet*-генами, было показано, что более 10% *lacZ*-мутаций, индуцированных γ -излучением, составляют большие делеции. Причем делеции были центрированы вблизи *colE1-ori*.

В работе [15] сравнивалось влияние мутаций в генах SOS-репарации на три типа делеций: (а) индукция коротких делеций (60-100 пар оснований), палиндромных и непалиндромных вставок в плазмиде PBR325; (б) образование больших делеций (600-800 пар оснований) в плазмиде рМС874; (в) вырезание транспозона Tn10 из бактериальной ДНК. Полученные автором результаты указывают на то, что, во-первых, некоторые ферменты SOS-репарации участвуют в формировании делеций, во-вторых, мутации, отобранные по влиянию на один тип делеций, по-другому влияют на другие делеционные события, и, в-третьих, формирование делеций может зависеть от вторичной структуры ДНК, ее промежуточных звеньев типа вилок или шпилек, сформированных палиндромными последовательностями, которые фланкируют непалиндромные последовательности.

Изложенное выше, свидетельствует о том, что проблема формирования делеционных мутаций у прокариот далека от разрешения. Имеющиеся литературные данные о роли генотипа клетки в формировании

делеций, и, в частности, *rec*-генов недостаточно изучены и противоречивы. Необходимо заметить, что частота образования делеций определяется не только генотипом клетки, но и структурой ДНК в изучаемом локусе. В связи с этим возникает вопрос: насколько адекватны результаты, основанные на исследовании закономерностей образования делеций в искусственно сконструированных системах, отражают процессы и закономерности формирования делеционных мутаций в бактериальной хромосоме? Для понимания механизмов индуцированного мутационного процесса весьма важными являются данные об особенностях индукции делеционных мутаций излучениями, различающимися по ЛПЭ. Однако закономерности образования делеций у прокариот при действии ионизирующих излучений с разными физическими характеристиками совершенно не изучены.

Исходя из вышеизложенного, задачей настоящего исследования явилась разработка подходов к изучению закономерностей образования делеций в бактериальной ДНК при действии ионизирующих излучений с разной ЛПЭ. Для этого была выбрана тест-система, основанная на определении делеционных мутаций в *tonB*-локусе бактериальной хромосомы. С этой целью мы объединили два методических подхода: определение крупных делеций по выявлению прямых мутаций в двух фланкирующих генах *tonB* и *trp* и определение делеций, локализующихся в *tonB*-гене и не затрагивающих *trp*-оперон, по образованию обратных *tonB*-мутаций.

Организация *tonB*-гена

Как известно, *E.coli* имеет *TonB*-зависимую систему активного транспорта через внешнюю и цитоплазматическую мембрану, состоящую из *TonB*-белка, белков-рецепторов внешней мембраны, взаимодействующих с ним *ExbB*, *ExbD* и других белков (рис.1).

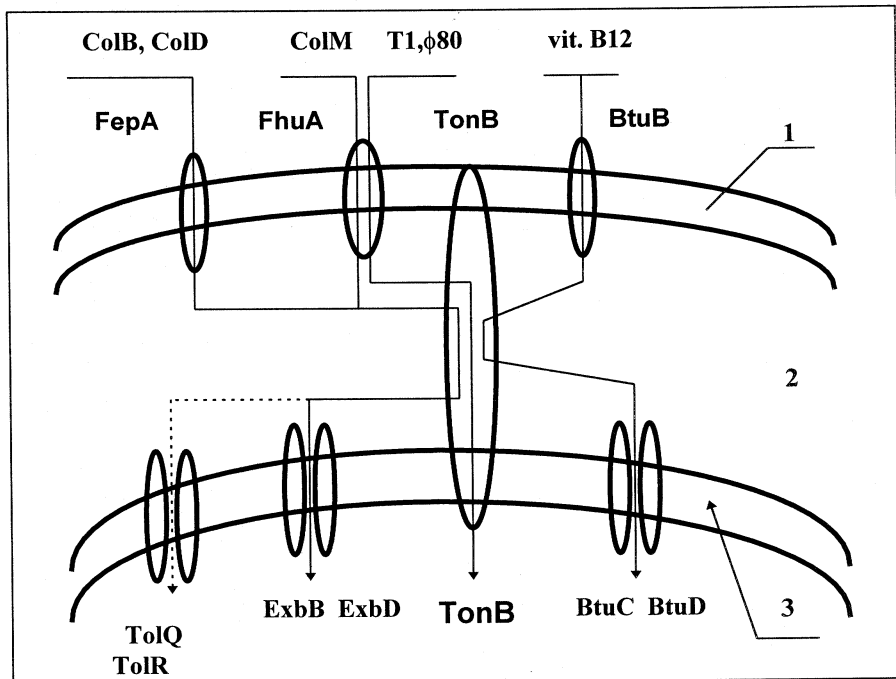


Рис.1. Схема белков *E.coli*, участвующих в *TonB*-зависимом активном транспорте специфических субстратов внутрь клетки.

1 - внешняя мембрана; 2 - периплазматическое пространство;
3 - цитоплазматическая мембрана

TonB-белок взаимодействует с внешними мембранными рецепторными белками, которые выполняют высоко специфическое связывание, и осуществляет энергозависимый перенос специфических субстратов в периплазматическое пространство. Эти субстраты либо плохо проникают через пориновые каналы или находятся в очень низкой концентрации. В отсутствие *TonB*-белка эти рецепторы связываются с субстратом, но не выполняют активный транспорт. *TonB*-белок также взаимодействует с некоторыми колицинами и бактериофагами *T1* и $\phi 80$. *ExbB*- и *ExbD*-белки в этой системе выполняют вспомогательные функции, облегчая активный транспорт, а также осуществляют стабилизацию *TonB*-белка. В работах [6,7]

было показано, что мутации в этих генах приводят к снижению *TonB*-активности, но не к полной ее потере (клетки остаются чувствительны к фагу $\phi 80$, колицинам *B* и *D*).

Таблица 1. Рецепторные белки, осуществляющие активный транспорт специфических субстратов внутрь клетки, при взаимодействии с *TonB*-белком и гены, кодирующие их в клетках *E. coli*

Ген	Функции кодируемого им белка
<i>btuB</i> .	Рецептор витамина B_{12}
<i>cirA</i>	Рецептор колицина <i>ColI</i>
<i>fecA</i>	Рецептор цитрата железа
<i>fepA</i>	Рецептор, связывающийся с комплексом энтерохелина с железом. Рецептор колицинов <i>colB</i> и <i>colD</i>
<i>fhuA</i>	Рецептор, связывающийся с комплексом феррихрома с ионами трехвалентного железа Рецептор фагов $\phi 80$, <i>T1</i> , колицина <i>ColM</i> и альбомидина

В таблице 1 представлены гены, кодирующие рецепторные белки у клеток *E. coli*, которые, как установлено, взаимодействуют с *TonB*-белком. Большинство этих белков содержат в N-терминальном регионе короткую консервативную последовательность, называемую *TonB*-box, которая вовлечена во взаимодействие рецептора с *TonB*-белком.

Показано [8], что *tonB*-ген имеет четко выраженную доменную структуру (рис.2). Таким образом, мутации, ведущие к изменению аминокислотной последовательности в положении 1-70, приводят к устойчивости клетки к бактериофагам *T1* и $\phi 80$. Изменения в положении 107-181 приводят к устойчивости к колицинам *ColB*, *D* и *M*.

Еще одной особенностью *tonB*-мутантов является их высокая чувствительность к солям хрома [9], что можно использовать для отбора обратных мутантов.

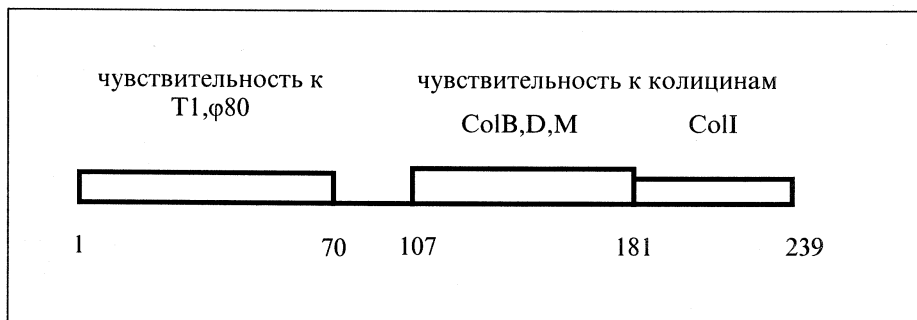


Рис.2. Участки *tonB*-гена, определяющие чувствительность бактериальных клеток к колицинам *ColB*, *D*, *M* и бактериофагам *T1* и $\phi 80$

Все, перечисленные выше особенности *TonB*-мутантов и наличие близко расположенного *trp*-оперона, позволяют, используя в качестве селективных факторов вирулентный бактериофаг $\phi 80$ и колицины *ColB*, *D* и *M* и *ColII*, а также определяя ауксотрофность к триптофану, выделять клетки с большими делециями, затрагивающими *tonB*-ген и *trp*-оперон. Кроме того, используя чувствительность *tonB*-клеток к солям хрома, а также неспособность их усваивать витамин B12, можно среди *tonB trp*⁺-мутантов определить соотношение между точковыми мутациями и короткими не достигающими *trp*-оперона делециями.

Материалы и методы

В экспериментах по совершенствованию методики определения и выделения клеток, имеющих делеционные мутации в *tonB*-локусе, были

использованы следующие штаммы *E. coli* дикого типа: *B*, *W3110*, *X7026*. Кроме того, в работе использовали штаммы-продуценты колицинов: *T20 (colB-K260)*, *M32-T19 (colM-K260)*, *C600 (colD)* и бактериофаг $\phi 80v$.

В экспериментах использовали лизат вирулентного фага $\phi 80$, имеющего титр не менее $1 \cdot 10^{10}$ фаговых частиц/мл.

Была отработана методика и подобраны оптимальные условия по получению колициновых препаратов. Клетки штаммов, продуцентов *B*- и *D*-колицинов засеивали по 10^7 - 10^8 клеток на чашки Петри с полной питательной средой (LA) и выращивали при $37^\circ C$ в течение ночи. Затем индуцировали УФ-излучением в течение 150 с при дневном свете. Далее клетки с агара переносили в 50 мл свежей полной питательной среды (LB) и инкубировали при $37^\circ C$ с аэрацией. Через 6 ч к суспензии клеток добавляли хлороформ до 1% от объема с последующим интенсивным встряхиванием. Готовый колициновый препарат хранили в холодильнике в плотно закрытой колбе. Препарат не терял своей активности в течение недели.

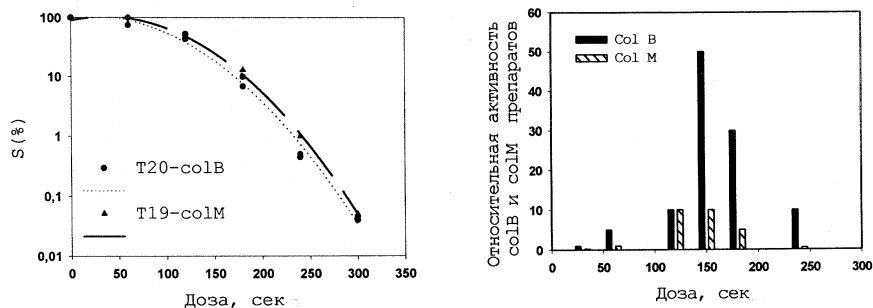


Рис.3. Выживаемость клеток-продуцентов колицинов *B* и *M* и активность колициновых препаратов при разных дозах УФ-облучения

Методику выделения бактериальных клеток, имеющих делецию в *tonB*-локусе, можно представить в виде схемы, изображенной на рис.4. Ночную культуру клеток, выращивали в полной питательной среде (LB), разводили в

50 раз в LB и доращивали до оптической плотности, равной 0,4 - 0,5 при 560 нм, что соответствует концентрации клеток $(3-4) \times 10^8$ клеток/мл и логарифмической фазе роста. Далее суспензию клеток охлаждали в воде со льдом и облучали. Облученные клетки высевали для определения выживаемости, а для выявления мутаций засеивали по $(1-3) \times 10^8$ клеток в 100 мл свежей полной питательной среде LB.

Схема выделения клеток, имеющих делецию в *tonB*-гене

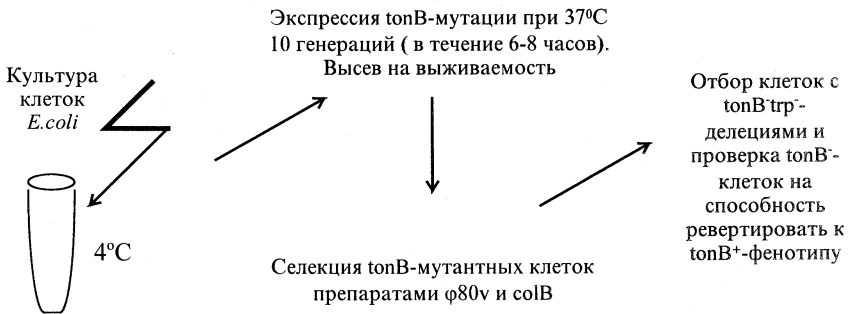


Рис. 4. Схема выделения мутантных клеток, имеющих делецию в *tonB*-гене

Инкубацию проводили в течение 6-8 часов при 37°C с аэрацией, до стационарной фазы роста. При этом концентрация клеток в суспензии составляла $\approx 2 \times 10^9$ клеток/мл. Необходимость проведения указанной процедуры была обусловлена тем, что для фенотипического проявления мутаций, произошедших в генах, кодирующих рецепторные и трансмембранные белки, необходимо от 5 до 12 поколений.

Нами была исследована динамика фенотипического проявления изучаемых типов мутаций. Как видно из рис.5, для полного фенотипического проявления изучаемых типов мутаций достаточно 8-10 поколений, что отражает выход зависимости частоты мутаций от числа поколений на плато. Для проявления мутаций, клетки после инкубации высевали на чашки Петри с селективными средами, содержащими LA и колициновый лизат в количестве

30% от объема. Для выявления *colB^{res}φ80^{res}*-клеток до высева на чашки Петри с колицинами проводим обработку исследуемых клеток лизатом фага *φ80v*. Для этого к 0,9 мл *φ80v*-лизата добавляем 0,1 мл суспензии клеток ($(2-3) \times 10^8$ клеток). Адсорбцию проводили при 37°C 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. Для определения клеток с делеционными мутациями распечатывали *colB^{res}φ80^{res}*-колонии на селективные чашки с LA, M56+citrat-Na, M56+citrat-Na+Trp, M56+Trp+Cr. Через 48 ч подсчитывали количество клеток с *tonBtrp*-делециями. Клетки, у которых наблюдается рост на чашках со средой M56+Trp+Cr, не являются *tonB*-мутантами.

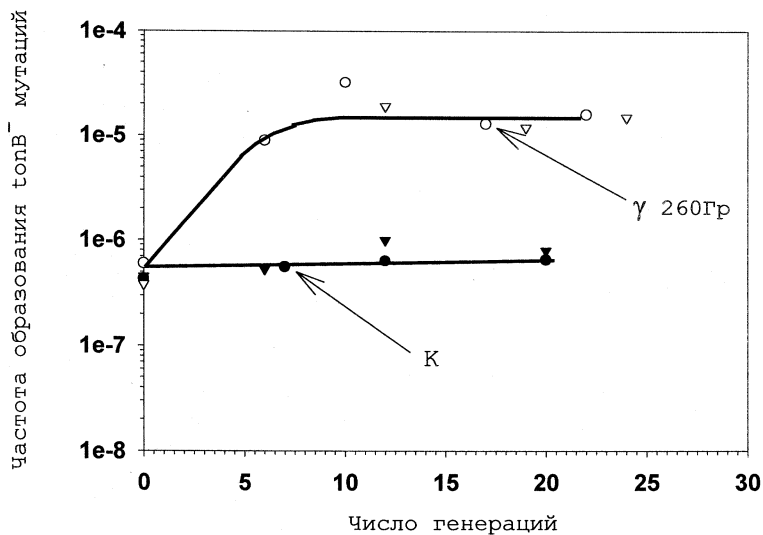


Рис. 5. Зависимость частоты, выявляемых *tonB*-мутаций от числа поколений

Обратные мутации к *tonB*⁺-фенотипу определяли путем высева *tonB* *trp*⁺-мутантных клеток на M56+Trp+Cr. Для этого засекали их стерильной петлей в 5 мл LB и инкубировали до стационарной фазы роста (концентрация $\approx 2 \times 10^9$ клеток/мл). Клетки осаждали центрифугированием, отмывали в M56 буфере, после чего высевали их по $(2-5) \times 10^8$ клеток на чашки с селективной средой с M56+Trp+Cr. Инкубация проходила при 37°C в течение 36-40 ч. Полное отсутствие обратных мутаций расценивали как показатель делеций. Наличие обратных мутантов служило показателем точковой природы *tonB*-мутаций.

Результаты и обсуждение

На рис. 6 приведены зависимости частоты образования *tonB*-мутаций у клеток *E. coli* X7026. Показано, что в диапазоне доз 26-390 Гр наблюдается степенная зависимость частоты образования *tonB*-мутаций от дозы. В логарифмическом масштабе дозовая зависимость представляет собой прямую с тангенсом угла наклона $x = 1,7-1,8$, что свидетельствует о близком к квадратичному характеру зависимости выхода *tonB*-мутаций от дозы. Анализ полученных данных показал, что зависимость, близкая к квадратичной, реализуется при дозах облучения свыше 100 Гр, тогда как в диапазоне доз до 100 Гр наблюдается линейная зависимость частоты образования *tonB*-мутаций от дозы. Квадратичный характер кривых мутагенеза обусловлен тем, что для образования мутации необходима реализация двух независимых друг от друга событий "попадания" [2]. Во-первых, возникновение премутационного повреждения в изучаемом локусе и, во-вторых, наличие повреждения, индуцирующего систему SOS-репарации, которая и способствует закреплению изменения в бактериальной ДНК в виде мутаций.

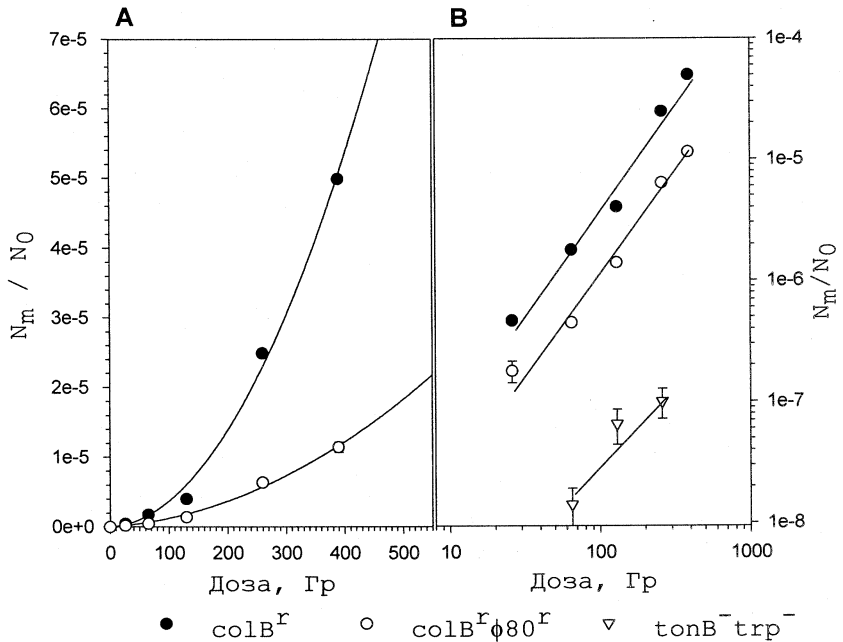


Рис.6. Зависимости частоты образования $colB^r$ -, $colB^r \phi 80^r$ -мутаций у клеток *E.coli* от дозы γ - облучения.

А - в линейном масштабе; Б - в логарифмическом масштабе

Таким образом, квадратичный характер кривых мутагенеза отражает участие системы SOS-репарации в мутационном процессе, которая является необходимым фактором реализации репаративного мутагенеза.

В ходе экспериментов установлены зависимости частоты образования $tonB trp$ -делеций. Показано (рис.7), что в изучаемом диапазоне доз частота образования делеционных мутаций линейно возрастает с дозой облучения. В логарифмическом масштабе (рис.6Б) эта зависимость представляет собой

прямую с тангенсом угла наклона $\chi = 1,3$, что подтверждает линейный характер зависимости частоты образования делеционных мутаций от дозы.

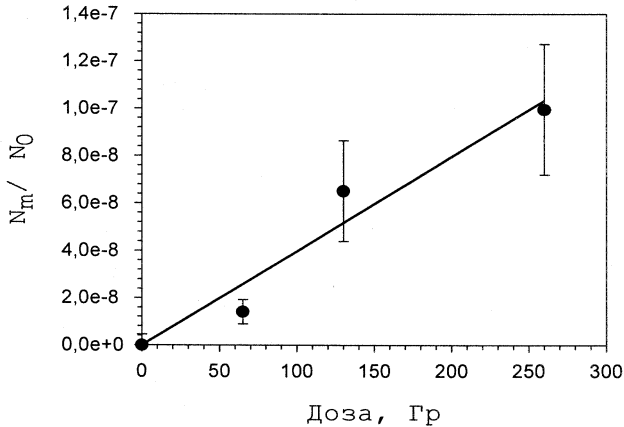


Рис.7. Зависимость частоты образования делеционных мутаций от дозы γ -облучения

Как указывалось выше и другими авторами, также была получена линейная зависимость частоты образования делеционных мутаций. Так, в [12] линейная дозовая зависимость частоты образования *lac*-делеций в клетках *E.coli* связывается с линейным характером индукции двунитевых разрывов (ДР) ДНК. С учетом этого предполагается, что линейный характер зависимости образования делеций при γ -облучении бактериальных клеток обусловлен тем, что в отличие от генных мутаций, молекулярной основой первичных повреждений, ведущих к образованию делеций, являются не комплексные повреждения, а ДР ДНК и для реализации премутационных

повреждений данного типа не требуется индукции системы SOS-репарации, которая играет ключевую роль в формировании генных мутаций.

Заключение

Таким образом, в данной работе была модифицирована и оптимизирована тест-система для отбора делеционных мутаций у бактерий *E. coli*. Были определены оптимальные режимы УФ-индукции продуцентов *B*- и *D*-колицинов и предложен метод определения коротких делеций в *tonB*-гене по способности образовывать обратные мутации к *tonB*⁺-фенотипу. Это позволяет выявить не только клетки, имеющие большие делеции, затрагивающие *tonB*-ген и *trp*-оперон, но и среди *tonB*-мутантов выделить клоны с точковыми и делеционными повреждениями. Изучена динамика фенотипического проявления изучаемых типов мутаций.

Показано, что в диапазоне доз 26-260 Гр частота образования делеций линейно возрастает с дозой облучения, в то время как кинетика индукции генных мутаций описывается нелинейной функцией. Это может свидетельствовать о различии процессов и механизмов, вовлеченных в формирование точковых и структурных мутаций.

Список литературы

1. Е.А.Красавин, Проблема ОБЭ и репарация ДНК. М.:Энергоатомиздат, 1989, 193 с.
2. Е.А.Красавин, С.Козубек. Мутагенное действие излучений с разной ЛПЭ. М.:Энергоатомиздат, 1991, 183 с.
3. A. Gook, J.Lederberg. Genetics, 1962, V.47, N10, p.1335.
4. A. Zampieri, J. Greenberg. Genetics, 1967, V.57, N1, p.41.
5. Г.Е. Фрадкин, М.В. Торосян, Е.В. Рабинкова, Э.В. Филькова. Генетика, 1969, т.V, №2, с.125-132.
6. J.A.Spudich, V.Horn, C.Yanofsky. J.Mol.Biol., 1970, V.53, p.49-67.
7. S. Ishii, Kondo. Mut.Res., 1972, V.16, p.13-25.
8. E. Fischer, K. Gunter, V. Braun. J. Bacteriol., 1989, Sep., p.4742-4747.
9. M.M. Brian et al. J. Bacteriol., 1995, v.177, N17, p.4829-4835.
10. I. Traub, S. Gaisser, V. Braun. Mol. Microbiol., 1993, V.8, N2, p.409-423.
11. P.Pugsley, P. Reeves. J. Bacteriol., 1976, June, p.1052-1062.
12. N.J. Sargentini, K.C. Smith. Mutat. Res., 1992, V.265, N1, p.83-101.
13. F. Hutchinson. J. Mol. Biol., 1991, V.220, N2, p.193-198.
14. F. Hutchinson. Mutat. Res., 1993, V.299, p.211-218.
15. E. Balbinder. Mutat. Res., 1993, V.299, N3-4, p.193-209.

Рукопись поступила в издательский отдел
19 мая 2000 года.

Булах А.П., Борейко А.В.

P19-2000-109

Закономерности индукции делеционных мутаций у клеток *E. coli* при действии γ -излучения

С целью изучения закономерностей образования спонтанных и индуцированных ионизирующей радиацией с разной линейной передачей энергии (ЛПЭ) делеционных мутаций у клеток *Escherichia coli* была модифицирована и оптимизирована тест-система, основанная на определении мутаций в двух фланкирующих генах: *tonB* (устойчивость клеток к инфицированию бактериофагом $\phi 80vir$ и действию колицинов) и *trp* (ауксотрофность по триптофану). Был предложен метод определения коротких делеций в гене *tonB* по способности образовывать обратные мутации к фенотипу *tonB*⁺. Представлены результаты исследований динамики фенотипического проявления изучаемых типов мутаций, частоты возникновения спонтанных и γ -индуцированных делеций (*trp*⁻*tonB*). Показано, что в диапазоне доз 26–260 Гр частота образования делеций линейно возрастает с дозой облучения, в то время как кинетика индукции генных мутаций описывается нелинейной функцией. Это может свидетельствовать о различии в механизмах, вовлекаемых в формирование точковых и структурных мутаций.

Работа выполнена в Отделении радиационных и радиобиологических исследований ОИЯИ.

Сообщение Объединенного института ядерных исследований. Дубна, 2000

Перевод авторов

Bulah A.P., Boreyko A.V.

P19-2000-109

The Study of Regularities of Induction Deletion Mutations at *E. coli* Cells by γ -Radiations

The test system is based on the definition of mutations in both flanking genes: *tonB* (the stability of cells to infection by phage the $\phi 80vir$ and to the action colicins) and *trp* (auxotroph on tryptophane). It is used with the purpose to study regularities of formation of spontaneous and induced by radiation with different LET deletion mutations on *Escherichia coli* cells. The method of definition of short deletions in *tonB* gene on ability to revertive to *tonB*⁺ phenotype was suggested. Dynamics of phenotype display of the mutations was investigated. The frequencies of occurrence of spontaneous and induces deletions (*trp*⁻*tonB*⁻) were measured. The ratio of frequency of the deletions and gene mutations is given. It is shown, that in range 26–260 Gy, the frequency of formation of induced deletions will increase linearly with an exposure dose, while the kinetics of an induction of genetical changes is featured by nonlinear function. It can testify that the different mechanisms are involved in the formation of gene and structural mutations.

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 22.06.2000
Формат 60 × 90/16. Офсетная печать. Уч.-изд. листов 1,62
Тираж 230. Заказ 52102. Цена 1 р. 91 к.

Издательский отдел Объединенного института ядерных исследований
Дубна Московской области