

**МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМ. М. В. ЛОМОНОСОВА**

19-2004-171

На правах рукописи

ЖУРАВЕЛЬ
Даниил Валерьевич

**ЗАКОНОМЕРНОСТИ ЭКСЦИЗИИ ТРАНСПОЗОНОВ
ПРИ ДЕЙСТВИИ ИЗЛУЧЕНИЙ С РАЗНЫМИ
ФИЗИЧЕСКИМИ ХАРАКТЕРИСТИКАМИ**

Специальность: 03.00.01 — радиобиология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва 2004

Работа выполнена за время обучения в аспирантуре на кафедре биофизики Государственного университета природы, общества и человека «Дубна» в Отделении радиационных и радиобиологических исследований Объединенного института ядерных исследований.

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор *Е.А. Красавин*

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор *В.Г. Петин*,
доктор биологических наук, профессор *В.К. Мазурик*.

Ведущая организация: Государственный Научный Центр – Институт медико-биологических проблем РАН, г. Москва

Защита состоится 23 декабря 2004 г., в _____ часов _____ минут на заседании диссертационного совета Д.501.001.65 в Московском государственном университете им. М.В. Ломоносова по адресу: 119899, г. Москва, Воробьевы горы, биологический факультет, диссертационный совет Д.501.001.65.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке биологического факультета МГУ. Отзывы на автореферат просим высылать по вышеуказанному адресу на имя ученого секретаря диссертационного совета.

Автореферат разослан “ _____ ” _____ 2004 г.

Ученый секретарь
диссертационного
совета

доктор
биологических наук,
профессор О.Р. Кольц

Введение

Актуальность исследования

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 (Е.А. Красавин и С. Козубек, 1991). Воздействие излучения индуцирует в бактериальных клетках *Escherichia coli* ряд процессов, сопряженных с функционированием *SOS*-системы ответа на повреждающее воздействие: индукцию некоторых профагов и колицинов, *SOS*-репарацию и *SOS*-мутагенез. При действии на клетки ДНК-повреждающих факторов репликация ДНК происходит с большим количеством ошибок, вследствие снижения корректорских функций ДНК-полимеразы и, следовательно, становится причиной возникновения *SOS*-зависимых мутаций.

К числу наименее изученных вопросов радиационной генетики прокариот относятся исследования закономерностей возникновения структурных мутаций: делеций, инсерций, и 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, ультрафиолетовым светом, а также ионизирующей радиацией.

Показано, что точная эксцизия транспозонов является *SOS*-индуцибельным процессом, который происходит по «мишенному механизму». Стрессовые состояния бактериальной клетки, индуцирующие *SOS*-репарацию ДНК и мутагенез, прямо влияют на частоту транспозиции мобильных элементов. Корреляция *SOS*-мутагенеза и активности мобильных элементов позволила разработать оригинальный подход к изучению индуцибельных систем репарации ДНК и мутационного процесса у прокариот с использованием генетических систем, сконструированных на основе транспозонов (Г.И. Алешкин и др., 1983).

Такой подход позволил определить влияние ключевых генов *SOS*-мутагенеза на индукцию точной эксцизии транспозона *Tn10* при действии УФ-излучения. Показано, что точная эксцизия находится под контролем *SOS*-индуцибельных генов рекомбинационной

репарации ДНК: *ruv* и *recN* (R. Nagel et al., 1994; A. Chan et al., 1994). При облучении клеток, несущих мутацию *recA* эффективность УФ-индуцированной точной эксцизии резко снижается, так как ген является ключевым в реализации *SOS*-ответа (G.I. Aleshkin et al., 1998). Оказалось, что точная эксцизия, *Tn10* в системе *SOS*-мутабильности происходит без участия транспозазы, поэтому консервативный механизм точной эксцизии в процессе транспозиции, которая происходит через внесение ступеньчатых двунитевых разрывов не позволял определить закономерности эксцизии при индуцирующем воздействии УФ-света. Было продемонстрировано участие *recBC* и *recF*-зависимых рекомбинационных процессов в индукции точной эксцизии транспозона *Tn10* (R. Nagel, 1999). Точная эксцизия транспозона, происходящая в условиях индукции *SOS*-ответа является классическим делеционным процессом, который происходит при участии небольших палиндромных последовательностей. Аналогичные закономерности были обнаружены в активных локусах с высоким выходом структурных перестроек, и в этом смысле точная эксцизия транспозона может служить модельной системой для определения закономерностей формирования делеций.

В экспериментах с ускоренными тяжелыми ионами (Е.А. Красавин и С. Козубек, 1991) получен обширный материал по индукции прямых и обратных генных мутаций излучениями в широком диапазоне линейной передачи энергии (ЛПЭ). Было показано, что зависимость частоты мутирования клеток от дозы γ -квантов и тяжелых заряженных частиц описывается линейно-квадратичной функцией, для которой квадратичная компонента зависимости определяется эффективностью экспрессии генов, контролирующих *SOS*-ответ. Относительная биологическая эффективность (ОБЭ) частиц по критерию индукции мутаций увеличивается с ростом ЛПЭ и зависимость ОБЭ (ЛПЭ) описывается кривой с локальным максимумом при ЛПЭ ≈ 20 кэВ/мкм. Различие в положениях максимумов по критерию летального (~ 80 – 100 кэВ/мкм) и мутагенного эффектов облучения определяется разным характером событий, участвующих в формировании этих эффектов. Летальный эффект вызван образованием двунитевых разрывов (ДР) ДНК, а мутагенный эффект – кластерными одностранными разрывами ДНК.

В отличие от генных мутаций, структурные мутации у клеток прокариот формируются в результате возникновения ДР ДНК. Соотношение выходов прямых двунитевых разрывов, как результат разрыва опозитных нитей при прохождении частицы и энзиматических ДР ДНК, возникающих в процессе *SOS*-репарации может обуславливать специфику образования мутаций делеционного типа при действии излучений с разной ЛПЭ. С учетом этих обстоятельств исследование эксцизии транспозонов при действии излучений широкого диапазона ЛПЭ может дать важную информацию об особенностях индукции

структурных мутаций у бактерий ионизирующим излучением с разными физическими характеристиками.

Цель и основные задачи исследования

Целью настоящего исследования является изучение закономерностей и механизмов *SOS*-индуцибельной эксцизии транспозонов в клетках бактерии *Escherichia coli* при действии излучений с разными физическими характеристиками: ультрафиолетового света, γ -излучения, и ускоренных тяжелых ионов с разной ЛПЭ. Для достижения поставленной цели необходимо решить следующие основные задачи:

1. Исследовать характер индукции точной эксцизии транспозонов разных классов при облучении УФ-светом и определить роль структуры последовательности элемента в этом процессе.

2. Используя клетки, несущие мутации генов *rec*-семейства, определить зависимость индуцированной эксцизии транспозона *Tn10* от репарационного генотипа бактерий.

3. Изучить закономерности индукции точной эксцизии транспозона *Tn10* при облучении ускоренными ионами, в диапазоне ЛПЭ от 20 до 200 кэВ/мкм в биологическом образце.

4. Оценить генетическую эффективность ускоренных ионов по критерию точной эксцизии *Tn10* и по критерию летального действия на клетки *Escherichia coli*.

5. Провести статистическое моделирование встраивания транспозона в новое положение и предложить механизм *SOS*-индуцибельной точной эксцизии транспозона при действии излучений разного качества.

Научная новизна

Исследования закономерностей *SOS*-мутабельности клеток *Escherichia coli* при действии излучений с разными физическими характеристиками, с использованием в качестве тест-системы мобильные элементы позволяют предложить новый перспективный подход для изучения механизма возникновения структурных мутаций у бактерий. В настоящей работе впервые определены закономерности эксцизии транспозона *Tn10* при действии γ -излучения. Показано, что γ -индуцированная эксцизия является *SOS*-мутагенным процессом, который контролируется генами *rec*-семейства. Впервые показана возможность индукции точной эксцизии транспозона *Tn10* ускоренными многозарядными ионами с разной ЛПЭ, изучены закономерности этого процесса. Определены значения относительной биологической и генетической эффективности ускоренных ионов ^4He и ^{12}C по критериям летального действия и точной эксцизии транспозона *Tn10*. Проведен ориги-

нальный статистический расчет мишенного встраивания транспозона *Tn10* в новое положение, исходя из функции вероятности распределения мишеней в геноме *Escherichia coli*, и построена модель, описывающая механизм точной эксцизии транспозона *Tn10*, как SOS-индуцируемого мишенного делеционного явления.

Научно-практическая значимость работы

При решении ряда научно-практических задач радиационной генетики весьма важно иметь информацию не только о суммарном выходе различного рода мутаций в облученных клетках, но исключительный интерес представляют сравнительные данные о частоте образования как генных, так и структурных мутаций. Эти задачи обусловлены необходимостью решения вопросов нормирования лучевых нагрузок от излучения разного качества на персонал, работающий в смешанных полях ионизирующих излучений, проблемами обеспечения радиационной безопасности экипажей при длительных космических полетах, другими важными практическим вопросами. Полученные данные представляют несомненный научный интерес при интерпретации механизмов мутагенного влияния излучений широкого диапазона ЛПЭ на клетки с разным генотипом. Результаты исследования могут быть использованы при разработке нормативных документов, связанных с обеспечением радиационной безопасности лиц, находящихся в условиях многокомпонентного радиационного воздействия.

Положения и результаты, выносимые на защиту:

1. закономерности радиочувствительности бактерий *Escherichia coli* при действии излучений широкого диапазона ЛПЭ;
2. закономерности γ -индуцированной эксцизии транспозона *Tn10* в клетках *Escherichia coli* с различным репарационным генотипом;
3. дозовые зависимости точной эксцизии транспозона *Tn10* при ультрафиолетовом облучении клеток с мутациями в разных локусах генов *rec*;
4. результаты исследования закономерностей точной эксцизии *Tn10* при облучении ускоренными тяжелыми ионами с разной ЛПЭ и определение относительной биологической эффективности ускоренных ионов по критерию летального действия и точной эксцизии *Tn10*;
5. статистическое моделирование мишенного встраивания транспозона и модель точной эксцизии *Tn10* при облучении ускоренными ионами.

Структура работы:

Работа состоит из 4 глав, включающих обзор литературы, описание материалов и методов, изложение и обсуждение результатов исследования, содержит введение, выводы,

и список литературы, и имеет общий объем 100 страниц. Экспериментальные и теоретические результаты наглядно представлены на 12 графиках и векторных диаграммах. Математический аппарат, использованный при проведении исследований, содержит 17 формул. Список литературы содержит 134 источника, из них $\approx 1/3$ всех научных работ опубликованы в российских изданиях.

Апробация работы

Отдельные разделы работы проходили апробирование на различных российских и международных конференциях, неоднократно отмечены дипломами, удостоены почетной грамоты IV Съезда по радиационным исследованиям и поощрительной премии ОИЯИ для молодых специалистов. Список тезисов, полнотекстных докладов и статей представлен в конце автореферата.

Материалы и методы исследования

Источники излучения

Облучение клеток УФ-светом длиной волны 254 нм проводили при помощи бактерицидной лампы БД 30-1 мощностью дозы 0,5 Дж/м². Облучение γ -квантами ¹³⁷Cs проведено на установке «Свет», которая позволяет проводить статическое облучение биологических объектов мощностью дозы 26 Гр/мин. Эксперименты, в которых проводилось облучение ускоренными ионами ⁴He и ¹²C с ЛПЭ: 20, 50, 100, и 200 кэВ/мкм проведены на установке «Геном», расположенной на ускорителе У 200 в Лаборатории ядерных реакций им. Г.Н. Флерова, ОИЯИ.

Бактериальные штаммы

Бактериальные штаммы *E. coli*, которые были использованы в работе для исследования точной эксцизии транспозонов, представляют собой генетическую систему для моделирования, структурных мутаций, возникающих при действии излучений с разными физическими характеристиками. Штаммы: AFT 228 (*ArgA81::Tn10*), SP 256 (*TyrA16::Tn10 recN262*), ENZ 280 (*SfiA11::Tn10 DrecA306*), RDK 1541 (*RecO1504::Tn5*), ABU 57 (*RecQ::Tn3*) DB 5872 (*CysC95::Tn10*), GA 120 (*Trp::Tn1*) – были любезно предоставлены бактериальным музеем Отделения молекулярной и радиационной биофизики Петербургского института ядерной физики, ВНИИ «Генетика», а также Институтом иммунологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалея.

Определение радиочувствительности

Для определения радиочувствительности клетки *E. coli* выращивали в жидкой питательной среде LB (0,5 % дрожжевого экстракта, 1 % NaCl, 1 % триптона) в два этапа до

получения суспензии концентрацией 10^9 клеток/мл. Затем осаждали центрифугированием при 4000 об/мин в течение 20 минут, супернатант сливали, осадок растворяли в солевом буфере M56 (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) без витаминов и микроэлементов. Облучение бактериальных клеток γ -излучением ^{137}Cs проводили в стеклянных пробирках, а эксперименты с ускоренными тяжелыми ионами на специальном ядерном фильтре. После облучения титр клеток, необходимый для получения 100–500 колоний высевали на чашки с агаризованной средой, и проводили инкубацию в течение 16 ч. Выживаемость определяли стандартно, как отношение числа выживших клеток к числу клеток в контроле. Статистический размер вариации экспериментальных данных вычисляли как среднеквадратичное отклонение экспериментального значения при помощи программы «Sigma Plot 8.0» из пакета «Jandel Scientific». По кривой выживаемости определялось обратное значение дозы, при которой выживаемость падает в e раз (до 37 %), это значение и является радиочувствительностью бактериального штамма.

Индукция транслокационных процессов

Индукцию точной эксцизии транспозонов УФ-светом проводили по стандартной методике (G.I. Aleshkin et. al., 1998). Концентрированную суспензию клеток высевали на чашки с минимальной средой M56, содержащей высокоочищенный агар. Титр суспензии, необходимый для получения 100–500 колоний параллельно наносили на агаризованную среду LB. Облучение клеток УФ-светом проводили на агаризованной среде при помощи бактерицидной лампы БД 30-1. После облучения чашки со средой LB инкубировали в термостате при 37°C в течение 24 ч. Инкубирование на минимальной питательной среде продолжали в течение 72 ч. По числу колоний на среде LB определяли процент выживших клеток, а по числу колоний на чашках со средой M56 находили относительную частоту точной эксцизии транспозонов.

Для определения закономерности эксцизии *Tn10* при γ -облучении жидкую суспензию клеток облучали *in vitro* при 0°C , затем определяли процент реверсий признака устойчивости к тетрациклину и строили зависимость относительной частоты эксцизии транспозона.

Методика исследования закономерностей точной эксцизии транспозона *Tn10* при облучении ускоренными тяжелыми ионами была выбрана с учетом опыта исследований мутагенеза *E. coli* на базовых установках ОИЯИ (Е.А. Красавин, 1985). Приготовление клеточной суспензии DB 5872 описано ранее, облучение проводили на фильтрах с диаметром пор 0,3 мкм на установке «Геном» После облучения клетки стряхивали с фильтра в буфер M56, а затем высевали на минимальную среду и LB-агар. Генотип использован-

ного штамма таков, что на минимальной среде клетка дает видимую колонию только в случае точной эксцизии *Tn10* из гена *cysC*. Это позволило на пятый день инкубации чашек при 37 °С подсчитать число реверсий и определить относительную частоту точной эксцизии транспозона.

Результаты и обсуждение.

Радиочувствительность *rec*-мутантов *E. coli* к γ -излучению

Для определения радиочувствительности клеток к γ -излучению были построены кривые выживаемости *E. coli* дикого типа, а также клеток, несущих мутации генов: *recQ*, *recN*, *recO*, и *recA* (Д.В. Журавель 2001, Д.В. Журавель и А.В. Борейко, 2002 б). Как показано на рис. 1, все зависимости выживаемости от дозы γ -излучения имеют классический экспоненциальный характер. Радиочувствительность клеток дикого типа (1-1) составляет 0,014 Гр⁻¹. При этом угол наклона кривой выживания по отношению к оси ординат является максимальным. Мутации в генах *recQ* и *recN* вызывают эквивалентное увеличение радиочувствительности бактерий (1-2,3) до значения 0,018 Гр⁻¹. Но причины, по которым это происходит, являются различными. Ген *E. coli recQ* кодирует АТФ-зависимую геликазу молекулярной массой 68,35 кДа, которая раскручивает молекулу ДНК в направлении 3'-5' и специфически стимулирует топоизомеразу III для окончательного соединения молекулы

(N. Irino et. al., 1986). ДНК-геликазы играют важную роль в гомологичной рекомбинации и рекомбинационной репарации генных повреждений. При мутации *recQ* наблюдается увеличение частоты негомологичной рекомбинации на генотипе *recA⁻ recBC⁻ sbcBC⁻*, что говорит о том, что функция этого белка заключается в экспрессии супрессора негомологичной рекомбинации *E. coli* (K. Hanada et. al., 1997). Увеличение радиочувствительности у мутантов *recQ* позволяет сделать вывод о том, что процесс негомологичной рекомбинации проявляется при γ -облучении, когда первичные повреждения ДНК приводят к двунитевым разрывам, которые являются горячими точками рекомбинационного процесса. В отличие от *recQ*, характер экспрессии гена *recN* является чисто репаративным. Продукт этого гена имеет молекулярную массу 62 кДа. Его отсутствие в клетке уменьшает минимальную индуцирующую дозу возникновения SOS-ответа и увеличивает эффект от этого процесса

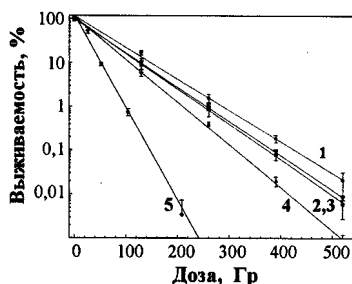


Рис. 1. Зависимости выживаемости *rec*-мутантов от дозы γ -излучения ¹³⁷Cs. Кривые выживаемости соответствуют следующим штаммам:
 1 – дикий тип, 4 – мутанты *recO*,
 2 – мутанты *recQ*, 5 – мутанты *recN*,
 3 – мутанты *recN*.

увеличение частоты негомологичной рекомбинации на генотипе *recA⁻ recBC⁻ sbcBC⁻*, что говорит о том, что функция этого белка заключается в экспрессии супрессора негомологичной рекомбинации *E. coli* (K. Hanada et. al., 1997). Увеличение радиочувствительности у мутантов *recQ* позволяет сделать вывод о том, что процесс негомологичной рекомбинации проявляется при γ -облучении, когда первичные повреждения ДНК приводят к двунитевым разрывам, которые являются горячими точками рекомбинационного процесса. В отличие от *recQ*, характер экспрессии гена *recN* является чисто репаративным. Продукт этого гена имеет молекулярную массу 62 кДа. Его отсутствие в клетке уменьшает минимальную индуцирующую дозу возникновения SOS-ответа и увеличивает эффект от этого процесса

при любом значении дозы (M. Brenna-Valle, 1998). Мутация *recN* вызывает высокий индуцибельный и конститутивный уровень продукта гена *recA*. Поэтому мутанты *recN* имеют значительно пониженную частоту супрессорной эксцизии транспозона *Tn10* (A. Chan et. al., 1994). При мутации в гене *recO* (1-4) радиочувствительность возрастает до значения $0,020 \text{ Гр}^{-1}$. Продуктом этого гена является *Del*-репрессор, полипептид молекулярной массой 26 кДа, который имеет мононуклеотид-связывающий домен для супрессии формирования делеций с компенсаторными дупликациями на плазмиде (K. Umezui et. al., 1993). Биохимические характеристики полипептида *recO*, определяющие его свойство связываться с одонитевой и двунитевой ДНК для ренатурации молекулы подтверждают участие гена в гомологичной рекомбинации. Кроме того, *recO* обеспечивает ассимиляцию одонитевых ДНК в гомологичную суперскрученную двойную спираль при участии *recA* (Q. Shan et. al., 1997). Мутация гена *recO* приводит к снижению *SOS*-ответа и уровня индуцибельной репарации в бактериях (Y.H. Liu et. al., 1998). Значительное увеличение радиочувствительности до значения $0,048 \text{ Гр}^{-1}$ вызывается мутацией гена *recA* (1-5). Продукт этого гена имеет сродство к одонитевой форме молекулы, возникающей в кластерах повреждений ДНК, и, как известно, является ключевым в репарации медленного типа (Е.А. Красавин, 1989). Ген *recA* кодирует около 350 аминокислотных остатков в значительно консервативной последовательности белка *RecA*, который обнаружен во всех бактериальных геномах, в ДНК хлоропластов растений, и высших организмов (H.D. Cerutti, 1992; A.I. Roca and M.M. Cox, 1997). Продукт гена *recA* является многофункциональным белком, который принимает участие во многих биохимических реакциях, где в качестве субстрата выступает одонитевая форма ДНК. Его белковая функция в гомологичной рекомбинации заключается в ДНК-зависимом расщеплении АТФ, запуске синапсиса, формировании гетеродуплексов и в обеспечении обмена нитей между гомологичными участками ДНК. Важно, что *RecA* является протеазным кофактором, который осуществляет расщепление продукта гена *lexA* и еще некоторых фаговых репрессоров. Инактивация *LexA* дерепрессирует более 20 генов, вовлеченных в *SOS*-ответ, в процессе которого осуществляется репарация ДНК, индуцируется *SOS*-зависимый мутагенез, реализуется задержка клеточного деления, а также происходит индукция профагов при появлении повреждений ДНК (W. Selbitschka, et.al., 1991).

Закономерности γ -индуцированной эксцизии при мутациях генов *recA* и *recN*

Потеря резистентных признаков бактерии, содержащей транспозон, может с высокой частотой вызываться γ -облучением. В данном пункте представлены результаты экспериментов по исследованию зависимости относительной частоты эксцизии транспозона *Tn10* от дозы γ -излучения ^{137}Cs (Д.В. Журавель и А.В. Борейко, 2002 а, б). Определены

закономерности эксцизии *Tn10* при «выключении» *SOS*-индуцибельных генов: *recA* и *recN*. Для клеток дикого типа определен фактор влияния условий, в которых проводится облучение и проведены параллели между эксцизией транспозона и *SOS*-индукцией при действии γ -излучения.

Для того, чтобы определить возможную роль генов *rec*-семейства в эксцизии транспозонов при действии γ -излучения были выбраны два штамма: SP 256 (*TyrA16::Tn10 recN262*), и ENZ 280 (*SfiA11 ArecA306::Tn10*). В качестве контроля были использованы клетки *E. coli* дикого типа AFT 228 (*ArgA81::Tn10*). В соответствии с этим на рис. 2 представлены три дозовые зависимости относительной частоты γ -индуцированной эксцизии транспозона *Tn10*.

Для клеток дикого типа на диапазоне доз от 0 до 600 Гр получена плавная кривая (2-1) с областью плато, которое наступает после дозы 500 Гр. На диапазоне от 0 до 260 Грей дозовая зависимость аппроксимируется параболической функцией:

$$\frac{N_{tet}}{N} = aD^2 + bD + c \quad (1),$$

где $\frac{N_{tet}}{N}$ – относительная частота эксцизии *Tn10*,

D – доза γ -облучения,

постоянные: $a = 1,1 \cdot 10^{-4} \text{ Гр}^{-2}$, $b = 7,2 \cdot 10^{-3} \text{ Гр}^{-1}$, $c = 5,5 \%$.

На диапазоне от 260 до 650 Грей относительная частота эксцизии *Tn10*, как функция от дозы γ -облучения аппроксимируется тригонометрической функцией:

$$\frac{N_{tet}}{N} = C \cdot \arctg(D - 260) - K \quad (2),$$

где постоянные: $C = 23,6 \text{ рад}^{-1}$, $K = 14,8 \%$.

При мутации гена *recN* происходит значительное уменьшение относительной частоты эксцизии транспозона (2-2). Зависимость в клетках с мутацией *recN* имеет область плато на диапазоне доз, который соответствует 1–10 % выживаемости штамма, а затем она выходит на насыщение после 500 Гр. В клетках, несущих мутацию *recA* построение дозовых зависимостей возможно только до 250 Гр, когда выживаемость достигает порогового значения $10^{-3} \%$, которое можно измерить. При определении частоты реверсий на данном диапазоне индукция эксцизии транспозона *Tn10* не обнаружена, за исключением

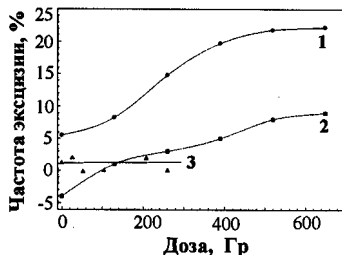


Рис. 2. Дозовые зависимости относительной частоты эксцизии транспозона *Tn10*.

1 – клетки дикого типа, 2 – мутанты *recN*, 3 – мутанты *recA*.

2–3 % флуктуаций (2-3). Дисперсия контрольных точек не позволяет сделать вывод о влиянии генов *recA* и *recN*, на спонтанную эксцизию транспозона, но можно сделать вывод о том, что эффект γ -индуцированной эксцизии транспозонов является *recA*-зависимым, также как и эффект точной эксцизии *Tn10*.

Точная эксцизия *Tn10* при облучении УФ-светом.

УФ-свет индуцирует в клетках *Escherichia coli* ряд SOS-индуцибельных процессов, к которым можно отнести точную эксцизию транспозонов. Точная эксцизия является делеционным событием, которое определяется структурой ДНК. Для выяснения роли структуры последовательности элемента были определены дозовые зависимости относительной частоты

точной эксцизии транспозонов *Tn1* и *Tn10* (Е.Ю. Козлова и др., 2003). На рис. 3 представлен график дозовой зависимости

выживаемости и относительной частоты точной эксцизии транспозонов *Tn1* и *Tn10*. Зависимость выживаемости (3-1), построенная полулогарифмическом масштабе имеет характерную форму кривой с плечом в диапазоне от 0 до 100 Дж/м². При дальнейшем увеличении дозы зависимость становится линейной. Относительная частота точной эксцизии транспозона *Tn1* из гена, отвечающего за метаболизм триптофана (3-3), и зависимость относительной частоты точной эксцизии *Tn10* из гена *cysC95* (3-2) имеют форму плавно возрастающих кривых с насыщением. Максимальное значение относительной частоты точной эксцизии *Tn10*, индуцированной ультрафиолетом, составляет 10^{-6} , а максимальное значение относительной частоты точной эксцизии транспозона *Tn1* в тех же условиях значительно ниже, и составляет $5 \cdot 10^{-8}$. Этот факт может быть объяснен на основе существующих отличий в последовательностях транспозонов *Tn1* и *Tn10*. Последовательность транспозона *Tn10* фланкирована инвертированными элементами *IS10*, которые имеют большой размер. Транспозон *Tn1* не содержит протяженных фланкирующих элементов и поэтому частота комплементарных ошибок между прямыми повторами для *Tn10* выше, чем для *Tn1*. Явления точной эксцизии и встраивания элемента *Tn1* изучены достаточно слабо и, скорее всего этот процесс происходит по немишенному механизму. В отличие от него, короткие концевые палиндромные последовательности элемента *Tn10* определяют эффективную точную эксцизию и возможность мишенного встраивания в локусы, содержащие последовательность *NGCTNAGCN*.

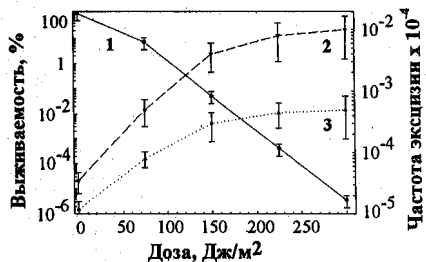


Рис. 3. Дозовые зависимости выживаемости *E. coli* и относительной частоты точной эксцизии транспозонов *Tn10* и *Tn1* при облучении УФ-светом
1 – выживаемость, 2 – точная эксцизия *Tn10*, 3 – точная эксцизия *Tn1*.

Точная эксцизия транспозона *Tn10*, индуцированная воздействием УФ-света представляет собой *SOS*-мутagenный процесс, который в *E. coli* происходит под контролем генов *recA* и *recN*. Получены дозовые зависимости относительной частоты точной эксцизии транспозона *Tn10* для штамма SP 256 (*TyrA16::Tn10 recN262*), содержащего точечную мутацию гена *recN* и для штамма ENZ 280 (*SfiA11::Tn10 ΔrecA306*), с делегированной последовательностью гена *recA*. Построение зависимостей проведено на диапазоне доз УФ-облучения от 0 до 100 Дж/м², который соответствует характерному диапазону выживаемости клеток, несущих делецию гена *recA*. Как видно на рис. 4, в этом диапазоне зависимость относительной частоты точной эксцизии *Tn10* у клеток дикого типа является линейной (4-1). Это означает, что относительная частота точной эксцизии *Tn10* может быть описана экспоненциальной функцией от дозы УФ-света. При наличии мутации в гене *recN* относительная частота плавно растет с увеличением дозы (4-2) и выходит на плато при дозах, когда процентная выживаемость клеток падает на 5 порядков до 4·10⁻² %.

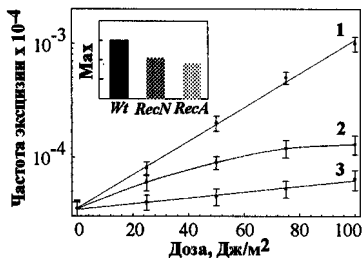


Рис. 4. Зависимости относительной частоты точной эксцизии транспозона *Tn10* при облучении УФ-светом. В левом углу отобрана диаграмма максимальных значений

- 1 – дикого типа, 2 – мутант *recN*,
3 – мутант *recA*.

Мутация в гене *recA* приводит к тому, что эффект индукции точной эксцизии транспозона проявляется весьма незначительно (4-3). Все зависимости проходят через одну начальную точку, это показывает, что мутации в генах *recA* и *recN* не оказывают заметного влияния на частоту спонтанной эксцизии транспозона *Tn10*. Аналогичные результаты были получены при исследовании делеций между прямыми повторами на плазмиде в *rec*-дефицитных штаммах (X. Bi and L. Liu, 1996). Для спонтанной и УФ-индуцированной (дозами до 25 Дж/м²) точной эксцизии транспозона *Tn10* число ревертантов, несущих транспозон в новом положении не превышает 1 %. Следовательно, точная эксцизия происходит с полной или частичной потерей последовательности элемента в несколько этапов.

Точная эксцизия *Tn10* при облучении ускоренными ионами с разной ЛПЭ

Эксперименты по изучению закономерностей точной эксцизии транспозона *Tn10* при облучении ускоренными ионами с разной ЛПЭ были проведены впервые (Д.В. Журавель, 2004). На первом этапе по кривым выживаемости бактериального штамма *E. coli* DB 5872, которые изображены на рис. 5, были определены обратные значения дозы Do^{-1} , при которых выживаемость падает в *e* раз (до 37 %). Максимальное значение радиочувствительности клеток $0,027 \pm 0,006 \text{ Гр}^{-1}$ выявлено при облучении ионами гелия ⁴He

(5-4), для которых ЛПЭ в биологическом образце составляет 100 кэВ/мкм. Ионы гелия с ЛПЭ 20 кэВ/мкм имеют меньшее значение радиочувствительности, равное $0,018 \pm 0,004 \text{ Гр}^{-1}$ (5-2). При облучении ионами углерода ^{12}C с ЛПЭ 200 кэВ/мкм (5-1) получена минимальная радиочувствительность, равная $0,015 \pm 0,006 \text{ Гр}^{-1}$, это значение лишь незначительно превышает радиочувствительность *E. coli* при γ -облучении ^{137}Cs . Отношение радиочувствительности клеток при облучении ускоренными ионами с данной ЛПЭ к радиочувствительности при γ -облучении определяет относительную биологическую эффективность ионов (Е.А. Красавин, 1989). С ростом ЛПЭ от 20 кэВ/мкм ОБЭ увеличивается и достигает своего максимального значения: $1,9 \pm 0,5$ при облучении ионами гелия ^4He с ЛПЭ 100 кэВ/мкм. Дальнейшее увеличение ЛПЭ должно приводить к падению величины ОБЭ, так при облучении ионами углерода ^{12}C с ЛПЭ 200 кэВ/мкм получено значение ОБЭ, равное $1,1 \pm 0,4$.

На втором этапе были получены данные для определения закономерностей точной эксцизии транспозона *Tn10*. При помощи дозовых зависимостей, построенных на рис. 6, определена эффективность ускоренных ионов с разными значениями ЛПЭ – обратное значение дозы, при котором частота точной эксцизии возрастает на один порядок (С. Козубек, 1985). Частота формирования делеций, вызванных точной эксцизией мобильного элемента, в трех случаях из четырех является прямой в полулогарифмическом масштабе координатных осей (6-1,2,3). Следовательно, зависимость относительной частоты точной эксцизии транспозона *Tn10* 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 зависимости мутагенного эффекта:

$$\frac{N_R}{N} = 10^{kD+c} \quad (3),$$

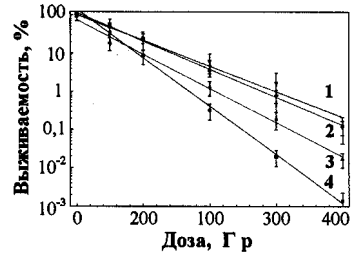


Рис. 5. Дозовые зависимости выживаемости бактерий при облучении ускоренными ионами с разной ЛПЭ. 1 – ^{12}C , 200 кэВ/мкм, 3 – ^4He , 50 кэВ/мкм, 2 – ^4He , 20 кэВ/мкм, 4 – ^4He , 100 кэВ/мкм.

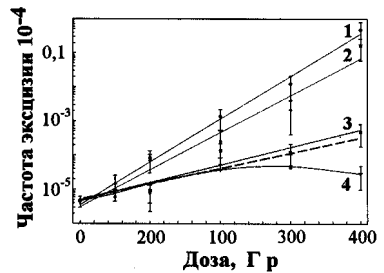


Рис. 6. Дозовые зависимости относительной частоты точной эксцизии транспозона *Tn10* при облучении ускоренными ионами с разной ЛПЭ. 1 – ^4He , 20 кэВ/мкм, 2 – ^4He , 50 кэВ/мкм, 3 – ^4He , 100 кэВ/мкм, 4 – ^{12}C , 200 кэВ/мкм. Пунктирной линией показана нормировка по γ -излучению

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, которая вместе с линейными коэффициентами входит в показатель таким образом, чтобы он оказался безразмерной отрицательной величиной из диапазона от 10^{-10} до 10^{-4} . Максимальную генетическую эффективность, которая в данном случае определена по критерию точной эксцизии $Tn10$ имеют ускоренные ионы ^4He с ЛПЭ 20 и 50 кэВ/мкм (7-2).

Относительная биологическая эффективность, определенная по критерию летального действия на клетки *E. coli* имеет максимум при облучении ускоренными ионами гелия ^4He с ЛПЭ 100 кэВ/мкм. В отличие от нее, максимум зависимости ОБЭ, определенной по критерию точной эксцизии транспозона $Tn10$ приходится на диапазон ЛПЭ от 20 до 40 кэВ/мкм. Как было показано на рис. 5, с ростом ЛПЭ от 20 кэВ/мкм угол наклона прямых уменьшается, следовательно, выход летальных повреждений растет и достигает максимума при облучении ускоренными ионами ^4He с ЛПЭ 100 кэВ/мкм. С дальнейшим ростом ЛПЭ количество летальных повреждений, приходящихся на единицу дозы тяжелых

заряженных частиц снижается. Это обстоятельство приводит к тому, что ОБЭ является функцией второго рода (7-1), имеющей локальный максимум при ЛПЭ = 100 кэВ/мкм. Изменение ОБЭ связано с увеличением выхода прямых двуниевых разрывов ДНК (Е.А. Красавин, 1989), которые являются основным летальным повреждением в клетках *E. coli*. Максимум ОБЭ (7-2), который измерялся по критерию эффективности точной эксцизии $Tn10$, сдвинут в область меньших ЛПЭ. При этом диапазон, на котором он находится: 20–40 кэВ/мкм, соответствует максимальному выходу кластерных повреждений одной нити ДНК (Е.А. Красавин, С. Козубек, 1991) которые формируются медленными δ -электронами трека тяжелой заряженной частицы и приводят к формированию генных мутаций. Максимальное значение выхода таких повреждений, как показано, реализуется при ЛПЭ \approx 40–50 кэВ/мкм (V. Michalik, 1992).

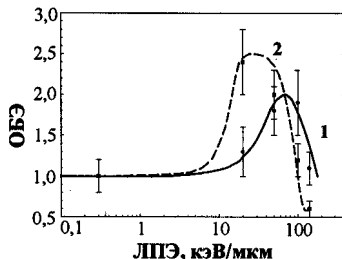


Рис. 7. Зависимости ОБЭ от ЛПЭ излучений.

1 — по критерию летального действия 2 — по критерию точной эксцизии

Статистическое моделирование мишенного встраивания транспозона

В результате исследований, выполненных в конце прошлого столетия, когда был полностью изучен геном кишечной палочки *Escherichia coli*, стало возможным проведение различных статистических расчетов с использованием полной нуклеотидной последовательности ДНК этого вида бактерий. Опираясь на то, что встраивание транспозона является

ся сайт-специфическим, были проведены расчеты вероятности встраивания *Tn10* в разные положения на бактериальной хромосоме (Д.В. Журавель и Е.Ю. Козлова, 2003).

По данным, которые были опубликованы другими авторами (N. Kleckner, 1979; D.E. Berg, 1985) для встраивания *Tn10* необходима мишень, состоящая из 9 нуклеотидов:

NGCTNAGCN, где *N* – произвольное основание. Если основания *N* одинаковы, то в геноме бактерии существует 4 вида последовательностей, которые могут быть потенциальной мишенью для встраивания транспозона. Вероятность встретить любую из четырех возможных мишеней рассчитана двумя способами: через вероятности встретить отдельные

Мишень	λ_1	λ_2	<i>N</i>
AGCTAAGCA	7,22	3,2	2
TGCTTAGCT	13,07	4,9	4
GGCTGAGCG	19,4	19,4	18
CGCTCAGCC	48,59	16,07	16

Табл. 1. Число мишеней для встраивания *Tn10* в геномной последовательности *E. coli*.

нуклеотиды, или прямым программным поиском мишеней в полной последовательности генома *E. coli*. Найдем встречаемость нуклеотидных мишеней для встраивания *Tn10* первым способом, всякий раз используя результаты, полученные при помощи поисковой программы в качестве проверки результата.

Тривиальным подходом для оценки вероятности может служить формула вида:

$$P_{AGCTAAGCA} = (P_A)^4 \cdot (P_G)^2 \cdot (P_C)^2 \cdot (P_T) \quad (4)$$

В результате можно получить математическое ожидание λ_1 числа копий мишени в последовательности *E. coli*, табл. 1, вторая колонка. Как видно расчетные значения значительно отличаются от полученных при помощи компьютерной программы, последняя колонка. Это обстоятельство позволяет предположить наличие корреляции между нуклеотидами в соседних положениях. Действительно, например, перемножение вероятностей дает значение $10,9 \cdot 10^{-2}$ для «двойки» *CC*, а на самом деле вероятность встретить *CC* несколько меньше: $3,9 \cdot 10^{-2}$. Аналогичный эффект наблюдается еще для нескольких пар в соседних положениях. Учитывая то, что число возможных соседних пар в 9-нуклеотидной мишени $n - 1 = 8$, поправка на вероятность может изменить значение в несколько раз. Формула вероятности должна быть в каждом случае скорректирована:

$$P_{AGCTAAGCA} = \frac{P_{AG} \cdot (P_{GC})^2 \cdot P_{CT} \cdot P_{TA} \cdot P_{AA} \cdot P_{AG} \cdot P_{CA}}{(P_G)^2 \cdot (P_C)^2 \cdot (P_A)^2 \cdot P_T} \quad (5)$$

и тогда математическое ожидание λ_2 числа мишеней будет значительно приближено к тому, которое получено прямым программным поиском в полной последовательности генома *E. coli* (табл. 1).

Встраивание транспозона в новое положение происходит только в том случае, когда ферментативный комплекс, в который входит транспозаза, распознает в новом поло-

жении 9-нуклеотидную мишень. Будем полагать, что эффективность узнавания транспоза-зы такова, что фермент может допустить 1–2 нуклеотидные отклонения на концах последовательности мишени. Тогда для проведения расчета вероятности встраивания мобильного элемента нужно использовать результаты поиска по всевозможным мишеням вида *NGCTNAGCN*, содержащим усеченные последовательности, и таким образом моделировать ситуацию концевое несоответствия. На основании проведенного расчета для вероятности встретить данную 9-нуклеотидную последовательность с учетом возможных 1–2 нуклеотидных отклонений была рассчитана функция вероятности встраивания транспозона в новое положение.

На рис. 8 показан график распределения функции вероятности встраивания транспозона *Tn10* в новое положение на бактериальной хромосоме. Для определения функции вероятности встраивания транспозона было использовано распределение 7, 9 – нуклеотидных мишеней в полной последовательности генома *Escherichia coli*. Транспозиция мобильного элемента в условиях *SOS*-индукции дозами УФ-света свыше 25 Дж/м² отсутствует с детектируемой частотой, поэтому вероятность встраивания *Tn10* была нормирована по минимальному значению на 10⁻¹⁰ при помощи функции $\exp(n - 9)^2$, где n – число нуклеотидов в мишени. По приведенной диаграмме была определена наиболее вероятная мишень *CGCTCAGC*. С учетом экспериментальных данных по индукции точной эксцизии транспозона *Tn10* при облучении УФ-светом и ускоренными ионами с разной ЛПЭ мишень должна

быть комплементарно дополнена справа нуклеотидом гуанин. Тогда данная последовательность будет являться палиндромной, что обеспечит точную эксцизию транспозона при облучении без смещения рамки считывания донорного гена. Таким образом, проведенное статистическое моделирование дополняет результаты секвенирования активных локусов бактериальной хромосомы, где может происходить транспозиция мобильного элемента *Tn10* и одновременно дает основания для объяснения высокоэффективной точной эксцизии данного мобильного элемента при облучении ускоренными ионами ⁴He с ЛПЭ от 20 до 50 кэВ/мкм.



Рис. 8. График распределение функции вероятности встраивания транспозона *Tn10* в новое положение в форме пространственной диаграммы. По вертикальной оси отложена вероятность встраивания транспозона. В горизонтальной плоскости по числу нуклеотидов распределены возможные мишени для встраивания.

SOS-индуцированный механизм точной эксцизии Tn10

При облучении УФ-светом в молекуле ДНК возникают первичные повреждения, преимущественно тиминовые димеры. Возникновение повреждений запускает комплекс реакций SOS-ответа и эксцизионную репарацию ДНК, что приводит к формированию одностранных шпилек в последовательности транспозона и завершается точной эксцизией элемента. Именно такая схема была предложена для точной эксцизии Tn10 при облучении небольшими дозами УФ-света (A. Chan and R. Nagel, 1997), и можно полагать, что во всем диапазоне доз, где может быть определена выживаемость, генетический механизм не меняется. Точная эксцизия мобильного элемента может быть индуцирована высокоионизирующим излучением: γ -излучением (Д.В. Журавель и А.В. Борейко, 2002 а, b) и ускоренными ионами (Д.В. Журавель, 2004). В этом случае первичные события в облученной клетке несколько иные. Например, прямое попадание заряженной частицы (наложение трека на область, в которой локализована хромосома *E. coli*) вызывает множественные одностранные и двустранные разрывы ДНК, что приводит к летальному для клетки исходу. Кроме того, прохождение заряженной частицы в конденсированной среде вызывает эффект образования «шубы», состоящей из вторичных треков δ -электронов. Вторичные δ -электроны могут формировать кластерные повреждения ДНК (Е.А. Красавин, и С. Козубек, 1991), инициируют SOS-индукцию и являются причиной SOS-мутационеза, к которому относится точная эксцизия транспозона.

Согласно классической модели Эгнера, разработанной для спонтанной эксцизии транспозона Tn5 молекулярный механизм реализации события эксцизии является *recA*-зависимым и не коррелирует с перемещением транспозона в новое положение. Частота точной эксцизии по репликативному механизму составляет 10^{-8} , что соответствует частоте спонтанных делеций между прямыми обратными повторами (C. Egner and D.E. Berg, 1980). Классическая схема была усовершенствована на основании исследований влияния мутаций в SOS-индуцируемых генах и трансформировалась в молекулярную модель точной эксцизии Tn10 по репарационно-репликативной модели шпилек (R. Nagel and A. Chan, 2003), которая, однако не раскрывает пока эффекта индукции точной эксцизии при действии излучений с разными физическими характеристиками и не объясняет характерных особенностей «тонкой» структуры концевых последовательностей транспозона.

Рассмотрим модель механизма SOS-индуцированной точной эксцизии транспозона Tn10, которая описывает реализацию этого события через возникновение первичных повреждений ДНК. Инсерционные последовательности, инвертировано фланкирующие элемент содержат близкорасположенные прямые 10-нуклеотидные повторы и заканчиваются двумя палиндромами. После облучения в тех клетках, где первичные повреждения распо-

ложены на последовательности элемента, образуются ступенчатые одностранные разрывы за счет *SOS*-механизма ошибочного спаривания, и далее путем *RecBCD*-рекомбинации происходит удаление транспозона за исключением небольшого фрагмента. Этот фрагмент содержит одностранный разрыв или остаточное повреждение, служащее субстратом для индуктора эксцизионной репарации – белка *RecA*. В процессе эксцизионной репарации одной нити, на второй нити формируется противоположная шпилька, которая не блокирует репликационный раунд и будет удалена пререпликативно системой мисматч репарации ДНК.

Данная модель позволяет избежать неопределенности, которая имеет место в схемах с «репликативным глазком», имеющим размер более 10 тысяч оснований ДНК, и не требует свойства палиндромности от всего инсерционного элемента, фланкирующего последовательность транспозона. Согласно представленной модели точная эксцизия должна реализоваться более эффективно при наличии кластерных повреждений, которые по стохастическому принципу локализованы в определенной области, а не равномерно распределены по всей бактериальной хромосоме. Это замечание подтверждается сравнением экспериментальных данных по индукции точной эксцизии УФ-светом и ускоренными ионами с разной ЛПЭ. Выживаемость *E. coli* при облучении дозой УФ-света 130 Дж/м² падает до 0,2 %, при этом точная эксцизия происходит с частотой $1,7 \cdot 10^{-8}$. При эквивалентной дозе ускоренных ионов ⁴He относительная частота точной эксцизии составляет $4 \cdot 10^{-4}$ (Д.В. Журавель и Е.Ю. Козлова, 2003).

Современные биохимические исследования привели к открытию нового фермента – транспозазы и был предложен *tase*-зависимый механизм транспозиции (B. Ason and W.S. Reznikoff, 2002). По отношению к донорному сайту транспозиция также может являться точной эксцизией, независимой от классической модели Эгнера, построенной по репликативному способу. Поэтому интервал частот точной эксцизии 10^{-10} – 10^{-8} в отсутствии диссипативных факторов может быть полярно разделен на нижний, при котором точная эксцизия происходит через транспозицию элемента, и верхний, при котором точная эксцизия приводит к потере элемента. Факт, что колонии клеток, в которых произошла точная эксцизия *Tn10* после облучения УФ-светом дозой свыше 25 Дж/м² и ускоренными ионами на всем диапазоне доз не проявляют резистентности к тетрациклину, позволяет сделать вывод о том, что транспозиция в условиях *SOS*-ответа супрессируется точной эксцизией по *SOS*-индуктивному механизму с потерей элемента.

Выводы

1. Изучена радиочувствительность бактерий *Escherichia coli* и репарационно-дефицитных мутантов *recA*, *recN*, *recO*, и *recQ* при действии излучений с разными физическими характеристиками. Показано, что мутация *recA* при облучении ультрафиолетовым светом и γ -квантами в ряду рассмотренных *rec*-мутаций оказывает наибольшее влияние на чувствительность клеток. Зависимость радиочувствительности клеток дикого типа от ЛПЭ излучений описывается кривой с локальным максимумом в области ~ 100 кэВ/мкм.
2. Исследованы закономерности эксцизии транспозонов *Tn10* и *Tn1* у клеток дикого типа. Показано, что УФ-свет и γ -излучение являются эффективными индукторами эксцизии транспозонов.
3. Изучено влияние мутаций *recA* и *recN* на частоту эксцизии *Tn10* при γ - и УФ-облучении клеток. Показано, что в обоих случаях указанные мутации подавляют эксцизию транспозона, в клетках с *recA* мутацией дозовая зависимость частоты эксцизии не выявлена.
4. В широком диапазоне ЛПЭ излучений (0,3–200 кэВ/мкм) исследованы закономерности точной эксцизии транспозона *Tn10*. Выявлено, что с ростом ЛПЭ частиц эффективность точной эксцизии возрастает, в диапазоне 20–40 кэВ/мкм, достигает максимума, а при дальнейшем увеличении ЛПЭ – снижается.
5. Получены значения относительной биологической эффективности тяжелых ускоренных частиц по критерию летального действия и точной эксцизии *Tn10*. Максимальные значения ОБЭ излучений составили $1,9 \pm 0,5$ и $2,4 \pm 0,6$ соответственно.
6. Проведено статистическое моделирование встраивания транспозона *Tn10* и построено распределение вероятности встраивания. Найдена наиболее вероятная мишень: *CGCTCAGC*.
7. Предложена молекулярная модель, описывающая *SOS*-индуцированную точную эксцизию транспозона.

Список работ

1. Журавель Д.В. Закономерности индукции эксцизии транспозона *Tn10* у *rec*-мутантов бактерий *E. coli* γ -излучением ^{137}Cs . Тезисы докладов V научной конференции молодых ученых и специалистов ОИЯИ, Дубна 2001, с. 119.
2. Журавель Д.В. Индукция генетических перестановок в бактериях. Вестник Государственного университета «Дубна», 2001, № 5, с. 33–37.
3. Журавель Д.В., А.В. Борейко. Закономерности индукции эксцизии транспозона *Tn10* у *rec*-мутантов бактерий *E. coli* γ -излучением ^{137}Cs . Аннотации докладов II международ-

- ного симпозиума «Проблемы биохимии, радиационной и космической биологии», ОИЯИ Дубна, 2001, с. 141.
4. Журавель Д.В., А.В. Борейко. Закономерности индукции эксцизии транспозона *Tn10* у *rec*-мутантов бактерий *E. coli* γ -излучением ^{137}Cs . Тезисы докладов на IV Съезде по радиационным исследованиям, Москва, 2001, с. 47.
 5. Журавель Д.В. История открытия мобильных элементов. Вестник государственного университета «Дубна», 2002, № 6, с. 50–54.
 6. Журавель Д.В., А.В. Борейко. Индукция эксцизии транспозона *Tn10* излучением с разными физическими характеристиками. Тезисы докладов VI научной конференции молодых ученых и специалистов ОИЯИ, Дубна 2002, с. 255–256.
 7. Козлова Е.Ю., А.В. Можаяева, Д.В. Журавель. *SOS*-индукция эксцизии транспозонов в бактериях. Тезисы докладов VI научной конференции молодых ученых и специалистов ОИЯИ, Дубна 2002, с. 256.
 8. Zhuravel D.V. Induction of the *Tn10* precise excision after accelerated heavy ions irradiation. Тезисы международной конференции «Генетические последствия чрезвычайных радиационных ситуаций», 2002, с. 34.
 9. Журавель Д.В., А.В. Борейко. Закономерности индукции эксцизии транспозона *Tn10* у *rec*-мутантов бактерий *E. coli* γ -излучением ^{137}Cs . Сборник докладов II международного симпозиума «Проблемы биохимии, радиационной и космической биологии», ОИЯИ Дубна, 2002, с. 125–129.
 10. Журавель Д.В., А.В. Борейко. Закономерности эксцизии транспозона *Tn10* у *rec*-мутантов бактерий *E. coli* при γ -облучении. Журнал РАН, серия «Радиационная биология. Радиозология», 2002, т. 42, № 6, с. 636–638.
 11. Журавель Д.В. Точная эксцизия транспозона *Tn10* в клетках *E. coli* при облучении ускоренными ионами с разной ЛПЭ. Тезисы докладов VII научной конференции молодых ученых и специалистов ОИЯИ, Дубна 2003, с. 249–252.
 12. Козлова Е.Ю., А.В. Можаяева, Д.В. Журавель. УФ-индукция точной эксцизии транспозонов *Tn10* и *Tn1* в бактериях *E. coli*. Тезисы докладов VII научной конференции молодых ученых и специалистов ОИЯИ, Дубна 2003, с. 257–260.
 13. Журавель Д.В., Е.Ю. Козлова. Индукция эксцизии транспозонов излучениями с разными физическими характеристиками. Вестник государственного университета «Дубна», 2003, № 8, с. 27–33.
 14. Журавель Д.В. Индукция точной эксцизии транспозона *Tn10* в клетках *E. coli* при облучении ускоренными ионами с разной ЛПЭ. Препринт ОИЯИ, Дубна, P19-2003-35, с. 1–7.

15. Журавель Д.В. Индукция точной эксцизии транспозона *Tn10* в клетках *E. coli* при облучении ускоренными ионами с разной линейной передачей энергии. Журнал РАН, серия «Радиационная биология. Радиоэкология», 2004, т. 44, № 2, с. 138–141.
16. Журавель Д.В., Е.Ю. Козлова. Индукция эксцизии транспозонов излучениями с разными физическими характеристиками. Вестник молодых ученых. С-Петербург, в печати.
17. Zhuravel D.V. Structural mutations induction by accelerated heavy ions in *Escherichia coli*: transposon *Tn10* precise excision. Proceedings of the II International school “Accelerators in biology and medicine”, Poznan, in print.

Получено 4 ноября 2004 г.

Макет *Н. А. Киселевой*

Подписано в печать 10.11.2004.

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

Усл. печ. л. 1,25. Уч.-изд. л. 1,46. Тираж 100 экз. Заказ № 54655.

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/