

МУТАГЕННОЕ ДЕЙСТВИЕ УСКОРЕННЫХ ТЯЖЕЛЫХ ИОНОВ НА БАКТЕРИАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ

А. В. Борейко, Е. А. Красавин

Объединенный институт ядерных исследований, Дубна

ВВЕДЕНИЕ	1866
ЗАКОНОМЕРНОСТИ МУТАГЕННОГО ДЕЙСТВИЯ ИЗЛУЧЕНИЙ С РАЗНОЙ ЛПЭ	1868
Закономерности индукции прямых мутаций lac^- , $tonB^-$, $colB^-$ у клеток <i>E.coli</i> при действии излучений с разной ЛПЭ	1870
Закономерности индукции обратных мутаций $his^- \rightarrow His^+$ у клеток <i>Salmonella typhimurium</i> и <i>Bacillus subtilis</i> при действии излучений с разной ЛПЭ	1875
Закономерности SOS-ответа бактерий <i>E.coli</i> при действии излучений с разной ЛПЭ	1880
Закономерности индукции делеционных мутаций у клеток <i>E.coli</i> излучениями с разной ЛПЭ	1885
Закономерности эксцизии транспозонов в клетках <i>E.coli</i> при действии излучений с разной ЛПЭ	1888
МЕХАНИЗМЫ МУТАГЕННОГО ДЕЙСТВИЯ ИЗЛУЧЕНИЙ С РАЗНОЙ ЛПЭ НА БАКТЕРИАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ	1890
Молекулярная модель образования генных мутаций у клеток <i>Escherichia coli</i>	1890
Математическая модель образования генных мутаций у клеток <i>Escherichia coli</i> при УФ-облучении	1901
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	1907
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	1912

МУТАГЕННОЕ ДЕЙСТВИЕ УСКОРЕННЫХ ТЯЖЕЛЫХ ИОНОВ НА БАКТЕРИАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ

А. В. Борейко, Е. А. Красавин

Объединенный институт ядерных исследований, Дубна

С использованием ускорителей тяжелых ионов Объединенного института ядерных исследований изучены закономерности и механизмы образования мутаций различного типа в клетках прокариот. У клеток *Escherichia coli* исследована индукция прямых (lac^- , $tonB^-$, $colB$) и у клеток *Salmonella typhimurium*, *Bacillus subtilis* обратных ($his^- \rightarrow His^+$) мутаций при действии излучений широкого диапазона линейных передач энергии (ЛПЭ). Проведено сравнительное изучение закономерностей образования генных и структурных ($tonB$ trp^-) мутаций у бактерий *Escherichia coli* при действии ускоренных тяжелых ионов. Показано, что дозовые зависимости частоты образования генных мутаций при действии γ -квантов и ускоренных тяжелых ионов описываются линейно-квадратичными функциями. Для структурных мутаций характерны линейные зависимости доза-эффект. Квадратичный характер дозовых кривых мутагенеза обусловлен «взаимодействием» двух независимых друг от друга событий «попадания» в ходе SOS-репарации поврежденных генетических структур. Сделан вывод о том, что при действии ускоренных тяжелых ионов генные мутации индуцируются областью δ -электронов треков заряженных частиц. Методами SOS-хромотеста, SOS-люкс-теста и индукции профага λ изучены закономерности SOS-ответа клеток при действии излучений в широком диапазоне ЛПЭ. Обосновывается положение о том, что молекулярной основой формирования генных мутаций являются кластерные односторонние разрывы ДНК, структурных мутаций — двунитевые разрывы ДНК. Выявлено, что зависимость относительной биологической эффективности (ОБЭ) ускоренных ионов от их ЛПЭ описывается кривыми с локальным максимумом. Показано, что биологическая эффективность ионизирующих излучений с разными физическими характеристиками для клеток с различным генотипом, оцениваемая по летальному действию, индукции генных и делеционных мутаций, точной эксцизии транспозонов, детерминирована особенностями передачи энергии излучений, влияющими на характер индуцируемых повреждений ДНК, и эффективностью работы индуцибельных и конститутивных систем репарации клеток. Возрастание относительной биологической эффективности тяжелых заряженных частиц обусловлено увеличением выхода повреждений ДНК, участвующих в формировании радиационно-индуцированных эффектов, и повышением эффективности индуцибельных систем репарации. Установлено, что величина ЛПЭ (L_{max}), при которой наблюдаются максимальные значения коэффициентов ОБЭ по использованным критериям облучения, варьируется в зависимости от характера регистрируемого радиационно-индуцированного эффекта. Показано, что для генных мутаций и индукции точной эксцизии мобильных элементов значения L_{max} реализуются в области ЛПЭ, равных ≈ 20 кэВ/мкм. Для летальных эффектов облучения и индукции делеционных мутаций величина L_{max} составляет ≈ 50 и 100 кэВ/мкм соответственно. Различия в положении L_{max} для изученных радиационно-генетических эффектов определяются различным типом повреждений ДНК, участвующих в мутационном процессе. Предложена молекулярная модель образования генных мутаций в клетках *Escherichia coli* при действии ионизирующих излучений. В рамках модели рассматриваются основные радиационные повреждения ДНК и магистральные пути их репарации. В основу положено представление о решающей роли мутагенной, склонной к ошибкам ветви SOS-репарации в фиксации премутационных повреждений ДНК в точковые мутации. Показано, что центральным механизмом в этом

процессе является формирование индуцибельного мультиферментного комплекса, включающего ДНК-полимеразу V (UmuD₂'C), RecA-протеазу, SSB-белки, субъединицы ДНК-полимеразы III, осуществляющего ошибочный синтез ДНК на поврежденной матрице. На основе молекулярной модели разработана математическая модель индукции генных мутаций при ультрафиолетовом облучении клеток.

With the use of heavy-ion accelerators of the Joint Institute for Nuclear Research, regularities and mechanisms of the formation of mutations of different types in prokaryote cells were studied. Induction of direct mutations (lac⁻, tonB⁻, and colB) in *Escherichia coli* cells and reverse his⁻ → His⁺ mutations in *Salmonella typhimurium* and *Bacillus subtilis* cells under radiations in a wide range of linear energy transfer (LET) was investigated. A comparative study was performed of the regularities in the formation of gene and structural (tonB trp⁻) mutations in *Escherichia coli* bacteria under the effect of accelerated heavy ions. It is shown that the dose dependences of gene mutation formation under gamma quanta and accelerated heavy ions are described by linear quadratic functions. Linear dose-effect dependences are typical of structural mutations. The quadratic character of mutagenesis curves is caused by the interaction of two mutually independent «hitting» events in the course of the SOS repair of genetic structure damage. A conclusion is made that under accelerated heavy ions, gene mutations are induced in the delta-electron region of charged particle tracks. With the SOS chromotest, SOS lux test, and lambda prophage induction, regularities in cell SOS response under radiations in a wide LET range were studied. A thesis is substantiated that clustered single-strand DNA breaks are the molecular basis of the gene mutations, and DNA double-strand breaks are the molecular basis of structural mutations. It is found that the LET dependence of the relative biological effectiveness of accelerated ions is described by curves with a local maximum. It is shown that the biological effectiveness of ionizing radiations with different physical characteristics for cells with different genotypes, evaluated by the lethal effect, gene and deletion mutation induction, and the precise excision of transposons, is determined by the specifics of radiation energy transfer, which influence the character of the induced DNA damage, and by the efficiency of inducible and constitutive systems of cell repair. An increase in the relative biological effectiveness of heavy charged particles is determined by an increase in the yield of DNA damage participating in the formation of the radiation-induced effects and by the growth of the efficiency of the inducible repair systems. It is established that the LET value (L_{max}), at which the maximal values of the RBE coefficients are observed against the used irradiation criteria, varies depending on the character of the detected radiation-induced effect. It is shown that for the gene mutations and induction of the precise excision of the mobile elements, the L_{max} values are found at about 20 keV/μm. For the lethal effects of irradiation and deletion mutation induction, the L_{max} values are about 50 and 100 keV/μm, respectively. The differences in the L_{max} location for the studied radiation genetic effects are determined by different types of DNA lesions involved in the mutation process. A molecular model of gene mutations in *Escherichia coli* cells under ionizing radiations is proposed. Within the framework of the model, the basic types of DNA damage and the main ways of their repair are examined. The model is based on the idea that the mutagenic branch of SOS repair, which is error-prone, plays the decisive role in fixing the premutation DNA lesions as point mutations. It is shown that the central mechanism of this process consists in the formation of an inducible multienzyme complex, which includes (UmuD₂'C) DNA polymerase V, RecA protease, SSB proteins, and a DNA polymerase III subunit. The complex performs erroneous DNA synthesis on the damaged matrix. Based on the molecular model, a mathematical model of gene mutation induction under ultraviolet irradiation of cells was developed.

PACS: 87.53.Bn

ВВЕДЕНИЕ

Более полувека тяжелые заряженные частицы привлекают внимание специалистов-радиобиологов как эффективный инструмент при решении фундаментальных вопросов, связанных с выяснением механизмов, лежащих в основе

индуцированного мутационного процесса. На необходимость и плодотворность применения ионизирующих излучений с разными физическими характеристиками в изучении механизмов генетического действия радиации указывали Н. В. Тимофеев-Ресовский, Д. Е. Ли, Л. Г. Циммер. Результаты исследований биологических эффектов, вызываемых тяжелыми заряженными частицами, использовались классиками радиационной генетики при обосновании фундаментального методологического принципа радиобиологии — «принципа попадания».

В последние десятилетия выделен ряд важных практических задач, решение которых требует детального изучения механизмов биологического действия тяжелых ионов высоких энергий. Одна из них связана с проблемами космической радиобиологии. Увеличение дальности и длительности космических полетов поставили на первый план проблему оценки опасности биологического действия высокоэнергетичных тяжелых ионов и разработку мер радиационной безопасности экипажей кораблей. В ходе реализации межпланетных пилотируемых полетов, прежде всего к Марсу, экипажи будут подвергаться воздействию тяжелых ядер высоких энергий, исходящих из глубин Галактики. Как известно, в спектре галактического космического излучения (ГКИ) преобладают ядра группы углерода и железа. Энергетический спектр ядер ГКИ весьма широк, и такие частицы с высокой эффективностью могут индуцировать мутации, инициировать развитие онкологических заболеваний, вызывать другие неблагоприятные последствия. В последние годы стало возможным моделировать генетическое действие тяжелых ядер ГКИ высоких энергий благодаря созданию ускорителей тяжелых ионов, способных ускорять ядра тяжелых элементов до космических энергий. Такие ускорители успешно функционируют в России, США, Германии, Японии.

Ускоренные тяжелые ионы (преимущественно ядра углерода с энергией 200–300 МэВ/нуклон) начали успешно применяться при лечении онкологических заболеваний. Оптимальное распределение поглощенной дозы излучения в опухоли при облучении тяжелыми ионами делает этот вид лучевого воздействия весьма перспективным в клинике лучевой терапии. С учетом этого обстоятельства задача детального изучения механизмов генетического действия тяжелых ионов также весьма актуальна. Важным остается решение вопросов нормирования лучевых нагрузок на персонал, работающий в смешанных полях ионизирующих излучений, что также связано с изучением стохастических эффектов радиационного воздействия, индуцируемых излучениями, различающимися по величине линейной передачи энергии (ЛПЭ).

При решении проблемы генетических эффектов тяжелых заряженных частиц крайне важными представляются данные о закономерностях и механизмах их мутагенного действия на клетки с различным уровнем организации генетического аппарата. При этом необходимо не только иметь информацию о суммарном выходе различного типа мутаций в облученных клетках,

также исключительный интерес представляют данные о частоте образования как генных, так и структурных мутаций. У клеток высших эукариот изучение дозовых зависимостей выхода точковых и структурных мутаций при действии ионизирующих излучений широкого диапазона ЛПЭ является весьма непростой задачей, требующей привлечения сложных молекулярно-биологических методов, выполнения большого объема работ. Получение такого рода информации значительно облегчается в экспериментах на клетках прокариот. Представленные в настоящем обзоре материалы касаются экспериментальных исследований мутагенного действия ускоренных заряженных частиц на бактериальные клетки, выполненных в Лаборатории радиационной биологии ОИЯИ на ускорителях многозарядных ионов Института в последние годы.

1. ЗАКОНОМЕРНОСТИ МУТАГЕННОГО ДЕЙСТВИЯ ИЗЛУЧЕНИЙ С РАЗНОЙ ЛПЭ

Открытие мутагенного действия ионизирующих излучений на микроорганизмы связано с именем Г. А. Надсона. Еще в 1920 г. он отмечал, что «действие радия передается наследственно потомству». Однако эти пионерские работы не привлекли пристального внимания генетиков, так как в них не были использованы широко применявшиеся в опытах на дрозофилах количественные методы учета наблюдаемых изменений, а также отсутствовал их гибридологический анализ. Первым количественным исследованием, в котором была установлена связь между частотой возникновения мутаций у микроорганизмов и дозой различных видов ионизирующих и ультрафиолетового (УФ) излучений, явилась работа А. С. Кривиского, выполненная в конце 1930-х гг. [1]. В экспериментах на уксусно-кислых бактериях было выявлено, что при действии рентгеновского излучения, радона и УФ-излучения среди выживших увеличивается число клеток, дающих начало новым расам, т. е. возрастает число мутантов. Это возрастание идет прямо пропорционально дозе облучения. Позднее аналогичные исследования на микроорганизмах были начаты и за рубежом. Важной основой для развития такого рода работ, с одной стороны, явились успехи количественной радиобиологии клеток, связывающие летальное действие излучений с повреждением генетического аппарата, с другой — достижения и плодотворные концепции радиационной генетики высших организмов. Интенсивное изучение мутационного процесса у микроорганизмов было начато в конце 1940-х — начале 1950-х гг. К ним следует отнести работы Демереца и Латарже, которые при изучении возникновения мутаций к фагоустойчивости бактерий *E. coli* В и В/г под влиянием УФ- и рентгеновского излучений выявили, что частота мутирования, т. е. количество мутантов N_m , деленное на количество выживающих клеток N , увеличивается с ростом дозы (D) УФ-излучения по степенной зависимости, проходит че-

рез максимум, а затем постепенно снижается. При действии рентгеновского излучения эта зависимость имела линейный характер до доз, равных примерно 100 Гр. Обнаруженный тип зависимости частоты мутирования клеток микроорганизмов от дозы излучений позднее был выявлен и другими авторами на других тест-объектах. Линейные зависимости $N_m/N(D)$ при γ -облучении наблюдали в экспериментах на бактериальных клетках многие авторы с использованием различных тестов: образования реверсий к прототрофности по триптофану, аргинину, треонину и метионину, гистидину [2, 3]. Применяемые дозы облучения, как правило, были невелики, например, в [3] наиболее высокая доза составляла 130 Гр.

Наряду с линейным характером зависимости $N_m/N(D)$ некоторыми авторами был выявлен и ее степенной вид. Так, в [4] у клеток дикого типа, с одной стороны, наблюдали линейную дозовую зависимость по выходу аргининовых ревертантов, с другой — квадратичную зависимость по частоте мутирования к резистентности к стрептомицину. Квадратичная дозовая зависимость $N_m/N(D)$ по образованию триптофановых реверсий у *E. coli* WP-2 была обнаружена в [5]. Аналогичные результаты получены и в экспериментах по выявлению прямых мутаций в регуляторном *lacI*-локусе лактозного оперона *E. coli* [6], а также прямых мутаций устойчивости к рифампицину [7].

Мутагенное действие плотноионизирующих излучений изучено слабо. Первое исследование, как указывалось выше, было проведено А. С. Кривским на бактериях с α -частицами радона. Автор сделал вывод о том, что при облучении увеличивается число клеток, дающее начало новым расам, причем это увеличение идет прямо пропорционально дозе облучения. Лишь при больших дозах, инактивирующих более 99 % всех клеток, прямая пропорциональность нарушается. Дирингом [8] с использованием пучков ускоренных тяжелых ионов было изучено мутагенное действие излучений, различающихся по ЛПЭ в широком диапазоне (от 0,25 до 340 кэВ/мкм). Определялась частота реверсий к прототрофности по триптофану у клеток *E. coli*. Было установлено, что зависимость N_m/N от дозы является линейной для всех видов излучений и их относительная биологическая эффективность близка к единице для всех типов использованных частиц, за исключением ускоренных ионов кислорода, для которых значение ОБЭ составляло 0,23. При изучении реверсий к дикому типу амбер-мутантов E51 фага T4, облученных частицами с различной ЛПЭ (от 10 до 230 кэВ/мкм) и γ -излучением ^{60}Co , был выявлен линейный характер зависимости частоты образования ревертантов от дозы всех использованных в экспериментах излучений [9, 10]. Аналогичные результаты получены и на бактериях при учете реверсий к прототрофности у трех ауксотрофных по триптофану, лизину и тирозину линий *E. coli* В/г. Во всех случаях относительная биологическая эффективность излучений с разной ЛПЭ по их мутагенному влиянию на клетки была меньше единицы и снижалась по мере возрастания ЛПЭ.

Мутагенное влияние излучений широкого диапазона ЛПЭ на клеточные фаги λ_{11} и C_D изучено в [11]. При облучении фага λ_{11} γ -излучением ^{60}Co наблюдали степенной вид зависимости выхода мутаций от дозы облучения, трансформирующийся в линейный при увеличении ЛПЭ излучений (для ионов углерода и неона). Частота образования мутаций при действии тяжелых ионов при одинаковых уровнях выживаемости клеток оказалась в 1,5–2 раза меньше по сравнению с γ -излучением. При облучении клеток *Bacillus subtilis* ускоренными ионами неона, ксенона и урана различных энергий было обнаружено [12], что прямые мутации устойчивости к азиду натрия не индуцируются под действием частиц с энергией меньше 1 МэВ/нуклон. При увеличении скорости частиц частота образования мутаций возрастает. Авторы делают вывод о том, что ускоренные тяжелые ионы оказывают свое мутагенное воздействие посредством возникающих в их треках δ -электронов. Во всех случаях отмечен линейный характер зависимости $N_m/N(D)$. Линейные дозовые зависимости выхода гистидиновых ревертантов к прототрофности выявлены у штамма TA2638 клеток *Salmonella* при γ -облучении и действии ускоренных ионов аргона. Величина ОБЭ в этом случае составила 0,5. Дозы облучения, использованные в экспериментах, не превышали 20 Гр.

Таким образом, в ранних работах по определению зависимости частоты мутирования бактериальных клеток от дозы ионизирующих излучений с различной ЛПЭ были выявлены как линейные, так и степенные зависимости. Эти обстоятельства поставили вопрос о дальнейшем изучении закономерностей и механизмов мутагенного действия излучений широкого диапазона ЛПЭ на бактериальные клетки. Для этих целей в ОИЯИ была разработана программа, имеющая целью изучение механизмов индуцированного мутационного процесса в клетках прокариот при действии ускоренных тяжелых ионов, генерируемых ускорителями ОИЯИ.

1.1. Закономерности индукции прямых мутаций lac^- , $tonB^-$, $colB^-$ у клеток *E. coli* при действии излучений с разной ЛПЭ. Изучение закономерностей и механизмов образования генных мутаций осуществлялось с использованием методов выявления как прямых, так и обратных мутаций. При определении lac -мутантов у различных штаммов бактерий *E. coli* [13, 14] был использован модифицированный авторами тетразолиевый метод, позволяющий четко идентифицировать мутантные колонии. Растущие на полной питательной среде (содержащей пептон) клетки *E. coli* восстанавливают бесцветный тетразолий до ярко-красного формазана. При низких значениях pH при сбраживании лактозы биологическое восстановление тетразолия подавляется. В результате на такой среде (в присутствии лактозы) колонии lac^+ имеют белый цвет, а колонии lac^- — ярко-красный. Поскольку классический тетразолиевый метод не позволял вести учет мутантных колоний при высокой плотности посева (более 1500 клеток на чашку Петри, так как в этом случае не срабатывает индикаторная реакция), метод был усовершен-

ствован авторами с использованием посева клеток в слой мягкого агара, а также в виде «бутербродного посева». Последняя модификация метода позволяет определять наличие мутантных колоний при посеве до $2 \cdot 10^4$ клеток на чашку.

Полученные авторами дозовые зависимости выхода мутаций при γ -облучении клеток свидетельствовали о линейно-квадратичном характере кривых доза–эффект (рис. 1) и были аппроксимированы либо степенной, либо линейно-квадратичной функцией

$$N_m/N(D) = kD^\chi, \quad (1)$$

$$N_m/N(D) = (aD + \beta D)^2, \quad (2)$$

где D — доза облучения. Поскольку в логарифмическом масштабе зависимость (1) линейна, показатель степени этого уравнения определяется как наклон зависимости $\ln(N_m/N(D))$. Наклон дозовой кривой частоты мутирования составил $\chi = 1,82 \pm 0,30$, что свидетельствует о квадратичном характере зависимости $N_m/N(D)$, и ее можно аппроксимировать квадратичной функцией. На основании полученных данных был сделан вывод о том, что в области доз облучения, достигающих 10^3 Гр, дозовая зависимость $N_m/N(D)$ носит квадратичный характер. Линейный компонент этой зависимости не является нулевым, однако он проявляется при облучении дозами менее 10^2 Гр. Так, при дозе 100 Гр вклад линейного компонента в общий выход мутантов составляет примерно 50 %, при дозе 10 Гр — уже 90 %. Очевидно, что в экспериментах по изучению радиационно-индуцированного мутагенеза у клеток, облученных дозами, не превышающими 10^2 Гр, можно получить зависимости, близкие к линейным.

Таким образом, при определении прямых lac^- -мутаций у γ -облученных клеток *E. coli* были выявлены зависимости линейно-квадратичного типа. В области доз облучения, не превышающих 10^2 Гр, дозовые кривые мутагенеза описывались линейной функцией. С возрастанием дозы, достигающей 600 Гр, зависимость имеет вид степенной функции, близкой к квадратичной. Это обстоятельство является весьма важным, поскольку может отражать разные клеточные механизмы, вовлекаемые в реализацию индуцированного мутационного процесса.

При действии на клетки ускоренных тяжелых заряженных частиц ход кривых $N_m/N(D)$, отражающий мутагенную эффективность излучений, различен (рис. 1). Поскольку зависимости не являются линейными, их можно анализировать на основе уравнений (1), (2). Наиболее простым вариантом линейного представления этих зависимостей является изображение их в логарифмическом масштабе (рис. 1, б). Наклон прямых в этом случае равен параметру χ уравнения (1), а положение линии определяется параметром k . Значения наклонов, вычисленные для разных типов излучений, не различа-

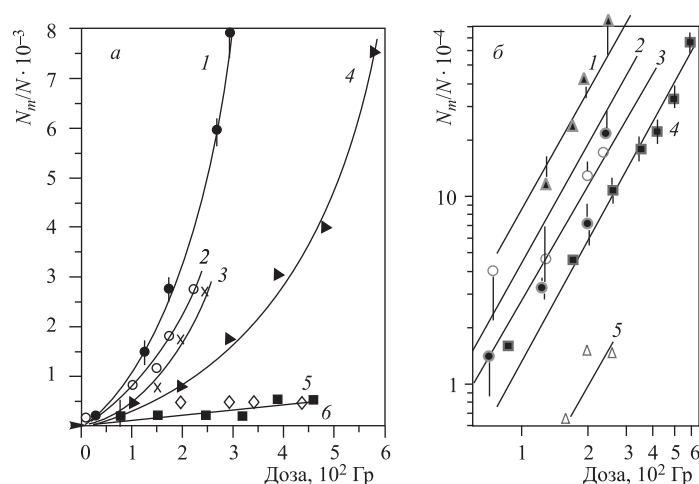


Рис. 1. Индукция прямых мутаций $Lac^+ \rightarrow lac^-$ у клеток *E. coli* при действии ускоренных тяжелых ионов: 1 — ^4He (22 кэВ/мкм); 2 — ^4He (54 кэВ/мкм); 3 — ^4He (72 кэВ/мкм); 4 — γ -кванты; 5, 6 — ^{12}C (220 и 320 кэВ/мкм). а) Линейный масштаб; б) логарифмический масштаб

ются между собой и примерно равны двум. С учетом того, что характер кривых $N_m/N(D)$ не меняется с увеличением ЛПЭ излучений и эта зависимость близка к квадратичной для использованных в экспериментах видов излучений, можно легко определить величину ОБЭ тяжелых заряженных частиц. Она вычисляется как соотношение доз при одинаковой частоте мутирования клеток: $\text{ОБЭ} = D_\gamma/D_i$, где D_γ и D_i — дозы γ -излучения и тяжелых заряженных частиц соответственно при любых исследованных уровнях частоты мутирования. Коэффициенты ОБЭ частиц с различными ЛПЭ приведены в табл. 1, откуда видно, что максимальной биологической эффективностью обладают ускоренные ионы гелия с ЛПЭ, равной 22 кэВ/мкм, и минимальной — ионы углерода.

Сравнительное изучение закономерностей индукции генных tonB^- и colB^- , а также структурных мутаций $\text{tonB}^- \text{trp}^-$ у клеток *E. coli* при действии излучений с разной ЛПЭ было выполнено в [15, 16]. Как известно, *E. coli* имеет энергозависимую систему активного транспорта через внешнюю мембрану, состоящую из белков TonB, ExbB, ExbD. TonB-белок взаимодействует с внешними мембранными рецепторными белками, которые выполняют высокоспецифическое связывание и энергозависимый перенос различных субстратов в периплазматическое пространство. Эти субстраты либо не могут проникать через пориновые каналы, либо необходимость активного транс-

Таблица 1. Относительная биологическая эффективность и значения параметра χ при облучении клеток *E. coli* HfrH излучениями с разной ЛПЭ по критерию индукции lac^- -мутантов

Вид излучения	ЛПЭ, кэВ/мкм	Энергия, МэВ/нуклон	Мощность дозы, Гр/с	χ	ОБЭ
γ -излучение ^{137}Cs	0,3	—	0,43	$1,9 \pm 0,3$	1
^4He	22	8,0	1,5	$2,9 \pm 0,9$	$2,3 \pm 0,3$
^4He	54	2,5	1,5	$1,9 \pm 0,5$	$1,6 \pm 0,2$
^4He	72	1,7	1,5	$2,1 \pm 0,5$	$1,3 \pm 0,2$
^{12}C	220	7,0	1,5	—	$1,16 \pm 0,05$

порта обусловлена их низкой концентрацией во внешней среде. В отсутствие TonB-белка мембранные рецепторные белки могут связываться с субстратом, но не в состоянии осуществить активный трансмембранный транспорт. TonB-белок также взаимодействует с некоторыми колицинами и бактериофагами T1 и $\varphi 80$. EhbV- и EhbD-белки в этой системе выполняют вспомогательные функции, облегчая активный транспорт, а также осуществляют стабилизацию TonB. Показано, что мутации в этих генах приводят к снижению активности TonB, но не к полной ее потере (клетки остаются чувствительными к фагу $\varphi 80$, колицинам B и D). Установлено, что TonB-ген имеет четко выраженную доменную структуру. Мутации, ведущие к изменению аминокислотной последовательности в положении 1–70, приводят к устойчивости к бактериофагам T1 и $\varphi 80$, изменения в положении 107–181 приводит к устойчивости к колицинам ColB, D и M. Все перечисленные выше особенности TonB-мутантов и наличие близко расположенного trp-оперона позволяют, используя в качестве селективных факторов вирулентный бактериофаг $\varphi 80$ и колицины ColB, D, M и ColI, а также определяя ауксотрофность к триптофану, выделять клетки с большими делециями, затрагивающими tonB-ген и trp-оперон. В экспериментах при изучении формирования прямых генных мутаций исследовали закономерности образования мутантов tonB^- и colB^- при действии излучений широкого диапазона ЛПЭ [15, 16].

На рис. 2 и 3 представлены зависимости частоты мутирования генов tonB и colB от дозы γ -излучения, ускоренных ионов гелия с различной энергией и ионов углерода у клеток *E. coli* X7026. Как можно видеть, для всех использованных видов излучений наблюдается степенная зависимость частоты образования tonB- и colB-мутаций от дозы. В логарифмическом масштабе (рис. 3) дозовые зависимости представляют собой прямые с тангенсом угла наклона $\chi = 1,7–1,8$ (табл. 2), что свидетельствует о квадратичном характере этих зависимостей. Наиболее высокая эффективность в индукции мутаций наблю-

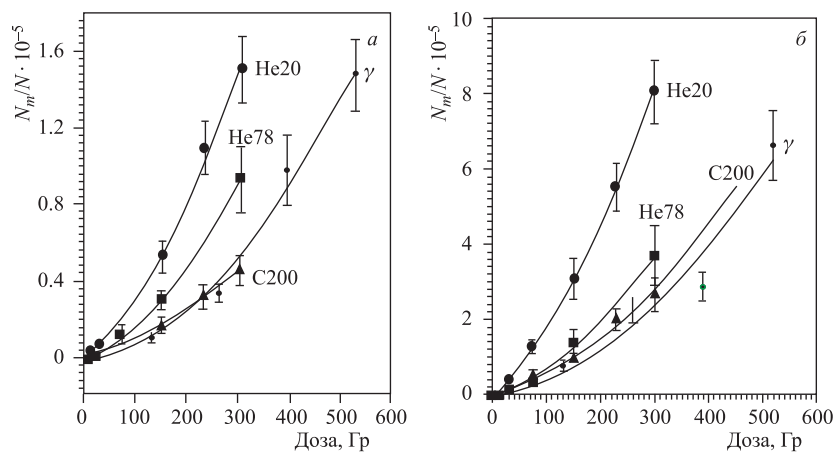


Рис. 2. Частота образования мутаций $tonB^-$ (а) и $colB^-$ (б) при действии излучений с разной ЛПЭ (He20, He78, C200 обозначают, соответственно, величину ЛПЭ тяжелых заряженных частиц). Линейный масштаб

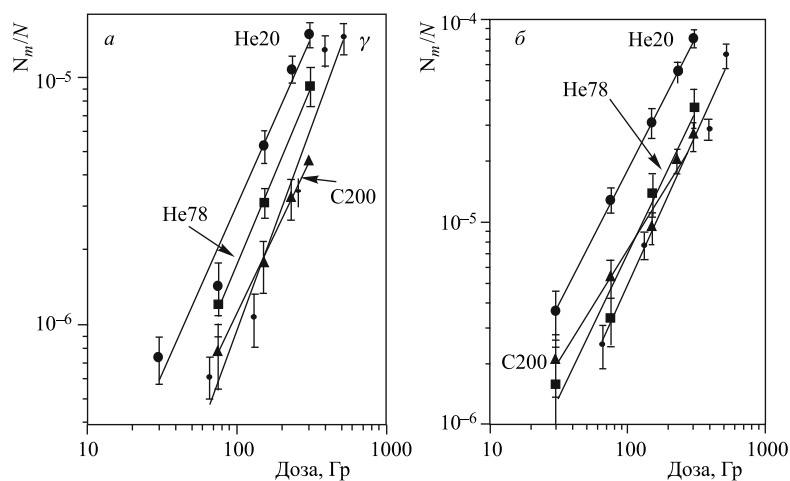


Рис. 3. Частота образования мутаций $tonB^-$ (а) и $colB^-$ (б) при действии излучений с разной ЛПЭ (He20, He78, C200 обозначают, соответственно, величину ЛПЭ тяжелых заряженных частиц). Логарифмический масштаб

дается в экспериментах с ускоренными ионами гелия с ЛПЭ = 20 кэВ/мкм. При действии ионов гелия с ЛПЭ = 78 кэВ/мкм и ускоренных ионов углерода мутагенная эффективность снижается.

Таблица 2. Относительная биологическая эффективность и значения параметра χ при облучении клеток *E. coli* X7026 излучениями с разной ЛПЭ по критерию индукции tonB⁻ и colB⁻-мутантов

Вид излучения	ЛПЭ, кэВ/мкм	Энергия, МэВ/нуклон	Мощность дозы, Гр/с	χ	ОБЭ
tonB ⁻ -мутации					
γ -излучение ¹³⁷ Cs	0,3	—	0,43	1,8 ± 0,2	1
⁴ He	20	8,0	1,5	1,7 ± 0,1	2,2 ± 0,2
⁴ He	78	1,7	1,5	1,7 ± 0,2	1,5 ± 0,1
¹² C	200	7,5	1,5	1,7 ± 0,3	1,1 ± 0,1
colB ⁻ -мутации					
γ -излучение ¹³⁷ Cs	0,3	—	0,43	1,8 ± 0,2	1
⁴ He	20	8,0	1,5	1,8 ± 0,2	2,6 ± 0,3
⁴ He	78	1,7	1,5	1,8 ± 0,1	1,4 ± 0,1
¹² C	200	7,5	1,5	1,7 ± 0,2	1,2 ± 0,1

Таким образом, при изучении закономерностей образования прямых мутаций в различных локусах клеток *E. coli*, вызванных действием излучений широкого диапазона ЛПЭ, установлено, что дозовая зависимость частоты мутирования клеток имеет линейно-квадратичный характер. Квадратичная зависимость наблюдается до доз порядка 600–700 Гр, линейный компонент проявляется при облучении дозами менее 100 Гр. При облучении клеток частицами с возрастающими значениями ЛПЭ была выявлено, что характер зависимости частоты мутирования от дозы облучения не меняется с ростом ЛПЭ, но изменяется лишь относительная биологическая эффективность излучений.

1.2. Закономерности индукции обратных мутаций his⁻ → His⁺ у клеток *Salmonella typhimurium* и *Bacillus subtilis* при действии излучений с разной ЛПЭ. Закономерности образования обратных (his⁻ → His⁺) мутаций у бактерий *Salmonella typhimurium* (штаммы Эймса) при действии излучений широкого диапазона ЛПЭ были изучены в [17]. Как известно, штаммы Эймса представляют собой специально сконструированные линии *Salmonella typhimurium*, обладающие высокой чувствительностью к ДНК-повреждающим физическим факторам и ДНК-тропным химическим агентам. В работе были использованы штаммы TA98 (сдвиг рамки считывания), TA100 (транзиция С → Т), TA102 (транзиция Т → С). Последний штамм несет ochre-мутацию — TAA — в hisG-гене. Мутация hisG 428 введена в плазмиду, и в результате этого в клетке имеется в среднем 30 копий мутантного гена, имею-

шего возможность ревертирования. Было установлено, что ревертирование $his^- \rightarrow His^+$ происходит непосредственно в месте мутации, а не является результатом возникновения *ochre*-супрессорных реверсий. У клеток *Salmonella typhimurium* SOS-ответ происходит, как показано в [18], аналогично SOS-ответу у *E. coli*.

В экспериментах с тяжелыми заряженными частицами при малых дозах облучения (до 15 Гр), как и при γ -облучении, были выявлены линейные дозовые зависимости частоты образования реверсий. У штамма TA98 эффективность индукции мутаций излучениями с возрастающими значениями ЛПЭ

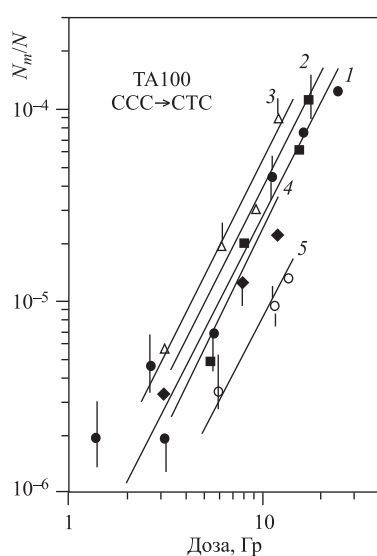


Рис. 4. Зависимость частоты мутирования штамма Эймса TA100 от дозы различных видов излучений: 1 — γ -излучение; 2 — дейтроны 5 кэВ/мкм; 3 — дейтроны 11,5 кэВ/мкм; 4 — ^4He , 22 кэВ/мкм; 5 — ^4He , 83 кэВ/мкм. Пояснения в тексте

~ 70 кэВ/мкм наблюдалось снижение генетической эффективности тяжелых ионов и сближение ОБЭ для всех использованных в экспериментах штаммов. Аналогичная зависимость ОБЭ (ЛПЭ) для клеток *Salmonella typhimurium* была получена в [19].

Наряду с клетками *Salmonella typhimurium* с использованием ускорителей тяжелых ионов ОИЯИ были изучены закономерности образования обратных

снижалась и при действии частиц с ЛПЭ, равными 72 кэВ/мкм, не отличалась от спонтанного уровня. Генетическая эффективность тяжелых заряженных частиц для всех использованных в экспериментах штаммов при малых дозах облучения (до 15 Гр) была меньшей, чем при γ -облучении. При высоких дозах облучения частота образования реверсий в зависимости от дозы γ -облучения и при действии ускоренных тяжелых ионов описывалась функцией, близкой к квадратичной (рис. 4). Характер дозовых кривых не менялся с ростом ЛПЭ частиц, а отмечался лишь параллельный сдвиг этих кривых относительно зависимости при γ -облучении. Это обстоятельство позволяет вычислить коэффициенты ОБЭ тяжелых ионов по мутагенному эффекту. Для штамма TA98 была выявлена ниспадающая зависимость ОБЭ (ЛПЭ), а для штаммов TA100 и TA102 — зависимости с локальным максимумом. Максимальные значения ОБЭ получены при ЛПЭ, равных 10–15 кэВ/мкм, составляющие 1,4 и 1,6 для штаммов TA100 и TA102 соответственно. При возрастании ЛПЭ частиц до

($his^- \rightarrow His^+$) мутаций в вегетативных клетках *Bacillus subtilis* при действии излучений широкого диапазона ЛПЭ. Исследования такого рода представляют интерес, поскольку результаты, полученные в [20], свидетельствуют о существенных различиях в закономерностях мутагенных эффектов облучения бактериальных клеток и спор *Bacillus subtilis*. При анализе полученных нами данных о характере дозовых кривых частоты мутирования $his^- \rightarrow His^+$ вегетативных клеток и спор *B. subtilis* обращают на себя внимание различия в характере зависимостей $N_m/N(D)$ для этих двух случаев. Полученные результаты свидетельствуют о том, что для вегетативных клеток характерна линейно-квадратичная зависимость мутагенеза (рис. 5, а). При дозах облучения, соответствующих значениям до ~ 100 Гр, дозовая зависимость аппроксимируется линейной функцией. Это отчетливо видно из материалов, представленных на рис. 5, б. При более высоких уровнях доз кривая близка к квадратичной.

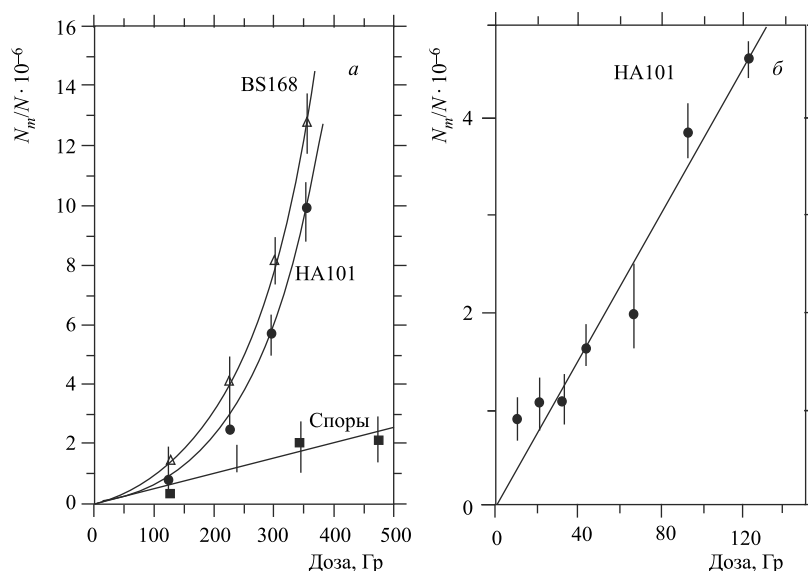


Рис. 5. Зависимость частоты мутирования $his^- \rightarrow His^+$ вегетативных клеток HA101, BS168 и спор HA101 от дозы γ -облучения

Квадратичный характер кривых $N_m/N(D)$ при достаточно высоких дозах облучения сохраняется и при действии ускоренных тяжелых ионов (рис. 6). Как можно видеть из представленных материалов, облучение клеток ионами гелия с ЛПЭ, равными 22, 42 и 72 кэВ/мкм, выявляет зависимости, близкие к квадратичным функциям. Коэффициенты ОБЭ частиц с указанными значени-

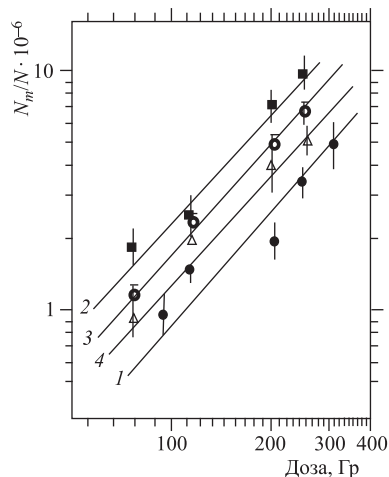


Рис. 6. Зависимость частоты мутирования $his^- \rightarrow His^+$ клеток *Bacillus subtilis* NA101 от дозы облучения γ -квантами (1) и ионами гелия с разной ЛПЭ (2 — 22 кэВ/мкм; 3 — 42 кэВ/мкм; 4 — 72 кэВ/мкм)

ями ЛПЭ соответственно составляют $1,8 \pm 0,2$, $1,7 \pm 0,2$ и $1,3 \pm 0,1$ (табл. 3). Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что индукция реверсий у вегетативных клеток *B. Subtilis*, так же как и у клеток *Salmonella typhimurium* при действии излучений с разной ЛПЭ, характеризуется теми же особенностями, которые свойственны прямым генным мутациям. Данные о характере зависимости ОБЭ от ЛПЭ излучений, полученные при выявлении прямых и обратных мутаций у клеток *E. coli*, *Salmonella typhimurium* и *Bacillus subtilis*, суммированы на рис. 7.

Таким образом, мутагенное действие излучений с разной ЛПЭ на бактерии *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, вегетативные клетки *B. subtilis* характеризуется следующими особенностями. Во-первых, дозовые кривые мутагенеза при действии излучений широкого диапазона

Таблица 3. Относительная биологическая эффективность и значения параметра χ уравнения (2) при облучении клеток *Bacillus subtilis* излучениями с разной ЛПЭ

Вид излучения	ЛПЭ, кэВ/мкм	Энергия, МэВ/нуклон	χ	ОБЭ
γ -излучение ^{137}Cs	0,3	—	$2,3 \pm 0,3$	1
^4He	22	1,5	$2,1 \pm 0,2$	$1,8 \pm 0,2$
^4He	42	3,5	$1,8 \pm 0,2$	$1,7 \pm 0,2$
^4He	72	1,7	$1,7 \pm 0,3$	$1,3 \pm 0,1$

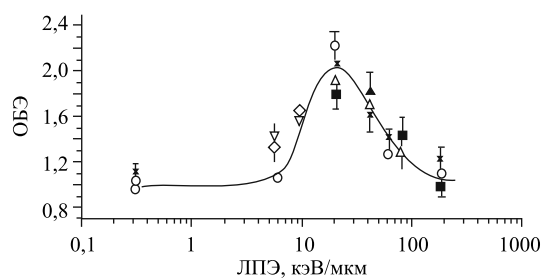


Рис. 7. Зависимость ОБЭ от ЛПЭ излучений по критерию индукции прямых (темные символы) и обратных (светлые символы) генных мутаций у клеток *E. coli*

ЛПЭ имеют линейно-квадратичный вид; во-вторых, характер дозовых зависимостей сохраняется при возрастании ЛПЭ излучений; в-третьих, ОБЭ тяжелых заряженных частиц с увеличением ЛПЭ возрастает до значений $\cong 20\text{--}30$ кэВ/мкм, а затем снижается при дальнейшем возрастании ЛПЭ излучений.

Для объяснения квадратичных зависимостей предположили [21], что в формировании начального премутационного события участвуют два независимых повреждения на комплементарных нитях ДНК, не слишком сильно смещенных один относительно другого. Суть предложенного механизма сводится к следующему. Эндонуклеазы, делая рядом с повреждением надрезы, дают возможность экзонуклеазам осуществить деградацию нити ДНК, которая приводит к возникновению широких брешей. Если в пределах брешки на комплементарной цепи окажется второе повреждение, не подвергнутое инцизии, то ДНК-полимераза по поврежденному основанию может с определенной вероятностью подставить неправильное основание. Затем второе повреждение будет подвергнуто эксцизии и по ошибочному основанию вновь отрепарированного оппозитного участка ДНК подставлено комплементарное ошибочное. В результате этого мутация закрепится. На основе развитых представлений можно удовлетворительно объяснить имеющиеся в литературе данные, однако им противоречат следующие обстоятельства. Во-первых, при тех дозах, при которых реализуется квадратичная зависимость, величина деградации ДНК, судя по выходу первичных повреждений ДНК, должна составлять примерно 10^5 нуклеотидов [14]. И если летальное действие излучений, согласно [21], обусловлено перекрывающимися участками расчистки в комплементарных нитях ДНК, то кривые выживания должны быть ярко сигмоидными с большими экстраполяционными числами. Однако при γ -облучении клеток *E. coli* часто наблюдаются экспоненциальные кривые выживания. Кроме того, известно, что первичные повреждения ДНК быстро репарируются. Так, по данным [22], число одонитевых разрывов, возникающих в результате инцизии поврежденных оснований, начинает нарастать уже через 2 с после γ -облучения и достигает максимума через 20–40 с. Выход выявляемых этим методом ферментлабильных сайтов превышает выход первичных одонитевых разрывов (ОР) ДНК. Образовавшиеся в результате инцизии ОР ДНК восстанавливаются репарацией *roIA*-зависимого типа, и их небольшая доля (менее 10 %) — медленной *recA-lexA*-зависимой репарацией. Взаимодействовать между собой два премутационных повреждения в соответствии с механизмом, предложенным в [21], могут в процессе репарации медленного типа. Поэтому можно ожидать, что во время экзонуклеазной расчистки большая часть повреждений ДНК будет уже отрепарирована быстрым типом репарации. Для получения необходимого соответствия предложенного объяснения экспериментальным данным требуется допустить размер деградации ДНК, достигающий 10^5 нуклеотидов и более. Однако у клеток дикого типа такой

степени деградации ДНК не наблюдается. Во-вторых, известно, что у *гесВ*-, *гесС*-штаммов частота УФ-индуцированного мутагенеза не меняется по сравнению с клетками дикого типа. У этих мутантов блокирована, как известно, экзонуклеаза V, ведущая деградацию на большое расстояние. Вследствие этого механизм «взаимодействия двух повреждений» не может реализоваться.

В [23] для объяснения квадратичной зависимости $N_m/N(D)$ была предложена гипотеза SOS-мутагенеза, согласно которой для формирования мутации необходимы два условия: возникновение премутационного повреждения в конкретном гене, за которым ведется наблюдение, и образование повреждения, запускающего мутагенную репарационную систему клетки. При этом второй «удар» может произойти в любом участке генома, и тем не менее он может «провзаимодействовать» с премутационным повреждением. Такой подход примерно на три порядка снижает требования к выходу премутационных повреждений для получения необходимого соответствия предложенного механизма экспериментальным данным. Этот механизм нашел подтверждение в [24], где было показано, что предварительное облучение клеток небольшой дозой УФ- или γ -излучения изменяет вид кривой $N_m/N(D)$ и в определенном диапазоне доз облучения квадратичная зависимость $N_m/N(D)$ трансформируется в линейную. Однако данной гипотезе противоречит тот факт, что квадратичная зависимость $N_m/N(D)$ при γ -облучении наблюдается в некоторых случаях при очень высоких дозах облучения, а максимальный SOS-ответ клеток, оцениваемый по некоторым критериям, может достигаться уже при дозах, равных нескольким десяткам Гр [25]. В связи с этим обстоятельством возникает необходимость детального изучения закономерностей SOS-реакции клеток в ответ на действие излучений с разными физическими характеристиками.

1.3. Закономерности SOS-ответа бактерий *E. coli* при действии излучений с разной ЛПЭ. Для исследования закономерностей SOS-ответа клеток при действии излучений с разной ЛПЭ в [14, 26] был использован метод SOS-хромотеста, разработанный Гофнунгом и Киллардетом и основанный на специально сконструированном штамме PQ37. Этот штамм является конститутивным по синтезу щелочной фосфатазы, что существенно для корректной оценки SOS-реакций клеток. SOS-хромотест основан на колориметрическом определении активности β -галактозидазы и щелочной фосфатазы после инкубации клеток в присутствии тестируемого агента. Активность β -галактозидазы тесно связана с активностью гена *su1A*, которая, в свою очередь, контролируется LexA-репрессором. В нормальном *lacZ*-локусе у штамма PQ37 имеется делеция. Мутации *uvrA* и *rfa* увеличивают чувствительность теста к некоторым мутагенам. Механизм реализации SOS-хромотеста заключается в следующем. После повреждения ДНК происходит образование RecA-протеазы, которая расщепляет LexA-репрессор, запирающий у клеток PQ37 транскрипцию *lacZ*-локуса. Происходит синтез β -галактозидазы, кото-

рая определяется после лизиса клеток расщеплением β -галактозидной связи у орто-нитро-фенил- β D-галактопиранозиде (ОНФГ). Активность щелочной фосфатазы определяется добавлением пара-нитро-фенилфосфата (ПНПП). Интенсивность возникающей желтой окраски определяется на спектрофотометре.

Активность синтезируемых клетками ферментов определяется в зависимости от концентрации (или дозы) потенциального мутагена. Так как некоторые агенты при увеличении их концентрации блокируют синтез белков, производится мониторинг общего синтеза белка определением активности щелочной фосфатазы (р). Этот фермент не синтезируется при SOS-индукции. Поскольку общее угнетение синтеза белка снижает активность β -галактозидазы, необходимо проводить нормировку на стандартную скорость синтеза белков. Поэтому в качестве меры SOS-индукции принято соотношение активности β -галактозидазы и щелочной фосфатазы. Мерой SOS-индукции при определенной дозе служит фактор индукции $IF = \beta/p(D)$; $\beta/p = 0$. Характеристикой эффективности мутагена является начальный наклон зависимости $IF(D)$, который был назван SOSIP. Зависимость параметра IF от дозы γ -облучения представлена на рис. 8.

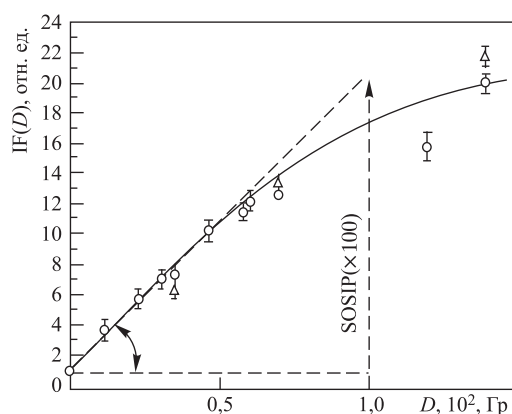


Рис. 8. Зависимость фактора индукции $IF(D)$ от дозы γ -облучения. Наклон этой зависимости характеризует эффективность ДНК-повреждающего агента в индукции SOS-системы

Зависимость SOSIP от ЛПЭ излучений приведена на рис. 9, откуда следует, что с возрастанием ЛПЭ значения SOSIP также увеличиваются и достигают при ЛПЭ, равной примерно 50 кэВ/мкм, максимума. Максимальное значение SOSIP составляет $\sim 0,4 \text{ Гр}^{-1}$, и это значение в 2,5 раза больше, чем полученное при γ -облучении клеток на поверхности агара. При дальнейшем возрастании ЛПЭ значения SOSIP уменьшаются и при ЛПЭ = 300 кэВ/мкм

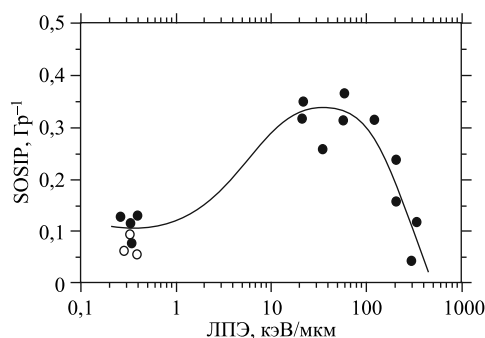


Рис. 9. Зависимость величины SOSIP от ЛПЭ излучений. Облучение клеток в суспензии (светлые кружки) и на поверхности агара (темные кружки)

составляют значение, меньше наблюдаемого при γ -облучении клеток в суспензии. Таким образом, можно сделать вывод, что с возрастанием ЛПЭ излучений интенсивность SOS-ответа клеток увеличивается.

Зависимость интенсивности SOS-ответа бактерий *E. coli* от ЛПЭ излучений была исследована и другими методами. В [27, 28] был применен метод SOS-люкс-тест, основанный на использовании рекомбинантных клеток *E. coli*, способных к SOS-индуцибельной биолюминесценции. Такую способность они приобретают после трансформации их специально сконструированной плазмидой rPLS-1, несущей люциферазный оперон светящихся бактерий *Photobacterium leiognathi* и находящийся под контролем SOS-индуцибельного промотора *sda*-гена плазмиды ColD. Количественным показателем SOS-индукции в данном методе является световой выход, который может быть измерен на люминометре в течение короткого времени. Этот метод не требует разрушения клеток, поэтому позволяет исследовать эффективность SOS-ответа при действии различных ДНК-повреждающих факторов в режиме реального времени. Он успешно может быть использован для изучения влияния на SOS-индукцию различных белков, контролируемых, в частности, другие пути репарации. Для этого не требуется создания новых штаммов с мутацией в соответствующем гене, поскольку репортерный компонент с биолюминесцентной системой находится на плазмиде, которая может быть трансформирована в любой из имеющихся мутантных штаммов.

На рис. 10 представлены кинетические кривые фактора индукции для клеток *E. coli* дикого типа С600, облученных различными видами ионизирующих излучений. Видно, что кинетика SOS-ответа клеток при облучении тяжелыми заряженными частицами в значительной степени сходна с кинетикой этого процесса при действии γ -квантов. В качестве показателя эффективности SOS-индукции, так же как и при применении метода SOS-хромотеста,

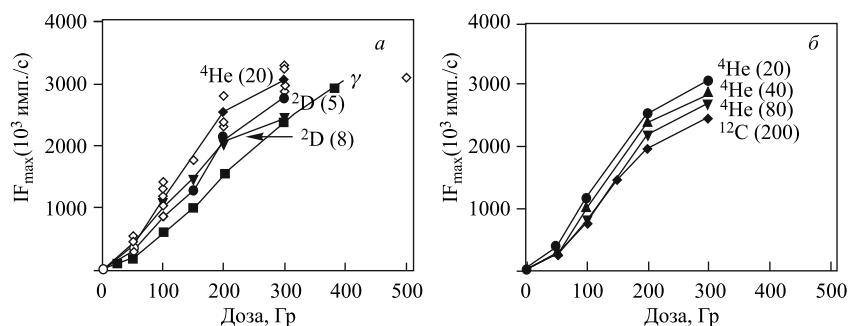


Рис. 10. Зависимость фактора индукции от дозы различных видов излучений. В скобках приведены значения ЛПЭ частиц, кэВ/мкм

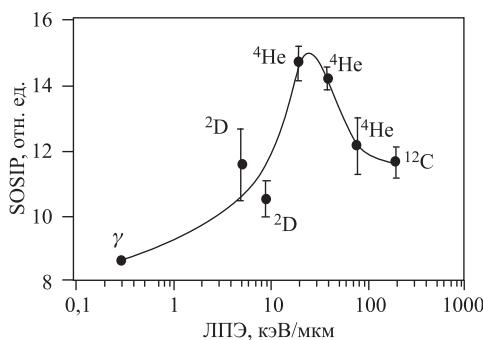


Рис. 11. Зависимость величины SOSIP от ЛПЭ излучений

использован тангенс угла наклона нарастающего участка дозовой кривой — SOSIP. Зависимость SOSIP от ЛПЭ излучений представлена на рис. 11. Из представленных материалов видно, что с ростом линейной передачи энергии эффективность SOS-индукции возрастает и достигает своего максимального значения при действии ионов гелия с ЛПЭ 20 кэВ/мкм, что в 1,7 раза превышает значение SOSIP для γ -квантов. Дальнейшее увеличение ЛПЭ приводит к снижению эффективности SOS-ответа.

Одним из способов исследования реакций SOS-системы клеток *E. coli* является изучение закономерностей индукции профага λ , поскольку она находится под контролем генов, участвующих в осуществлении репарации медленного типа. Воздействие разнообразных ДНК-тропных агентов, а также задержка репликации ДНК у клеток *E. coli* вызывают комплексный ответ, который включает такие проявления, как повышение частоты мутирования, задержку клеточного деления и индукцию лямбдоидных профагов. Все эти реакции клеток рассматриваются как интегральный SOS-ответ. Централь-

ную роль в SOS-индукции играет RecA-белок, который, как уже указывалось выше, в определенных условиях приобретает протеазные свойства и расщепляет LexA-репрессор, а также репрессоры фагов P22 и λ -репрессор. Расщепление LexA- и λ -репрессоров происходит между аминокислотами Ala-Gly. Инактивация репрессора λ ведет к дерепрессии промотора P_R гена *cro*, с которого начинается транскрипция всего профагового генома и литический цикл развития бактериофага λ . У лизогенных по фагу λ штаммов *E. coli* об экспрессии SOS-системы можно судить, изучая закономерности индукции профага λ , так как репрессор профага расщепляется RecA-белком в результате приобретения им протеазных свойств. Расщепление репрессоров LexA и λ RecA-белком имеет разную кинетику. Известно, что LexA-репрессор расщепляется легче. Важным здесь является также то, что индукция профага происходит лишь в том случае, когда уровень концентрации репрессора снижается до 90 %. Для этого, по-видимому, требуется значительное количество RecA-белка в протеазной конформации, что может иметь место при задержке репарации ДНК. Необходимо также учитывать то обстоятельство, что транскрипция генов А-профага происходит намного позже по сравнению с транскрипцией других генов SOS-системы. Все эти факты могут свидетельствовать о том, что индукция бактериофага λ происходит параллельно процессам, приводящим к гибели клеток.

В [29] изучены закономерности индукции профага λ у клеток *E. coli* излучениями широкого диапазона ЛПЭ. Поскольку с увеличением ЛПЭ излучений изменяется спектр индуцируемых повреждений ДНК, меняется и эффективность индукции SOS-системы. Вместе с тем объем и кинетика индукции разных генов, находящихся под контролем SOS-системы, различаются между собой. Существенно различаются между собой LexA- и λ -репрессоры, расщепление которых происходит по разной кинетике. На рис. 12 приведена

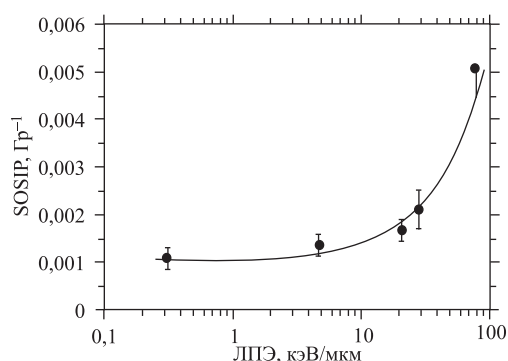


Рис. 12. Зависимость SOS-ответа клеток *E. coli* по критерию индукции профага λ от ЛПЭ излучений

зависимость SOSIP от ЛПЭ, полученная по критерию индукции профага λ . Видно значительное увеличение SOSIP с ростом ЛПЭ излучений. По сравнению с облучением γ -квантами при значениях ЛПЭ, равных 0,3 кэВ/мкм, величина SOSIP заметно увеличивается при возрастании ЛПЭ. Дозы облучения, при которых SOS-ответ индуцируется в определенном количестве клеток (например, 63 %) и выявляется методами SOS-хроматеста и по индукции профага, различны. Они составляют примерно 50 Гр для метода SOS-хроматеста и 1000 Гр для индукции профага, т.е. различаются больше чем на порядок [14]. Это обстоятельство свидетельствует о том, что разные индуцибельные опероны различаются по кинетике индукции.

Таким образом, результаты исследований с использованием разных методов (SOS-хроматест, SOS-люкс-тест, индукция профага λ) закономерностей индукции SOS-системы бактерий *E. coli* при действии излучений широкого диапазона ЛПЭ показывают, что SOS-ответ клеток с ростом ЛПЭ частиц возрастает до значений ЛПЭ, равных ~ 30 –80 кэВ/мкм, а затем снижается при дальнейшем возрастании ЛПЭ частиц.

1.4. Закономерности индукции делеционных мутаций у клеток *E. coli* излучениями с разной ЛПЭ. При решении проблемы генетических эффектов тяжелых заряженных частиц крайне важными представляются сравнительные данные о закономерностях и механизмах возникновения генных и структурных мутаций. До последнего времени закономерности образования структурных мутаций у бактерий при действии ускоренных тяжелых ионов не были исследованы. Мы уже упоминали, что у клеток высших эукариот изучение дозовых зависимостей выхода точковых и структурных мутаций при действии ионизирующих излучений широкого диапазона ЛПЭ является весьма непростой задачей, требующей привлечения сложных молекулярно-биологических методов, выполнения большого объема работ. Получение такого рода информации значительно облегчается в экспериментах на клетках прокариот. Среди подходов к изучению данной проблемы следует отметить методы, основанные на определении делеций непосредственно в бактериальной хромосоме, а также на изучении формирования делеций в искусственно сконструированных (с использованием плазмид и эписом) тест-системах. Весьма удобным локусом для изучения формирования делеционных мутаций в бактериальной хромосоме оказались два фланкирующих гена: *tonB* и *trp*. Исследования, касающиеся закономерностей индукции делеционных мутантов *tonB⁻trp⁻* при действии излучений широкого диапазона ЛПЭ, были выполнены в [30, 31].

На рис. 13 представлена зависимость частоты образования мутаций *tonB⁻trp⁻* от дозы различных видов излучений: γ -квантов, ускоренных ионов гелия с разной ЛПЭ (20, 50 и 78 кэВ/мкм), а также ускоренных ионов углерода с ЛПЭ, равной 200 кэВ/мкм. Как можно видеть из материалов, в исследованном диапазоне доз частота образования делеционных мутаций ли-

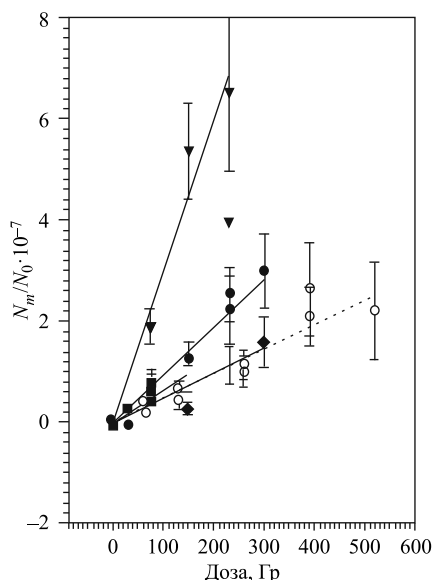


Рис. 13. Зависимость частоты образования мутаций tonB trp^- от дозы излучения с разной ЛПЭ (○ — γ -лучи; ● — ионы He (20 кэВ/мкм); ▼ — ионы He (50 кэВ/мкм); ■ — ионы He (78 кэВ/мкм); ◆ — ионы ^{12}C (200 кэВ/мкм))

в отличие от генных мутаций. Образование делеций у бактерий *E. coli* связывается с формированием двунитевых разрывов ДНК. В [32] была определена зависимость между репарацией γ -индуцированных ДР ДНК и индукцией длинных делеций в специально сконструированной с использованием эписомы, интегрированной в бактериальную ДНК, системе. Было показано,

нейно возрастает с дозой для всех видов использованных в экспериментах излучений. Следует заметить, что наклоны полученных дозовых зависимостей для γ -квантов и тяжелых заряженных частиц различны. Наибольшей эффективностью по частоте индукции делеционных мутаций обладают ионы гелия с ЛПЭ = 50 кэВ/мкм (табл. 4). Ускоренные ионы углерода вызывают меньший биологический эффект. Следовательно, характер дозовых зависимостей по критерию индукции делеционных мутаций у клеток *E. coli* совершенно отличается от ранее рассмотренных нами зависимостей, полученных для генных мутаций. В последнем случае для всех использованных излучений был выявлен степенной, близкий к квадратичному, характер зависимости $N_m/N(D)$.

Дозовые зависимости индукции делеционных мутаций, описываемые линейными функциями, обусловлены другими механизмами их формирования

Таблица 4. Относительная биологическая эффективность тяжелых заряженных частиц с разной ЛПЭ при облучении клеток *E. coli* X7026 по критерию индукции делеционных мутантов $\text{tonB}^- \text{trp}^-$

Вид излучения	ЛПЭ, кэВ/мкм	Энергия, МэВ/нуклон	Мощность дозы, Гр/с	ОБЭ
γ -излучение ^{137}Cs	0,3	—	0,43	1
^4He	20	8,0	1,5	$1,8 \pm 0,2$
^4He	50	3,8	1,5	$3,2 \pm 0,3$
^4He	78	1,7	1,5	$1,3 \pm 0,1$
^{12}C	200	7,5	1,5	$1,1 \pm 0,1$

что в диапазоне доз 25–200 Гр частота образования делеций линейно возрастает с дозой облучения, как и индукция ДР ДНК. В то же время дозовая зависимость мутаций типа замены оснований и «сдвига рамки считывания» описывается нелинейной функцией. 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 повреждения оснований, а двунитевые разрывы ДНК. Для реализации премутационных повреждений данного типа в структурную мутацию не требуется индукция системы SOS-репарации, которая играет ключевую роль, как мы указывали ранее, в формировании генных мутаций.

Линейный тип дозовых зависимостей для делеционных мутаций позволяет вычислить коэффициенты ОБЭ для этого типа мутаций. На рис. 14 приведены зависимости ОБЭ от ЛПЭ частиц для различных радиационно-индуцированных эффектов: летального действия излучений, индукции генных и делеционных мутаций. Как видно из представленных материалов, все зависимости описываются кривыми с локальным максимумом. При этом необходимо заметить, что положение максимумов для исследуемых эффектов облучения не является инвариантным. Это важное обстоятельство требует специального рассмотрения, и его анализ мы проведем ниже. Линейный тип дозовых зависимостей для делеционных мутаций обусловлен линейным характером выхода ДР ДНК для всех использованных видов излучений и отсутствием влияния на характер формирования данного типа мутаций индуцибельной, склонной к ошибкам SOS-репарации. Различие в характере премутационных повреждений для генных и структурных мутаций отражается на характере зависимостей ОБЭ (ЛПЭ). Возрастание коэффициентов ОБЭ для генных му-

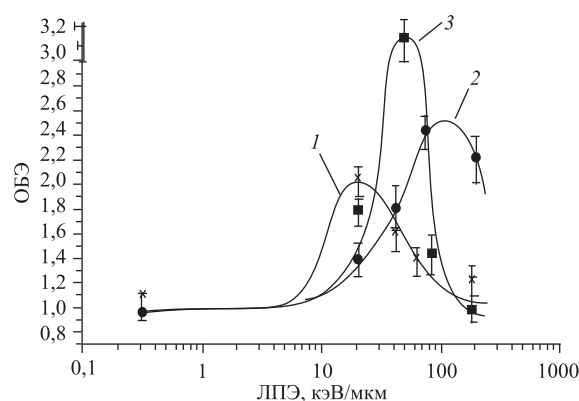


Рис. 14. Зависимость ОБЭ от ЛПЭ излучений по критерию индукции tonB-мутаций (1), летальному действию (2) и образованию tonVtrp⁻-делеций (3)

таций связано с увеличением выхода кластерных повреждений с возрастанием ЛПЭ частиц. Это же обстоятельство обуславливает и повышение значений ОБЭ излучений для делеционных мутаций, поскольку с возрастанием ЛПЭ увеличивается выход и ДР ДНК. Различается лишь положение максимумов зависимостей, выявленных для генных и структурных мутаций. Максимальные значения для генных мутаций выявляются при ЛПЭ ≈ 20 кэВ/мкм, а для структурных мутаций — при ЛПЭ ≈ 50 кэВ/мкм.

1.5. Закономерности эксцизии транспозонов в клетках *E. coli* при действии излучений с разной ЛПЭ. Среди широкого спектра повреждений генетических структур, вызываемых ионизирующей радиацией, особое место, как уже указывалось выше, занимают структурные мутации, затрагивающие обширные области генома. Они включают такие нарушения структуры хромосомы, как делеции, инсерции и транслокации последовательностей ДНК. В клетках *E. coli* структурные мутации с высокой частотой возникают при транспозиции мобильных элементов. Транспозиция индуцируется химическими мутагенами, ультрафиолетовым светом, ионизирующей радиацией. Точная эксцизия транспозонов является SOS-индуцибельным процессом, осуществляемым по «мишенному механизму». Стрессовые состояния бактериальных клеток, индуцирующие SOS-ответ, 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 клеток прокариот с использованием генетических систем, сконструированных на основе транспозонов [33]. 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: *uvr* и *recN* [34]. Точная эксцизия транспозона, происходящая в условиях SOS-ответа, является классическим делеционным процессом, который осуществляется при участии небольших палиндромных последовательностей и поэтому может являться модельной системой для определения закономерностей формирования делеций в бактериальных клетках. В отличие от генных структурные мутации у клеток прокариот, как мы указывали выше, формируются в результате возникновения двунитевых разрывов ДНК. Соотношение выходов прямых ДР как результат разрыва оппозитных нитей ДНК при прохождении ионизирующей частицы и энзиматических ДР, возникающих в ходе SOS-репарации, может обуславливать специфику образования мутаций делеционного типа при действии излучений с разной ЛПЭ. С учетом этого исследование эксцизии транспозонов при действии излучений широкого диапазона ЛПЭ может дать важную информацию об особенностях индукции структурных мутаций у бактерий ионизирующими излучениями с разными физическими характеристиками.

Механизм формирования делеций в этом случае основан на модели «ошибочного спаривания» и включает в себя рекомбинационные процессы [35]. Формирование делеций происходит *hcsA*-зависимо при действии γ -излучения, а спонтанные делеции не зависят от функций гена *hcsA*. До 20 Гр частота выхода делеций линейно возрастает с дозой γ -облучения. Такая же зависимость наблюдается для относительной частоты эксцизии транспозона Tn10 в данном диапазоне доз. Механизм формирования делеций включает *hcsF*-зависимую мисматч-репарацию и *hcsBCD*-рекомбинационную репарацию двунитевых разрывов ДНК. При этом мишенные делеции, которые образуются в активном локусе между прямыми повторами, формируются с участием *hcsF*-механизма [36], а немишенные являются следствием *hcsBCD*-зависимой репарации ДНК [32]. Точная эксцизия мобильного элемента относится к делеционным событиям и основывается на сходных молекулярно-генетических закономерностях. В рамках модели индуцированной точной эксцизии транспозона возможны два механизма реализации этого явления: SOS-индуцированный механизм, реализуемый на основе репарационно-рекомбинационных процессов в облученных клетках *E. coli*, и механизм точной эксцизии элемента при транспозиции элемента в новое положение.

Сравнительное изучение биологической эффективности излучений широкого диапазона ЛПЭ по критерию летального действия и точной эксцизии транспозона Tn10 было проведено в [37] с использованием ускоренных ионов гелия и углерода. На основании исследований выявлено, что коэффициенты ОБЭ, рассчитанные по критерию летального действия, увеличиваются с ростом ЛПЭ и достигают максимального значения, равного $1,9 \pm 0,5$, при облучении ионами гелия с ЛПЭ ≈ 100 кэВ/мкм (рис. 15). Дальней-

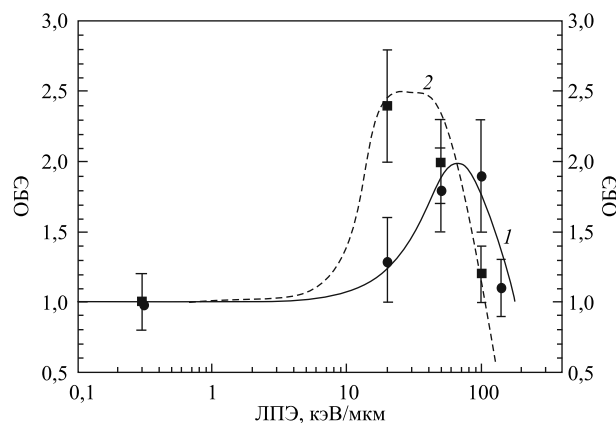


Рис. 15. Зависимости относительной биологической эффективности от ЛПЭ излучений: 1 — по критерию летального эффекта; 2 — по критерию точной эксцизии транспозона Tn10

шее увеличение ЛПЭ приводит к снижению величины ОБЭ. Так, при облучении ионами углерода с ЛПЭ = 200 кэВ/мкм величина ОБЭ составляет $1,1 \pm 0,4$. Коэффициенты ОБЭ по критерию точной эксцизии транспозона Tn10 имеют максимальные значения при облучении ионами гелия с ЛПЭ 20 кэВ/мкм. Далее с ростом ЛПЭ эффективность уменьшается, причем минимальное значение эффективности, полученное для ионов углерода с ЛПЭ 200 кэВ/мкм, ниже наблюдаемого при γ -облучении. Анализируя зависимости, представленные на рис. 15, можно заметить, что обе зависимости имеют локальный максимум в определенном диапазоне доз. 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. Следовательно, максимальные значения ОБЭ по критерию эффективности точной эксцизии Tn10 сдвинуты в область меньших ЛПЭ.

2. МЕХАНИЗМЫ МУТАГЕННОГО ДЕЙСТВИЯ ИЗЛУЧЕНИЙ С РАЗНОЙ ЛПЭ НА БАКТЕРИАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ

Результаты, полученные при исследовании закономерностей индукции прямых и обратных мутаций у клеток *E. coli*, *B. subtilis*, *Salmonella typhimurium* излучениями широкого диапазона ЛПЭ, свидетельствуют о том, что для всех видов излучений наблюдается степенная зависимость частоты образования генных мутаций от дозы облучения. В логарифмическом масштабе дозовые зависимости представляют собой прямые с величиной тангенса угла наклона, близкой к значениям, равным 1,7–2, что свидетельствует о квадратичном характере этих зависимостей. На основании этого можно прийти к заключению о том, что для образования точковых мутаций необходима реализация двух независимых друг от друга событий «попадания». Первое из них связано с возникновением премутационного повреждения в изучаемом локусе, а второе — с образованием повреждения, индуцирующего систему SOS-репарации, которая и способствует закреплению изменения в бактериальной ДНК в виде мутаций. С учетом этого SOS-репарацию можно рассматривать как решающий фактор в реализации индуцированного мутационного процесса. В [38] была разработана молекулярная модель формирования генных мутаций у бактерий *Escherichia coli* при действии ионизирующих излучений. Главные ее положения, базирующиеся на экспериментально полученных данных, сводятся к следующему.

2.1. Молекулярная модель образования генных мутаций у клеток *Escherichia coli*. Известно, что индуцированный мутационный процесс у *E. coli*

определяется комплексом генных продуктов, синтезируемых в ходе SOS-ответа. Как показали исследования последних лет, важнейшими из них являются белки, осуществляющие umuDC-зависимый синтез ДНК по матрице, содержащей повреждения (translesion synthesis — TLS). В ходе этого процесса закрепляется большинство мутаций при действии излучений и ДНК-тропных химических агентов [39]. Учитывая ключевую роль SOS-системы в реализации индуцированного мутационного процесса у бактерий *E. coli*, рассмотрим основные пути формирования SOS-ответа клеток при действии ДНК-повреждающих факторов и молекулярные механизмы, лежащие в основе формирования мутаций. Согласно результатам современных исследований SOS-регулон клеток *E. coli* включает в себя более 40 индуцибельных генов, в том числе гены *recA*, *lexA*, *umuDC*, *polB*, *recN*, *sulA*, *uvrA*, *uvrB*, *uvrD* и ряд других [40]. Одним из проявлений SOS-ответа является запуск склонной к ошибкам репарации повреждений ДНК, в результате чего премутационные повреждения ДНК фиксируются в мутации. Этот процесс нуждается в работе генов $umuD^{+}C^{+}$ и $recA^{+}$ и позволяет клетке отрепарировать повреждения ДНК, которые не могли быть восстановлены системами безошибочной репарации. В данном случае ДНК-полимераза, ведущая репаративный синтез протяженных гэпов, встречая на оппозитной нити нерепарированное повреждение, преодолевает его, подставляя напротив такого повреждения некомплементарное основание.

У клеток *E. coli* регуляция SOS-ответа осуществляется, как известно, двумя основными генами: *recA* и *lexA*. Ген *lexA* находится на 92 мин генетической карты клеток *E. coli*. Его кодирующая часть включает в себя 606 нуклеотидных пар. В операторной области этого гена имеется два сайта для репрессора. LexA-протеин состоит из 202 аминокислот, и приблизительно в срединной его части имеется последовательность аминокислот –Ala–Gly–, где происходит спонтанное и протеолитическое расщепление LexA-белка. Этот белок является репрессором промоторов индуцибельных оперонов и, взаимодействуя с определенными сайтами («SOS box») этих промоторов, мешает связыванию РНК полимеразы с промоторами соответствующих генов [41]. Ген *recA* находится на 58 мин генетической карты и состоит из 1059 пар нуклеотидов. Продукт этого гена — RecA-белок — состоит 353 аминокислот. N-концевая область RecA-белка обеспечивает белок-белковые взаимодействия, а C-концевая область определяет связывание этого белка с ДНК. RecA-протеин играет ключевую роль в осуществлении гомологичной рекомбинации, осуществлении различных путей репарации повреждений ДНК, включая обширные пробелы нитей ДНК, двунитевые разрывы ДНК, реализации SOS-мутагеназа. Взаимодействуя с одонитевой ДНК, RecA-белок образует спиральные многомерные нуклеопротеиновые филаменты вокруг одонитевой ДНК, приобретая протеазную конформацию и способность расщеплять LexA-репрессор, становясь копротеазой [42]. Уменьшение пула LexA-белка

приводит к максимальному выражению функций индуцибельных оперонов. Механизм образования однонитевых пробелов, с которыми взаимодействует RecA-белок, приобретая протеазную конформацию, до настоящего времени окончательно не выяснен. При действии ультрафиолетового света (УФ) пробелы являются следствием прерывистого синтеза ДНК из-за наличия перед репликативной вилкой индуцированных УФ фотопродуктов. Вновь синтезированная ДНК в данном случае содержит пробелы, которые ДНК-полимераза III оставляет на оппозитной нити напротив повреждений. Было показано, что существенную роль в формировании SOS-сигнала в этом случае играет RecBCD-ферментный комплекс, участвующий в реализации следующей цепи событий: остановка репликации → образование ДР ДНК → RecBCD-зависимая деградация одной из нитей ДНК → образование протяженного пробела ДНК [43]. RecBCD-комплекс обладает геликазной и экзонуклеазной активностями, и для связывания с ДНК ему необходим ДР ДНК с тупыми концами. В ходе продвижения по ДНК комплекс расплетает и деградирует обе нити до тех пор, пока не достигнет Chi-последовательности. Одна такая последовательность (5'GCTGGTGG3') приходится в среднем на каждые 5000 нуклеотидов. После этого экзонуклеазная активность комплекса инактивируется, а геликазная активность позволяет сформировать однонитевой 3'-конец, с которым связывается RecA-белок, образуя нуклеопротеиновые филаменты. Если RecBCD-комплекс встречает Chi-последовательность с 5'-конца, а также если на данном участке ДНК Chi-последовательности отсутствуют, то возникает обширная деградация ДНК, репарируемая далее с участием ДНК-полимеразы III. Этот процесс сопровождается генерированием SOS-сигнала вследствие геликазной и экзонуклеазной активностей RecBCD-комплекса. При действии ионизирующих излучений необходимые для рекомбинационного восстановления синтеза ДНК и формирования SOS-сигнала двунитевые концы могут возникать при коллапсе репликативных вилок, когда они достигают области однонитевого разрыва. Анализ молекулярной природы повреждений ДНК, запускающих SOS-ответ клеток при действии плотноионизирующих излучений с разной ЛПЭ с использованием различных методических подходов — SOS-хромотеста [26] индукции λ -профага [28], SOS-люкс-теста [29], позволил прийти к заключению о том, что ими являются преимущественно кластерные повреждения ДНК, репарируемые с участием медленной recA-lexA-зависимой репарации. В процессе репарации таких повреждений происходит значительная деградация ДНК, осуществляемая RecBC-экзонуклеазой, в результате чего образуются протяженные однонитевые пробелы [14]. Таким образом, при действии на клетки *E. coli* излучений различной природы для формирования SOS-сигнала необходимо возникновение однонитевой ДНК, которая формируется в клетках различными путями в зависимости от характера воздействующего излучения. Степень связывания LexA-белка с промоторами индуцибельных оперонов различна. Например, связывание репрессора с

оператором гена *sulA*, участвующего в регулировании клеточного деления, относительно тесное. И для индукции SulA-белка необходимо уменьшить концентрацию LexA-репрессора до более низкого уровня, чем это необходимо, например, для синтеза RecA-белка. Еще более тесная связь у этого репрессора с UmuCD-опероном [44]. С другой стороны, ген, кодирующий *uvrABC*D-эндонуклеазу, весьма непрочно репрессирован LexA-белком, и конститутивный уровень этого фермента высок.

Как известно, SOS-система является саморегулирующейся системой, имеющей обратную связь. Предложен ряд моделей, описывающих ее работу [45, 46]. Ключевыми генами в регуляции работы этой системы являются гены *recA* и *lexA* и конститутивный уровень кодируемых ими продуктов. Белок LexA, запирая промоторы индуцибельных оперонов, поддерживает синтез кодируемых ими белков на низком уровне. Базальный уровень RecA-белка поддерживается примерно на уровне 800–1200 молекул на клетку. В присутствии RecA-протеазы происходит расщепление LexA-репрессора и репрессоров других индуцибельных оперонов. Повышение концентрации RecA-белка приводит к дерепрессии прежде всего тех генов, с операторами которых LexA-репрессор связан менее тесно. В процессе SOS-ответа клетка восстанавливается от различных нарушений, вызванных ДНК-повреждающими агентами. Вместе с тем в результате SOS-репарации в клетке возникают мутации. Это является результатом работы склонной к ошибкам («error-prone repair») ветви индуцибельной SOS-репарации. Индуцибельный *umuDC*-зависимый TLS-механизм играет важнейшую роль в индукции мутаций у бактерий *E. coli*, а многие его черты имеют место и у клеток эукариот [47]. Молекулярный вес белков UmuD и UmuC у клеток *E. coli* составляет порядка 15 и 45 кДа соответственно, и они играют ключевую роль при осуществлении механизма TLS. RecA-протеаза также исключительно важна в ходе реализации механизма TLS. Она расщепляет UmuD-белок, так же как и LexA, переводя его в активную UmuD'-форму. UmuD'-белок тесно связывается с UmuC-протеином в стабильный UmuD'2C-комплекс. Этот комплекс обладает выраженной полимеразной активностью [47]. В отличие от ДНК-полимеразы III UmuD'2C-комплекс, названный ДНК-полимеразой V, преодолевает различные ДНК-аддукты, делая ошибочные подстановки оснований [48]. В экспериментах *in vitro* с использованием специально сконструированной плазмиды, имеющей большие гэпы и несущей сайт-специфические повреждения, было показано [47], что UmuC-белок обладает слабой полимеразной активностью. Однако при добавлении протеинов UmuD', RecA и SSB ДНК-полимеразная активность UmuC резко возрастает и белок эффективно осуществляет репликативный синтез по сайтам с отсутствующими основаниями (45 % сайтов в течение 6 мин). Среди подставляемых оснований, оппозирующих абазическим сайтам, в этих экспериментах преобладал аденин (69 %), гуанин же составлял величину порядка 31 %. В отличие от этого

ДНК-полимераза III преодолевала абазические сайты с существенно меньшей эффективностью — путем перескакивания через повреждение. В результате данного процесса возникали 1 frame shift mutations — мутации типа «сдвига рамки считывания», с потерей одного основания.

Комплекс UmuC, UmuD', RecA, SSB, как указывалось, преодолевал сайты в экспериментах *in vitro* репликативным путем, подставляя, как правило, аденин оппозитному сайту. При этом комплекс UmuC, UmuD', RecA, SSB при прохождении репликации через поврежденные сайты не нуждался в участии какой-либо субъединицы ДНК-полимеразы III. Было также показано [49], что участие ДНК-полимеразы III или некоторых ее субъединиц приводит к повышению эффективности TLS. Это может реализовываться либо на стадии инициации TLS, либо этот фермент способствует протягиванию комплекса UmuC, UmuD', RecA, SSB через сайты с повреждениями. В других экспериментах, также проведенных *in vitro*, было установлено [50], что в процессе работы ДНК-полимеразы V возникают точковые мутации с частотой $2,1 \cdot 10^{-4}$ на нуклеотид, что в 40 раз выше, чем это происходит с участием ДНК-полимеразы III. Спектр мутаций в ходе работы ДНК-полимеразы V представлен преимущественно трансверсиями (53%). В этих исследованиях было показано, что ДНК-полимераза V может вести ошибочный синтез на неповрежденной матрице, реализуя мутационный процесс немишенного типа. Установлено, что ДНК-полимераза V представляет собой гетеротример, состоящий из одной молекулы UmuC и двух молекул UmuD' (UmuD2'C) [51]. Следует заметить, что хотя синтез UmuC- и UmuD-белков находится под сильным негативным контролем LexA-репрессора, тем не менее эта репрессия не является полной и в клетке имеется некоторый конститутивный уровень этих белков [52]. Активация белка UmuD в UmuD' RecA-протеазой сходна с механизмом расщепления LexA-репрессора. UmuD и UmuD' образуют гомодимер, но в реакционной смеси они ведут себя как гетеродимер, и UmuD'-протеин становится чувствительным к сериновой протеазе ClpXP. Деградация мутагенной активности UmuD'-субъединицы и снижение активности ДНК-полимеразы V позволяет клетке вернуться в стационарное состояние и репарировать повреждения безошибочными путями репарации. Было показано [51], что в комплексе UmuD2'C протеин UmuD' может замещаться при определенных условиях на UmuD. Такой обмен субъединицами между UmuD2'C и UmuD обеспечивает клетке биологически важный способ выключения ошибочного пути репарации в процессе реализации механизма TLS и подобным образом позволяет снижать шанс возникновения мутаций на неповрежденной матрице в ходе SOS-ответа. ДНК-полимераза V, как уже указывалось, *in vivo* работает в комплексе с RecA-белком, SSB-белками и другими кофакторами [53]. В отсутствие RecA-белка ДНК-полимераза V не может катализировать TLS. RecA-белок увеличивает активность ДНК-полимеразы V более чем в 300 раз. В [54] было показано, что две молекулы RecA-белка, взаимодействуя с ДНК-

полимеразой V, образуют минимальную мутасому и напрямую активируют комплекс UmuD2'С.

Таким образом, квадратичный характер кривых мутагенеза при действии ионизирующих излучений с разными физическими характеристиками отражает сложную цепь событий, в результате которых происходит «взаимодействие» двух независимых актов передачи энергии: возникновение премутационного повреждения в исследуемом гене и повреждения, запускающего SOS-ответ клетки. Вероятность закрепления премутационного повреждения в мутацию будет определяться, с одной стороны, характером премутационного повреждения, с другой стороны — влиянием на него SOS-индуцибельных механизмов. В цикле работ, посвященных особенностям мутагенного действия ионизирующих излучений с разными физическими характеристиками на бактериальные клетки [14], было показано, что премутационные повреждения в ходе индуцированного излучениями с разной ЛПЭ мутационного процесса — это кластерные повреждения ДНК. Такими повреждениями являются одномоментно возникающие в процессе передачи энергии излучениями сочетанные повреждения, включающие повреждения оснований, возникновение апуриновых/апиримидиновых сайтов, одностранных разрывов на одной или оппозитных нитях ДНК, модификации сахара [55, 56].

Микродозиметрические расчеты, выполненные в [55], показали, что выход кластерных повреждений ДНК возрастает с увеличением ЛПЭ частиц, достигает максимума, а затем уменьшается. При этом положение максимума не является инвариантным для различных сочетаний одномоментно возникающих повреждений. Более «легкие» повреждения, включающие в себя небольшое число модифицированных сайтов, описываются кривыми, максимум которых лежит в области 40–50 кэВ/мкм, более «тяжелые» повреждения, затрагивающие и оппозитную нить ДНК, описываются кривыми с максимумом, сдвинутым в область больших значений ЛПЭ.

В последнее время предприняты попытки молекулярного моделирования повреждений ДНК кластерного типа и исследования закономерностей их репарации у клеток *E. coli* и клеток млекопитающих. Такие повреждения могут превращаться из нелетальных и потенциально мутагенных повреждений в двунитевые разрывы ДНК, приводящие к летальному событию [57]. В экспериментах *in vitro* с использованием плазмид, несущих повреждения в виде урациловых гликолей, расположенных на различных расстояниях в оппозитных нитях ДНК, была продемонстрирована [58] разная вероятность превращения таких повреждений в ДР ДНК. Было показано, что в ходе репарации такого рода повреждений урациловые гликоли, тесно расположенные друг с другом в оппозитных нитях ДНК в пределах ≥ 2 пар оснований, трансформируются в ДР. Увеличение расстояния между такими повреждениями до ≤ 7 пар оснований также приводило к возникновению двунитевого разрыва, но с меньшей вероятностью. Возникновение одиночного урацилового

сайта в использованной авторами системе и конвертация его в АП-сайт или нуклеотидный пробел не приводило к существенному нарушению транскрипции или к аберрантному синтезу белка. Увеличение расстояния между двумя урациловыми гликолями до ≥ 13 пар оснований (в пределах 13–33 пар) позволяло в такой системе полностью репарировать вызванные повреждения. Хотя кластерные повреждения ДНК, вызываемые ионизирующими излучениями, в большей степени индуцируются тяжелыми заряженными частицами, электромагнитные виды ионизирующих излучений (γ -кванты, рентгеновские лучи, тормозное излучение) могут также вызывать образование кластерных повреждений ДНК. Это обусловлено особенностями передачи энергии медленных электронов атомам среды.

При действии γ -излучения отдельные акты передачи энергии в среде возникают случайно и независимо друг от друга, за исключением актов ионизации, осуществляемых очень медленными электронами с энергией менее 1000 эВ. Электрон с энергией 200 эВ может вызывать в весьма ограниченном объеме образование 2–3 пар ионов. Расчеты, выполненные в [59], показывают, что электроны с энергией ~ 750 эВ на расстоянии 40 нм образуют около 20 пар ионов. Удельное количество медленных электронов увеличивается с уменьшением энергии излучения. Например, для тормозного излучения электронов с энергией 30 МэВ их доля составляет $\sim 5\%$, а для 250 кэВ рентгеновского излучения количество медленных электронов увеличивается до 12%. Для более мягких рентгеновских лучей можно ожидать большего удельного вклада в дозу таких электронов.

Таким образом, квадратичный характер кривых мутагенеза по критерию индукции генных мутаций может быть следствием реализации следующего механизма. Ионизирующие излучения, вызывая образование кластерных повреждений ДНК, в ряде случаев могут приводить к формированию специфических структурных нарушений участков ДНК. Тогда на одной нити формируется либо поврежденное основание, либо однонитевый разрыв с концевыми группами нелигазоспецифического типа ($3'PO_4-5'OH$; $3'OH-5'OH$; $3'OH-5'PO_4$ с пробелом нуклеотида). На оппозитной нити одновременно формируется поврежденное основание, несколько смещенное относительно первого повреждения. Поврежденные основания, как известно, удаляются из клетки механизмом эксцизионной репарации. Данный процесс складывается из нескольких этапов: инцизии поврежденного основания с разрывом главной цепи валентности со стороны $5'$ -конца, экзонуклеазного выщепления поврежденного фрагмента ДНК, репаративного синтеза однонитевого участка по неповрежденной матрице комплементарного участка ДНК и воссоединения ресинтезированного участка с основной нитью ДНК. Инцизионное выщепление осуществляется при этом в два этапа. Первый из них связан с разрывом N-гликозидной связи между основанием и дезоксирибозой ДНК-N-гликозилазами, при этом высвобождается поврежденный нуклеотид

без нарушения целостности главной цепи валентности. Второй этап связан с действием на возникающий апуриновый/апириимидиновый сайт специфических АП-эндонуклеаз. Главными ферментами на этом этапе являются экзонуклеаза III и АП-эндонуклеаза IV [58], разрывающие фосфодиэфирную связь с 5'-стороны от АП-сайта. В эксцизионной репарации урациловых гликолей у клеток *E. coli*, например, два фермента инициируют процесс репарации: урацил-ДНК-гликозилаза (Ung) и двунитевая урацил-ДНК-гликозилаза (Dug), которая также известна как mismatch урацил-гликозилаза (Mug) 67. Ung-гликозилаза способна удалять урациловые гликоли из одно- и двунитевой ДНК и выщеплять их, если они находятся в спаренном состоянии с аденином либо с гуанином. Mug проявляет значительную активность, когда возникает пара 3,N4-этенцитозин : G, а также U : G или U : T в двунитевой ДНК. Она менее эффективна при удалении урацила из U : A-пар оснований. Таким образом, результатом действия специфических эндонуклеаз, осуществляющих инцизионный этап эксцизионной репарации, являются одностранные разрывы ДНК с концами 3'ОН–5'РО₄. Последние, в свою очередь, становятся субстратом для ДНК-лигазной, ДНК-полимеразной и экзонуклеазной активностей. При этом существует определенная конкуренция за субстрат между несколькими ферментными системами [60]. В связи с этим процесс репарации повреждений ДНК может рассматриваться как конкуренция двух альтернативных ферментных систем, осуществляющих деструкцию фрагмента ДНК, и систем, направленных на ресинтез поврежденных структур.

Последовательная цепь основных этапов репарации первичных повреждений: эндонуклеазная инцизия γ -сайтов — экзонуклеазная расчистка — полимеразный ресинтез поврежденного участка цепи — лигазное воссоединение ресинтезированного фрагмента, приводит к восстановлению целостности ДНК. Вместе с тем такая идеальная последовательность этапов репарации не всегда реализуется в клетке [60]. Репарационные ферменты могут действовать «некоординированно», и активность ресинтезирующих ферментов может отставать от интенсивной работы эндонуклеаз и процесса экзонуклеазной расчистки. Это может приводить к тому, что экзонуклеазные активности могут «перехватывать» концевые группы и экзонуклеазная деградация ДНК, осуществляемая экзонуклеазой V, может распространяться на значительные расстояния, приводя к возникновению обширных гэпов. Вследствие нескоординированного характера работы различных эндонуклеаз «узнавание» модифицированных оснований, расположенных на оппозитных нитях ДНК, должно быть не одновременным, а «растянуто» во времени. В этом случае при образовании ОР ДНК, когда концевые группы могут быть перехвачены экзонуклеазами и подвергнуты деградации с образованием гэпа, ДНК-полимераза при последующем ресинтезе фрагмента ДНК по комплементарной матрице встретит модифицированное основание. Такая же ситуация может возникнуть, когда кластерное повреждение включает в себя ОР ДНК, подвергаю-

щийся экзонуклеазной расчистке и модифицированное основание на противоположной нити ДНК. В этом случае поврежденное основание может быть преодолено в ходе ресинтеза поврежденного участка ДНК-полимеразами, модифицированными, как мы рассматривали выше, в процессе SOS-ответа. Таким образом, ошибочное основание может быть поставлено в ходе репаративного синтеза ДНК. В связи с этим важно заметить, что генные продукты $umuD^+C^+$ принимают активное участие в регуляции клеточного цикла [39]. Было показано, что UmuC- и интактный UmuD-белки оказывают ингибирующее влияние на репликацию ДНК при возникновении ДНК-повреждений. При активировании UmuD-белка RecA*-протеазой в UmuD'-протеин ингибирующий эффект репликативных процессов значительно усиливается. С учетом этого при индукции $umuD^+C^+$ -оперона, когда происходит ингибирование репликации ДНК, клетка получает, с одной стороны, возможность осуществить безошибочные репарационные процессы, например, с участием *roIA*-зависимых репарационных процессов. С другой стороны, если клетка не может быстро отрепарировать возникшие повреждения и повреждающий ДНК сигнал будет продолжать существовать в клетке, то RecA*-протеазная активность будет долго поддерживать процесс расщепления UmuD в UmuD' и стимулировать TLS-механизм [39]. В течение этого периода может происходить ошибочная репарация премутационных сайтов из кластерных повреждений ДНК с участием индуцибельного комплекса UmuD2'C–RecA*–SSB. Динамика расщепления UmuD-белка в активный UmuD'-протеин рассматривается авторами как проявление процесса, имеющего определенную аналогию с checkpoint регуляцией, которая наблюдается у клеток эукариот [61, 62].

Таким образом, квадратичный характер кривых мутагенеза, выявляемый в экспериментах по облучению клеток ионизирующей радиацией, есть отражение «взаимодействия» двух кластерных повреждений ДНК. С одной стороны, это возникновение премутационного повреждения в исследуемом гене, а с другой — повреждения гена, запускающего SOS-систему, в результате чего происходит дерепрессия индуцибельных оперонов, влияющих на вероятность закрепления премутационного повреждения в мутацию. Как мы показали выше, это влияние реализуется через образование мутагенного комплекса (ДНК-полимеразы V), способного вести репаративный синтез на матрице, содержащей повреждения. Основные пути формирования генных мутаций у клеток *E. coli* можно представить в виде следующей молекулярной модели (рис. 16).

При действии ионизирующего излучения в ДНК клеток, как известно, с некоторой частотой образуются прямые двунитевые разрывы (ПДР) ДНК, приводящие к летальному для клетки событию, и широкий спектр первичных повреждений ДНК (γ -сайты). Первичные γ -сайты включают в себя разрывы фосфодиэфирных связей с разными концевыми группами, модификации азотистых оснований, АП-сайты, сшивки ДНК–ДНК, ДНК–белок.

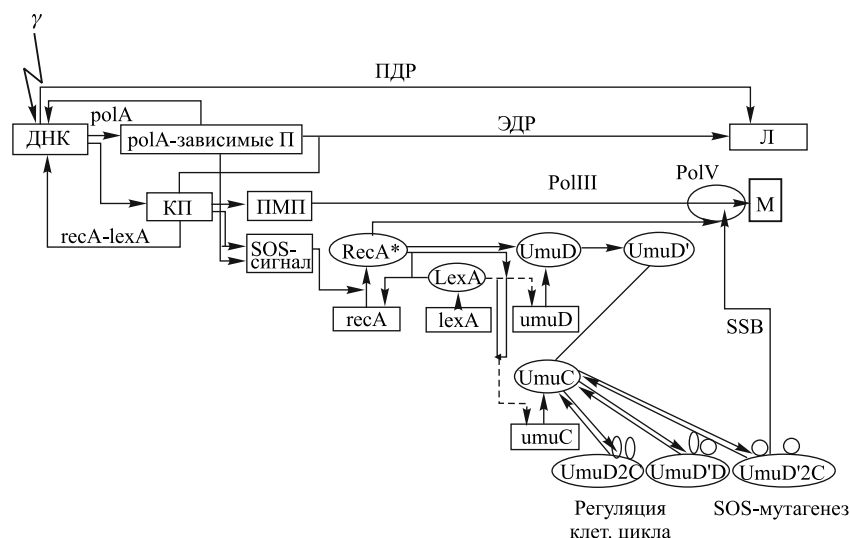


Рис. 16. Схема формирования генных мутаций у бактерий *E. coli* при действии ионизирующих излучений (пояснения в тексте)

ОР ДНК, имеющие концы 3'ОН–5'РО₄, восстанавливаются ДНК-лигазой. Разрывы с концевыми группами 3'РО₄–5'ОН, 3'ОН–5'ОН, а также ОР с лигазоспецифическими концами с пробелом нуклеотида восстанавливаются механизмом быстрой репарации ОР с участием ДНК-полимеразы I. Эксцизионная *polA*-зависимая репарация удаляет большую часть модифицированных оснований и репарирует АП-сайты. На долю *polA*-зависимой репарации (быстрый тип репарации ОР и эксцизионная репарация короткими фрагментами) приходится более 90% всех индуцируемых повреждений ДНК. Установлено, что *polA*-зависимая репарация, так же как и фотореактивация, является немутагенной [21], а вероятность встраивания ошибочного основания ДНК-полимеразой I крайне мала и составляет 0,001% при нормальных условиях. Среди индуцируемых ионизирующими излучениями повреждений ДНК значимое место занимают кластерные повреждения (КП), особенности формирования которых мы рассматривали ранее. Такие повреждения включают в себя различные комбинации нарушений структуры оснований на одной или опозитных нитях ДНК, разрывы главной цепи валентности, нарушения сахара. Как показано ранее [14], КП составляют основной класс премутационных повреждений (ПММ). С другой стороны, такие повреждения являются также и основным типом нарушений структуры ДНК, участвующим в формировании SOS-сигнала в облученных клетках.

Формирование SOS-сигнала также происходит и из части *rolA*-зависимых повреждений, которые не смогли быть восстановлены этим типом репарации и стали объектом атаки экзонуклеазных активностей различных ферментов. КП подвергаются медленной репарации с участием *hcsA-lexA*-генов. Из неотрепарированных данным типом репарации КП и повреждений, которые не смогли быть отрепарированы *rolA*-зависимой и *hcsA-lexA*-зависимой репарационными системами, формируются энзиматические двунитевые разрывы (ЭДР) ДНК. ЭДР вместе с ПДР ДНК являются летальными событиями для клеток [63]. Возникновение SOS-повреждения в клетке активирует конститутивный *RecA*-белок в *RecA*-протеазу (*RecA**). Повышение уровня *RecA*-протеазы приводит к дерепрессии индуцибельных генов, прежде всего генов *hcsA*, *umuD*, *umuC*, а также *lexA* и др. Увеличение экспрессии *lexA*-гена не приводит к повышению уровня *LexA*-белка, поскольку он сразу расщепляется *RecA*-протеазой [14]. *RecA*-протеаза в ходе SOS-ответа расщепляет *UmuD*-белок, переводя его в активную *UmuD'*-форму. *UmuD'* тесно связывается с *UmuC*-белком в стабильный *UmuD'2C*-комплекс (*Pol V*). Этот комплекс, обладая выраженной полимеразной активностью, преодолевает различные ДНК-аддукты, делая ошибочные подстановки оснований. Деградация мутагенной активности *UmuD'* субъединицы и снижение активности ДНК-полимеразы V позволяет клетке вернуться в стационарное состояние и репарировать повреждения безошибочными путями репарации. *UmuD2C*-комплекс, включаясь в регуляцию клеточного цикла, останавливает репликативный синтез ДНК при наличии SOS-индуцирующих повреждений и позволяет осуществить процесс TLS. Комплекс *UmuDD'С* играет ингибирующую роль в SOS-мутагенезе, секвестрируя *UmuD'*-активности [39]. Как мы замечали ранее, участие ДНК-полимеразы III или некоторых ее субъединиц приводит к повышению эффективности TLS. Ее участие может реализовываться либо на стадии инициации TLS, либо этот фермент способствует протягиванию комплекса *UmuC*, *UmuD'*, *RecA*, *SSB* через сайты с повреждениями.

Таким образом, в предложенной схеме закрепление премутационного повреждения в мутацию точкового типа при действии ионизирующих излучений есть результат работы различных энзиматических механизмов и как одного из главных — мультиферментного комплекса, включающего в себя индуцибельную ДНК-полимеразу V (*UmuD'2C*), *RecA*-протеазу, *SSB*-белки, субъединицы ДНК-полимеразы III. Предложенная схема реализации индуцибельного мутационного процесса у клеток *E. coli* отражает, по-видимому, лишь главные, магистральные пути индуцированного мутагенеза, но она позволяет осуществить математическое описание мутационного процесса у клеток *E. coli*, индуцированного ионизирующей радиацией. Математическое моделирование индуцированного мутагенеза у клеток *E. coli* при действии ультрафиолетового света было выполнено в [64–66].

2.2. Математическая модель образования генных мутаций у клеток *Escherichia coli* при УФ-облучении. Разработанная математическая модель основана на экспериментальных данных, характеризующих основные процессы SOS-ответа бактерий. Была смоделирована вся цепь событий, ведущих к закреплению первичных повреждений ДНК в точковые мутации. Количественный анализ ключевых путей SOS-мутагенеза выполнен в терминах современной системной биологии. Численно описаны процессы изменения динамики концентраций основных SOS-белков и translesion-синтез с участием модифицированного репликационного комплекса. В качестве примера выполнена оценка частоты мутаций в *lacI*-гене *E. coli* от дозы облучения и проведено сравнение теоретических и экспериментальных данных.

Безразмерные уравнения математической модели, описывающей динамику концентрации индуцирующего сигнала (однонитевой ДНК), имеют следующий вид [46]:

$$\begin{aligned} \text{для } \tau < \tau_2 \quad y_0(\tau, D) &= D \exp(-p_1\tau) \int_0^\tau \frac{\exp(p_1\xi)d\xi}{p_2D + \exp(p_3\xi)}, \\ \text{для } \tau \geq \tau_2 \quad y_0(\tau, D) &= D \exp(-p_1\tau) \int_0^{\tau_2} \frac{\exp(p_1\xi)d\xi}{p_2D + \exp(p_3\xi)}, \end{aligned} \quad (3)$$

где $\tau_2 = \frac{1}{p_3} \ln(\exp(p_4)(1 + p_2D) - p_2D)$.

В уравнениях (3) y_0 — нормированная внутриклеточная концентрация индуцирующего сигнала; D — доза ультрафиолетового облучения; τ — безразмерное время; τ_2 — безразмерное время окончания репликации.

Безразмерные уравнения для каждого белка SOS-системы имеют следующий вид:

$$\begin{aligned} \frac{dy_1}{d\tau} &= \frac{y_{01}(1 + p_5^{h_1})}{1 + \left(\frac{y_1}{\gamma_1 N_A} p_5 y_1\right)^{h_1}} - p_6 y_1 y_3 - y_1, \\ \frac{dy_2}{d\tau} &= \frac{y_{02}(1 + p_7^{h_2})}{1 + \left(\frac{y_1}{\gamma_2 N_A}\right)^{h_2}} + p_1 y_3 - p_8 y_0 y_2 - y_2, \\ \frac{dy_3}{d\tau} &= p_8 y_0 y_2 - p_1 y_3, \\ \frac{dy_4}{d\tau} &= \frac{y_{04} p_9 (1 + p_{10}^{h_4})}{1 + \left(\frac{y_1}{\gamma_4 N_A}\right)^{h_4}} + p_{11} y_6 y_{10} + p_{12} y_6 y_7 + p_{13} y_6 - p_{14} y_4 y_3 - \\ &\quad - p_{15} y_4^2 - p_{16} y_4 y_8 - p_{17} y_4 y_6 - p_{18} y_4 y_{11} - p_{19} y_4, \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
\frac{dy_5}{d\tau} &= \frac{y_{05}p_{20}(1 + p_{21}^{h_5})}{1 + \left(\frac{y_1}{\gamma_5 N_A}\right)^{h_5}} - p_{22}y_5y_7 - p_{23}y_5y_8 - p_{24}y_5y_9 - p_{25}y_5, \\
\frac{dy_6}{d\tau} &= p_{14}y_3y_4 + p_{16}y_4y_8 + p_{18}y_4y_{11} - p_{26}y_6^2 - p_{17}y_4y_6 - p_{11}y_6y_{10} - \\
&\quad - p_{12}y_6y_7 - p_{13}y_6, \\
\frac{dy_7}{d\tau} &= p_{15}y_4^2 - p_{22}y_5y_7 - p_{12}y_6y_7 - p_{27}y_7, \\
\frac{dy_8}{d\tau} &= p_{26}y_6^2 - p_{16}y_4y_8 - p_{23}y_5y_8 - p_{28}y_8, \\
\frac{dy_9}{d\tau} &= p_{17}y_4y_6 + p_{16}y_4y_8 + p_{12}y_6y_7 - p_{24}y_5y_9 - p_{29}y_9, \\
\frac{dy_{10}}{d\tau} &= p_{22}y_5y_7 - p_{11}y_6y_{10} - p_{30}y_{10}, \\
\frac{dy_{11}}{d\tau} &= p_{23}y_5y_8 - p_{18}y_4y_{11} - p_{31}y_{11}, \\
\frac{dy_{12}}{d\tau} &= p_{24}y_5y_9 + p_{18}y_4y_{11} + p_{11}y_6y_{10} - p_{32}y_{12}.
\end{aligned} \tag{4}$$

Начальные условия, определенные как число молекул, содержащихся в одной клетке, имеют вид $y_1(0) = y_{01} = 1300$, $y_2(0) = y_{02} = 7200$, $y_3(0) = y_{03} = 0$, $y_4(0) = y_{04} = 180$, $y_5(0) = y_{05} = 15$, $y_6(0) = y_{06} = 0$, $y_7(0) = y_{07} = 135$, $y_8(0) = y_{08} = 0$, $y_9(0) = y_{09} = 0$, $y_{10}(0) = y_{010} = 93$, $y_{11}(0) = y_{011} = 0$, $y_{12}(0) = y_{012} = 0$.

В уравнениях (4) $y_1, y_2, y_3, y_4, y_5, y_6, y_7, y_8, y_9, y_{10}, y_{11}$ и y_{12} — нормированные внутриклеточные концентрации белков LexA, RecA, RecA*, UmuD, UmuC, UmuD', UmuD₂, UmuD'₂, UmuDD', UmuD₂C, UmuD'₂C и UmuDD'C соответственно; p_j ($j = 1, \dots, m$) — нормированные константы скорости реакций; h_i — коэффициенты Хилла; γ_i — равновесные константы диссоциации белка LexA при связывании с операторной ДНК различных генов; N_A — постоянная Авогадро. Большинство параметров модели было определено на основе экспериментальных данных.

Для оценки вероятности возникновения ошибки в ходе SOS-репарации была разработана модель translesion-синтеза. Моделирование движения комплекса PolV Mut вдоль цепи ДНК и нахождение дозово-временной зависимости среднего числа ошибок в ходе TLS выполнено с помощью разработанной программы.

Изложенные модельные представления позволяют находить частоту мутаций в отдельных генах *E. coli*. В [64] выполнен расчет частоты мутаций в регуляторном гене lacI. Дозовая зависимость частоты мутаций при ультрафиолетовом облучении описана следующим выражением,

предложенным в [14]:

$$\frac{Z_m}{Z(D)} = \theta_1 D + \theta_2 D(1 - \exp(-\theta_3 D)), \quad (5)$$

где Z_m и Z — число мутантных и выживших клеток соответственно; $\theta_1 D$ — линейный компонент дозовой зависимости, величина $\theta_2 D$ пропорциональна выходу мутаций; $(1 - \exp(-\theta_3 D))$ — доля клеток, в которых индуцировалась мутагенная репарация. Коэффициенты θ_1 , θ_2 и θ_3 определены в ходе исследования.

В рамках построенной модели был проведен численный анализ уравнений (3) и (4). Получены трехмерные графики, описывающие концентрацию продуктов генов *lexA*, *recA*, *umuC* и *umuD* (рис. 17). Решения модели translesion-синтеза представлены на рис. 18, *a*. Результаты, характеризующие частоту образования генных мутаций в регуляторном гене *lacI* *E. coli* в зависимости от дозы ультрафиолетового излучения, представлены на рис. 18, *б*. Как

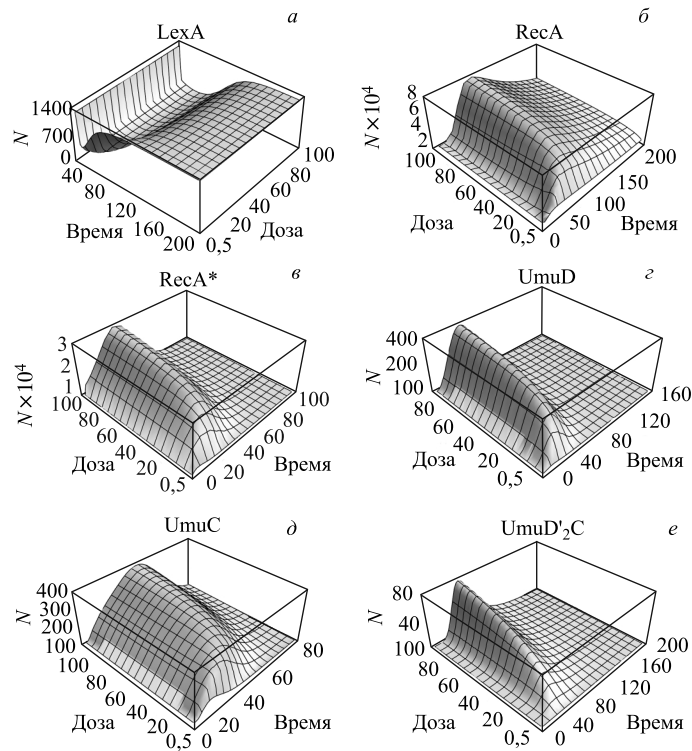


Рис. 17. Изменение концентрации белков LexA (*a*), RecA (*б*), RecA* (*в*), UmuD (*г*), UmuC (*д*) и UmuD₂C (*е*) со временем и в зависимости от дозы УФ-облучения. N — число молекул белка в одной клетке

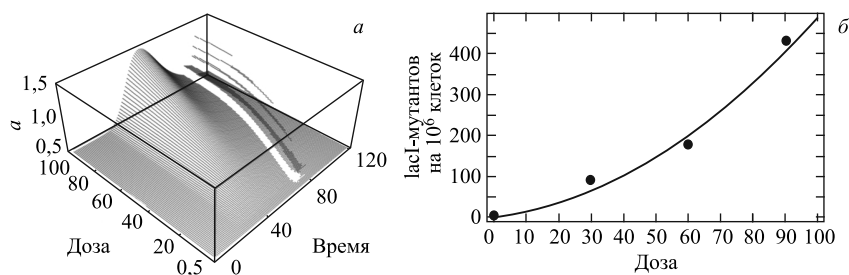


Рис. 18. а) Дозово-временная зависимость среднего числа ошибок a . б) Частота мутаций в гене *lacI* *E. coli*. Линия — результаты расчетов, точки — экспериментальные данные (Oller et al., 1992)

можно видеть, теоретическая кривая хорошо описывает экспериментально полученные данные.

Таким образом, результаты исследований, касающиеся индуцированного мутагенеза у клеток *E. coli* излучениями широкого диапазона ЛПЭ, свидетельствуют о значительных различиях в закономерностях индукции генных и структурных мутаций. В отличие от степенной зависимости, выявленной для точковых мутаций, дозовая зависимость для структурных хромосомных мутаций имеет линейный вид при действии излучений широкого диапазона ЛПЭ. Это связано с разным характером молекулярных нарушений, лежащих в основе генных и делеционных мутаций. Премутационными повреждениями, формирующими генные мутации, являются кластерные повреждения ДНК, а основу делеционных мутаций составляют двунитевые разрывы ДНК. Данное обстоятельство отражается на характере зависимостей $N_m/N(D)$. Степенной характер дозовых зависимостей выхода индуцированных генных мутаций обусловлен участием мутагенной ветви SOS-зависимой репарации, которая является необходимым условием формирования такого типа мутаций. Иницирует запуск SOS-репарации индукция кластерных повреждений ДНК. Данный тип нарушений структуры ДНК формирует также и премутационные повреждения, закрепляемые в мутацию на основе TLS-механизма. Дозовые зависимости индукции делеционных мутаций, описываемые линейными функциями, обусловлены другими механизмами их формирования в отличие от генных мутаций. Образование делеций у бактерий *E. coli* связывается с формированием двунитевых разрывов ДНК. Для реализации премутационных повреждений данного типа в структурную мутацию не требуется индукция системы SOS-репарации, которая играет ключевую роль в формировании генных мутаций.

Материалы, полученные в [13, 15, 16], свидетельствуют о том, что характер дозовых кривых для точковых мутаций не меняется с ростом ЛПЭ

излучений. Сохранение квадратичного характера зависимости частоты мутирования от дозы облучения при действии тяжелых заряженных частиц обусловлено рядом обстоятельств. Микродозиметрический анализ выявляемых закономерностей показывает [14], что при действии разных доз ионизирующих излучений в облученной популяции можно выделить три типа субпопуляции клеток: неповрежденные выживающие клетки; летально поврежденные не выживающие клетки; «умеренно» поврежденные клетки, которые после завершения процесса репарации также составляют класс выживающих клеток. При увеличении ЛПЭ излучений возрастает доля неповрежденных клеток, а уменьшается доля летально поврежденных, через которые прошли частицы сердцевиной трека. В результате этого мутации образуются преимущественно в субпопуляции, поврежденной прохождением δ -электронов, и в той небольшой фракции клеток, через которые прошли одна и больше частиц сердцевиной трека, при условии, что эти клетки смогли отрепарировать возникшие повреждения и не погибли. С учетом этого объясняется сохранение характера зависимостей $N_m/N(D)$ при действии излучений, различающихся по ЛПЭ. Так как характер передачи энергии δ -электронов веществу при действии электромагнитных и корпускулярных излучений не различается между собой, вид зависимости $N_m/N(D)$ при действии излучений разного качества остается неизменным. Детально роль δ -электронов в индукции генных мутаций у прокариот рассмотрена в [67]. На важную роль «непрямых» (glancing) взаимодействий треков тяжелых заряженных частиц с чувствительными структурами клеток в образовании мутаций у дрожжей обращено внимание в [68]. В модельных представлениях, развитых в [67], предполагается, что в тех случаях, когда трек тяжелой частицы не проходит через чувствительную область клетки, мутации в бактериальных клетках образуются в результате взаимодействия чувствительных структур с областью δ -электронов. Количество энергии, передаваемое этим структурам, описывается на основе моделей структуры трека [69, 70]. При этом обращается внимание на следующее важное обстоятельство. При действии тяжелых заряженных частиц с высокими значениями ЛПЭ ($\text{ЛПЭ}_\infty \geq 100$ кэВ/мкм), когда при прямом прохождении треков частиц через чувствительные структуры клетки преимущественно погибают, имеет место так называемый « δ -электронный» мутагенез. При действии же на клетки ускоренных легких ионов или ускоренных тяжелых заряженных частиц высоких энергий с $\text{ЛПЭ}_\infty \leq 100$ кэВ/мкм, когда чувствительные структуры испытывают прямое взаимодействие треков, имеет место «сердцевинно-трековый мутагенез» [67]. С учетом вышеизложенного становится понятным сохранение характера дозовых кривых мутагенеза при возрастании ЛПЭ частиц. Такие закономерности, как мы показали ранее, имеют место не только для бактерий *E. coli*, но и для клеток *Bacillus subtilis*.

Анализ данных, касающихся зависимости ОБЭ (ЛПЭ) для разных радиационно-индуцированных эффектов: летального действия, индукции генных и

структурных мутаций, во-первых, свидетельствует о возрастании коэффициентов ОБЭ частиц с ростом их ЛПЭ до определенных значений и, во-вторых, указывает на отсутствие инвариантности положения максимумов этих зависимостей. Для летальных эффектов облучения клеток *E. coli* наибольшие значения ОБЭ наблюдаются при действии частиц с ЛПЭ ≈ 100 кэВ/мкм. По критерию индукции прямых и обратных генных мутаций, как это видно из материалов, представленных на рис. 14, максимальные величины ОБЭ приходятся на значения ЛПЭ ≈ 20 кэВ/мкм.

Механизмы, определяющие зависимость радиочувствительности клеток *E. coli* от ЛПЭ излучений, были изучены в [63]. Показано, что при действии γ -квантов радиочувствительность клеток определяется эффективностью работы их репарационных систем. Чувствительность клеток к облучению тяжелыми заряженными частицами детерминирована лишь физическими свойствами излучений, и характер зависимости $D_0^{-1}(L)$ обуславливается степенью чувствительности клеток к γ -квантам. В широком диапазоне ЛПЭ частиц было установлено, что характер этой зависимости генетически детерминирован и определяется типом и выходом летальных повреждений, индуцируемых при γ -облучении. Зависимость $D_0^{-1}(L)$ у клеток дикого типа может описываться кривой либо с локальным максимумом, либо без максимума, в зависимости от условий, влияющих на выход ДР ДНК энзиматической природы и определяющих чувствительность клеток к γ -квантам. У репарационных мутантов с блоком медленной репарации наблюдается ниспадающий характер кривых при всех значениях ЛПЭ, и коэффициенты ОБЭ излучений не превышают единицы. У клеток с эффективно работающей системой репарации зависимость $D_0^{-1}(L)$ имеет резко выраженный максимум, и при значениях ЛПЭ ≥ 100 кэВ/мкм имеет место нивелирование радиочувствительности всех клеточных штаммов независимо от репарационного генотипа. Это связано с образованием кластерных ДР ДНК, и радиочувствительность клеток детерминирована лишь физическими свойствами излучений.

Так же как и для летальных эффектов облучения, значения коэффициентов ОБЭ по критерию индукции прямых и обратных генных мутаций увеличиваются с возрастанием ЛПЭ частиц до значений $\approx 20-30$ кэВ/мкм. Возрастание биологической эффективности тяжелых заряженных частиц по указанному критерию, как уже указывалось, объясняется увеличением выхода с ростом ЛПЭ премутационных повреждений ДНК и SOS-индуцирующих повреждений. В рамках подходов, развитых в [14], находят объяснение различия в положении максимумов зависимостей ОБЭ от ЛПЭ для летальных и мутагенных эффектов облучения. В настоящее время можно с уверенностью утверждать, что они обусловлены разным характером повреждений ДНК, участвующих в реализации генного мутагенеза и летальных эффектов облучения. В первом случае ими, как мы указывали выше, являются преимущественно поврежденные основания в составе кластерных повреждений

ДНК, во втором — двунитевые разрывы ДНК. Микродозиметрический анализ выхода кластерных ОР и ДР ДНК в зависимости от ЛПЭ свидетельствует о том, что оба типа зависимости описываются кривыми с локальным максимумом [55]. Однако для кластерных ОР положение максимума сдвинуто почти на порядок в область меньших значений ЛПЭ. Если максимальный выход прямых ДР ДНК на единицу поглощенной дозы излучения наблюдается при значениях ЛПЭ ≈ 200 кэВ/мкм, то максимальный выход кластерных однострунчатых повреждений реализуется при значениях ЛПЭ $\approx 30-50$ кэВ/мкм. Это обстоятельство может объяснять различия в характере положения максимумов зависимостей ОБЭ от ЛПЭ для летальных эффектов облучения и индукции генных мутаций.

Изложенное выше может объяснять положение максимума на кривой, описывающей зависимость ОБЭ от ЛПЭ для делеционных мутаций. Из рис. 14 видно, что в отличие от аналогичной зависимости для генных мутаций эта зависимость сдвинута в область больших значений ЛПЭ, так же как и кривая, характерная для летальных эффектов облучения. Это обстоятельство может указывать на однотипность повреждений, участвующих в реализации делеционных мутаций и летальных эффектов у клеток *E. coli*, а именно — двунитевых разрывов ДНК. Отсутствие полного совпадения положения максимумов указанных зависимостей, по-видимому, отражает различное участие энзиматических ДР ДНК в формировании летальных и мутагенных эффектов облучения. В [63] показано, что чем меньший вклад в летальный эффект облучения вносят прямые ДР ДНК, соответственно, больший вклад вносят ДР энзиматической природы, тем в меньшую область значений ЛПЭ будет сдвинут максимум зависимости радиочувствительности клеток от ЛПЭ и наоборот. Анализируя результаты наших экспериментов, можно полагать, что участие ДР ДНК энзиматической природы в реализации делеционных мутаций проявляется в большей степени по сравнению с их вкладом в летальный эффект облучения. Это обстоятельство, возможно, отражается в отсутствии полного совпадения максимумов зависимостей ОБЭ от ЛПЭ по летальному эффекту облучения и индукции делеционных мутаций.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В заключение суммируем развитые представления о механизмах мутагенного действия ионизирующих излучений с разной линейной передачей энергии на клетки прокариот. Прежде всего, следует еще раз подчеркнуть ясное понимание классиками количественной радиобиологии — Н. В. Тимофеевым-Ресовским, Д. Ли и др. — необходимости использования ионизирующих излучений с разными физическими характеристиками для выяснения механизмов индуцированного мутационного процесса, конкретизации физических собы-

тий, служащих его пусковыми моментами: «Элементарные дискретные изменения элементарных дискретных компонентов генотипа (генов) у всех в этом отношении изученных живых организмов вызываются всеми типами ионизирующих излучений, следуя при этом одноударной кривой доза–эффект. Опыты с излучениями разных мощностей дозы и разной жесткости позволили в значительной мере конкретизировать то физическое явление, которое служит физическим пусковым механизмом, вызывающим мутации, попадание в определенный эффективный объем в форме одной ионизации» [71]. Представление о том, что попаданием является одна ионизация или узлокализированная группа ионизации в генетических структурах, предполагает линейный характер дозовой зависимости выхода мутаций. Действительно, справедливость этого положения была убедительно продемонстрирована в экспериментах на различных организмах. Однако в более поздних исследованиях наряду с линейными были выявлены и зависимости нелинейного типа. Из этого следует, что попадание или выделение кванта энергии в генах и фиксация возникающего повреждения в виде мутации неоднозначно связаны между собой и, более того, вероятность закрепления премутационного повреждения в мутацию зависит от ряда приводящих факторов. Установлено, что эта вероятность в сильной степени зависит от процессов протекания клеточного метаболизма и в конечном счете от систем пострадиационного восстановления. Ранние работы по учету частоты мутирования у микроорганизмов при облучении в условиях влияния факторов физической, химической и биологической природы выявили важную роль пострадиационного восстановления в индуцированном мутационном процессе. После выделения и идентификации мутантов с различными дефектами в репарации ДНК появилась возможность пристального изучения роли репарационных процессов в индуцированном мутагенезе. На основе полученных результатов можно было прийти к выводу о важной роли как физических, так и биологических факторов в мутагенном действии излучений. Роль физического фактора в мутационном процессе можно было изучать, используя ионизирующие излучения с разными физическими характеристиками, а роль биологического — используя различные репарационные мутанты. В экспериментах на бактериях с различным генотипом было установлено, что нелинейные дозовые кривые мутагенеза наблюдаются довольно часто и выявляются при учете как обратных, так и прямых мутаций. Такого рода зависимости в течение долгого времени являлись мучительной проблемой для специалистов.

Рассмотренные нами материалы по мутагенному действию излучений широкого диапазона ЛПЭ позволяют понять механизмы, лежащие в основе выявленных закономерностей. На основе исследований индукции как прямых, так и обратных мутаций можно сделать вывод о линейно-квадратичной зависимости частоты образования мутаций от дозы различных видов излучений. При дозах облучения, превышающих значения $\sim 80\text{--}100$ Гр, наблюдается

степенная дозовая зависимость. В логарифмическом масштабе дозовые зависимости представляют собой прямые с тангенсом угла наклона $\chi = 1,7-1,8$, что свидетельствует о степенном, близком к квадратичному, характере этих кривых. Наиболее высокая эффективность в индукции мутаций наблюдается в экспериментах с ускоренными ионами гелия с ЛПЭ $\cong 20$ кэВ/мкм. При действии ионов с большими ЛПЭ мутагенная эффективность снижается. Сохранение квадратичного характера зависимости частоты мутирования от дозы облучения при действии тяжелых заряженных частиц обусловлено рядом обстоятельств. Микродозиметрический анализ выявляемых закономерностей свидетельствует о том, что при действии разных доз ионизирующих излучений в облученной популяции можно выделить три типа субпопуляций клеток: неповрежденные выживающие клетки; летально поврежденные не выживающие клетки; «умеренно» поврежденные клетки, которые после завершения процесса репарации также составляют класс выживающих клеток. При увеличении ЛПЭ излучений возрастает доля неповрежденных клеток, а уменьшается доля летально поврежденных, через которые прошли частицы сердцевиной трека. В результате этого мутации образуются преимущественно в субпопуляции, поврежденной прохождением δ -электронов, и в той небольшой фракции клеток, через которые прошли одна и больше частиц сердцевиной трека при условии, что эти клетки смогли отрепарировать возникшие повреждения и не погибли. На основании этого можно объяснить сохранение характера зависимостей $N_m/N(D)$ при действии излучений, различающихся по ЛПЭ. Поскольку характер передачи энергии δ -электронов веществу при действии электромагнитных и корпускулярных излучений не различается между собой, вид зависимости $N_m/N(D)$ при действии излучений разного качества остается неизменным. Следовательно, при действии тяжелых заряженных частиц с высокими значениями ЛПЭ ($\text{ЛПЭ}_\infty \geq 100$ кэВ/мкм), когда при прямом прохождении треков частиц через чувствительные структуры клетки преимущественно погибают, в выживающих клетках имеет место так называемый « δ -электронный» мутагенез. При действии же на клетки ускоренных легких ионов или ускоренных тяжелых заряженных частиц высоких энергий с $\text{ЛПЭ}_\infty \leq 100$ кэВ/мкм, когда чувствительные структуры испытывают прямое взаимодействие треков, имеет место «сердцевинно-трековый мутагенез». С учетом вышеизложенного, становится понятным сохранение характера дозовых кривых мутагенеза у клеток *Escherichia coli* и *Bacillus subtilis* при возрастании ЛПЭ частиц.

На основании совокупности полученных данных можно прийти к заключению о том, что квадратичный характер кривых мутагенеза обусловлен тем, что для образования точковых мутаций необходима реализация двух независимых друг от друга событий «попадания». Первое из них связано с возникновением премутационного повреждения в изучаемом локусе, и второе — образование повреждения, индуцирующего систему SOS-репарации, которая

и способствует закреплению изменения в бактериальной ДНК в виде мутаций. С учетом того, что SOS-репарация является решающим фактором в реализации индуцированного мутационного процесса, важен анализ современных молекулярных механизмов организации SOS-системы у бактерий *E. coli*. Разработанная молекулярная модель индуцированного мутагенеза позволяет описать магистральные пути трансформации первичных нарушений структуры ДНК (премутационных повреждений) в мутации. В предложенной модели закрепление премутационного повреждения в мутацию точечного типа при действии ионизирующих излучений есть результат работы различных ферментатических механизмов и как одного из главных — мультиферментного комплекса, включающего в себя индуцибельную ДНК-полимеразу V (UmuD₂C), RecA-протеазу, SSB-белки, субъединицы ДНК-полимеразы III. На основе молекулярной модели была разработана математическая модель, описывающая мутационный процесс при действии ультрафиолетового облучения. На основании этих подходов возможен дальнейший математический анализ основных этапов мутационного процесса при действии ионизирующих излучений с разными физическими характеристиками на клетки *Escherichia coli*. Конечно, эта задача гораздо более сложная, но вполне реализуемая. Для ее успешного решения прежде всего необходимы экспериментальные данные, касающиеся кинетики образования и деградации основных генных продуктов, участвующих в формировании мультиферментного комплекса UmuD₂C.

Крайне важной задачей в понимании механизмов индуцированного мутационного процесса является сравнительное изучение закономерностей и механизмов образования как генных, так и структурных мутаций у клеток при действии излучений широкого диапазона линейных передач энергии. Действительно, для решения ряда актуальных практических и научных вопросов генетического действия ионизирующих излучений с разными физическими характеристиками необходимо иметь информацию не только о суммарном выходе различного типа мутаций в облученных клетках, но и о частоте образования как генных, так и структурных мутаций у клеток с различным генотипом. Получение такого рода данных является крайне трудной задачей в экспериментах на клетках млекопитающих. Конечно, получение данных о выходе различного рода мутаций при действии излучений разного качества в экспериментах на клетках млекопитающих является исключительно важной практической и научной задачей, но такие исследования с привлечением различных видов бактериальных клеток, безусловно, представляются необходимой ступенью в решении данной проблемы. У бактерий детально изучена структурно-функциональная организация генетического аппарата, получены различные репарационно-дефицитные мутанты, и все это позволяет выяснить молекулярные механизмы формирования генных и структурных мутаций при действии на клетки излучений, различающихся по ЛПЭ в широком диапазоне.

Анализ рассмотренных материалов показывает, что в отличие от генных частота образования делеционных мутаций линейно возрастает с дозой для всех видов использованных в экспериментах излучений. Наибольшей эффективностью обладают ионы с ЛПЭ ≈ 50 кэВ/мкм. Ускоренные ионы с большей ЛПЭ вызывают меньший биологический эффект. Следовательно, характер дозовых зависимостей по критерию индукции делеционных мутаций у клеток *E. coli* совершенно отличается от ранее рассмотренных нами зависимостей, полученных для генных мутаций, когда наблюдается степенной, близкий к квадратичному характер зависимости $N_m/N(D)$. Дозовые зависимости индукции делеционных мутаций, описываемые линейными функциями, обусловлены другими механизмами их формирования по сравнению с генными мутациями. 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 повреждения оснований, а двунитевые разрывы ДНК. Для реализации премутационных повреждений данного типа в структурную мутацию не требуется индукции системы SOS-репарации, которая играет ключевую роль, как мы показали ранее, в формировании генных мутаций.

Биологическая эффективность тяжелых заряженных частиц, оцениваемая по индукции делеционных мутаций, возрастает с увеличением ЛПЭ, так же как для летальных эффектов облучения и индукции точковых мутаций. Однако положение максимумов зависимости ОБЭ (ЛПЭ) для рассматриваемых эффектов облучения не является инвариантным. Для летального действия наибольшие значения ОБЭ наблюдаются при облучении частицами с ЛПЭ ≈ 100 кэВ/мкм. По критерию индукции генных tonV - и colV -мутаций величина максимума приходится на значения ЛПЭ ≈ 20 кэВ/мкм. Для делеционных tonVtr^- -мутаций эта величина составляет ≈ 50 кэВ/мкм. На основании проведенных исследований был сделан вывод о том, что различия в положении максимумов зависимостей ОБЭ (ЛПЭ) для летальных и мутагенных эффектов облучения обусловлены разным характером повреждений ДНК, участвующих в реализации генного мутагенеза и летальных эффектов. В первом случае ими являются преимущественно поврежденные основания, во втором — двунитевые разрывы ДНК. Микродозиметрический анализ выхода кластерных ОР и ДР ДНК в зависимости от ЛПЭ свидетельствует о том, что оба типа зависимостей описываются кривыми с локальным максимумом. Однако для кластерных ОР положение максимума сдвинуто почти на порядок в область меньших значений ЛПЭ. Это обстоятельство может объяснить различия в положении максимумов зависимостей ОБЭ от ЛПЭ для летальных эффектов облучения и индукции генных мутаций.

Эксперименты по индукции мобильных элементов излучениями с разными физическими характеристиками были спланированы с учетом того, что

точная эксцизия транспозонов, являясь, с одной стороны, делеционным по молекулярной природе процессом, с другой стороны, зависит от функций генов, контролирующих SOS-репарацию. Поскольку образование делеционных мутаций, в основе которых лежит образование ДР ДНК, не детерминировано индуцибельной SOS-репарацией, представлялось важным изучить закономерности и механизмы точной эксцизии транспозонов у бактерий *Escherichia coli* при действии γ -квантов и ускоренных тяжелых ионов с разными физическими характеристиками. При действии тяжелых заряженных частиц с ростом дозы облучения частота формирования делеций, вызванных точной эксцизией мобильного элемента, описывалась степенными зависимостями. С возрастанием ЛПЭ частиц их биологическая эффективность по сравнению с γ -квантами увеличивалась, и максимум зависимости ОГЭ, определенной по критерию точной эксцизии транспозона Tn10, реализовался в диапазоне ЛПЭ от 20 до 40 кэВ/мкм. Как мы показывали выше, при таких же значениях ЛПЭ наблюдается максимальный выход генных мутаций у бактерий *Escherichia coli* и *Bacillus subtilis*. На основании полученных данных был сделан вывод о том, что высокая биологическая эффективность тяжелых заряженных частиц по индукции мобильных элементов, как и в случае индукции генных мутаций, обусловлена двумя обстоятельствами. Точная эксцизия транспозона, являясь, с одной стороны, делеционным событием, с другой стороны, обусловлена SOS-зависимыми механизмами. В основе инициации эксцизии транспозона лежит формирование односторонних шпилек в его последовательности, образующихся в ходе репарации повреждений ДНК, и формирование повреждений, запускающего SOS-ответ клетки, в результате чего происходит эксцизия мобильного элемента. Различие в характере премутационных повреждений, являющихся молекулярным субстратом при формировании генных и структурных мутаций, как мы указывали, отражается на характере зависимостей ОБЭ (ЛПЭ). Молекулярной основой эксцизии транспозона могут являться кластерные повреждения одной нити ДНК, возникающие на фоне клеточного SOS-ответа. Это обстоятельство находит свое подтверждение в степенном характере дозовой зависимости индукции мобильных элементов излучениями с разными физическими характеристиками, а также в положении локального максимума зависимости ОБЭ (ЛПЭ) по данному критерию, коррелирующего с аналогичной зависимостью для генных мутаций.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кривиский А. С. // Вестн. рентгенол. радиологии. 1938. Т. 20. С. 375–393.
2. Kada T. et al. // Ann. Inst. Pasteur. 1960. V. 99. P. 547–566.
3. Current Topics in Radiation Biology / Eds.: B. A. Bridges, R. J. Munson. N. Y.: J. Wiley and Sons, 1968. V. 4. P. 95–188.

4. *Bridges B. A., Mottershead R. P.* // *Mutat. Res.* 1971. V. 13. P. 1–8.
5. *Bridges B. A., Mottershead R. P.* // *Mol. Gener. Genet.* 1978. V. 162. P. 35–41.
6. *Glickman B. W. et al.* // *Mutat. Res.* 1980. V. 69. P. 1–12.
7. *Бреслер С. Е. и др.* // *Генетика.* 1985. Т. 21. С. 384–390.
8. *Deering R. A.* // *Rad. Res.* 1963. V. 19. P. 169–178.
9. *Munson R. L., Bridges B. A.* // *Biophysic.* 1969. V. 6. P. 1–5.
10. *Munson R. L., Bridges B. A.* // *Intern. J. Biol.* 1973. V. 24. P. 257–273.
11. *Шелегедин В. Н. и др.* // *Studia biophysica.* 1971. Т. 28. С. 213–221.
12. Heavy Ion Effects on *B. subtilis* spores: Inactivation, Repair and Mutation Induction. GSI. Darmstad, 1985. V. 25. P. 69–80.
13. *Toکارova B. et al.* // *Mutat Res.* 1989. V. 227. P. 199–205.
14. *Красавин Е. А., Козубек С.* Мутагенное действие излучений с разной ЛПЭ. М.: Энергоатомиздат, 1991. 183 с.
15. *Борейко А. В., Булах А. П., Красавин Е. А.* // *Рад. биология. Радиоэкология.* 2004. Т. 45. С. 299–304.
16. *Boreyko A. V., Bulah A. P., Krasavin E. A.* // *Part. Nucl., Lett.* 2005. No. 4(127). P. 102–106.
17. *Kozubek S., Krasavin E. A., Amirtayev K. G.* // *Mutat. Res.* 1989. V. 210. P. 221–226.
18. *Walker G. C.* // *Microbiol. Rev.* 1984. P. 60–93.
19. *Kellerer A. M. et al.* GSI Report. 1984. 85-1. P. 241.
20. *Baltschukat K., Horneck G.* // *Rad. Environ. Biophys.* 1991. V. 30. P. 87–103.
21. *Бреслер С. Е.* // *Генетика.* 1976. Т. 12. С. 153–160.
22. *Sapora O., Loverock P. S., Fielden E. M.* // *Intern. J. Rad. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem. Med.* 1976. V. 30. P. 385–387.
23. *Witkin E. M.* // *Vact. Rev.* 1976. V. 40. P. 869–907.
24. *Pollard E. C. et al.* // *Rad. Res.* 1977. V. 72. P. 519–532.
25. *Kozubek S. et al.* JINR, E19-88-867. Dubna, 1988.
26. *Козубек С. и др.* // *Радиобиология.* 1989. Т. 29. С. 300–304.
27. *Ptitsin L. R. et al.* // *Appl. Environ. Microbiol.* 1997. V. 63. P. 4377–4384.
28. *Колова О. В.* ОИЯИ, Р19-2002-9. Дубна, 2002.
29. *Бонев М. Н., Козубек С., Красавин Е. А.* // *Радиобиология.* 1989. Т. 29. С. 30–36.
30. *Борейко А. В., Булах А. П., Красавин Е. А.* // *Рад. биология. Радиоэкология.* 2004. Т. 45. С. 299–304.
31. *Борейко А. В.* Автореф. дис. . . . д-ра биол. наук. Дубна, 2005.
32. *Sargentini N. J., Smith K. C.* // *Mutat. Res.* 1992. V. 265. P. 83–101.

33. *Алеикин Г. И., Маркова А. П., Астафьева И. П.* // Мол. ген. микробиол. и вирусол. 1983. Т. 8. С. 23–31.
34. *Nagel R., Chan A.* // *Mutat. Res.* 2000. V. 459. P. 275–284.
35. *Mita S. et al.* // *Nucleic Acids Res.* 1990. V. 18. P. 561–567.
36. *Bierne H. et al.* // *Mol. Microbiol.* 1997. V. 26. P. 557–567.
37. *Борейко А. В., Журавель Д. В.* // Письма в ЭЧАЯ. 2005. Т. 2, №4(127). С. 107–111.
38. *Борейко А. В.* // Сб. тр. каф. биофизики. Изд-во РАЕН, 2006. С. 58–74.
39. *Smith B. T., Walker G. C.* // *Genetics.* 1998. V. 148. P. 1599–1610.
40. *Schlacher K. et al.* // *Mol. Cell.* 2005. V. 17. P. 561–572.
41. *Little J. W. et al.* // *PNAS USA.* 1981. V. 78. P. 4199–4203.
42. *Luo et al.* // *Cell.* 2001. V. 106. P. 585–594.
43. *Anderson D. G., Kowalczykowski S. C.* // *Cell.* 1998. V. 95. P. 975–979.
44. *Kitagawa Y. et al.* // *PNAS USA.* 1985. V. 82. P. 4336–4340.
45. *Little J. W., Mount D. W.* // *Cell.* 1982. V. 29. P. 11–22.
46. *Aksenov S. V., Krsavin E. A., Litvin A. A.* // *J. Theor. Biol.* 1997. V. 186. P. 251–260.
47. *Reuven N. B. et al.* // *J. Biol. Chem.* 1999. V. 274. P. 31763–31766.
48. *Sutton M., Opperman T., Walker G.* // *Biochemistry.* 2000. V. 96. P. 12373–12378.
49. *Reuven N. B., Tomer G., Livneh Z.* // *Mol. Cell.* 1998. V. 2. P. 191–199.
50. *MaorShoshani A. N. et al.* // *PNAS USA.* 2000. V. 97. P. 565–570.
51. *Shen X., Woodgate R., Goodman M. F.* // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. P. 52546–52550.
52. *Frank E. G. et al.* // *PNAS USA.* 1996. V. 93. P. 10291–10296.
53. *LenneSamuel N. et al.* // *EMBO Rep.* 2002. V. 3. P. 45–49.
54. *Schlacher K. et al.* // *Mol. Cell.* 2005. V. 17. P. 561–572.
55. *Michalik V.* // *Intern. J. Rad. Biol.* 1992. V. 62. P. 9–20.
56. *Sutherland B. M. et al.* // *PNAS USA.* 2000. V. 97. P. 103–108.
57. *Goodhead D. T.* // *Intern. J. Rad. Biol.* 1994. V. 65. P. 7–17.
58. *D'souza D., Harrison L.* // *Nucleic Acids Res.* 2003. V. 31. P. 4573–4581.
59. *Wideroe R.* // *Atomkernenergie.* 1977. V. 29. P. 62–66.
60. *Бреслер С. Е., Носкин Л. А.* // Радиобиология. 1978. Т. 18. С. 548–555.
61. *Bridges B. A.* // *BioEssays.* 1995. V. 17. P. 63–70.
62. *Elledge S. J.* // *Science.* 1996. V. 274. P. 1664–1671.
63. *Красавин Е. А.* Проблема ОБЭ и репарация ДНК. М.: Энергоатомиздат, 1989. 193 с.
64. *Belov O. V., Krasavin E. A., Parkhomenko A. Yu.* // *J. Theor. Biol.* 2009. V. 261. P. 388–395.

65. *Belov O. V., Krasavin E. A., Parkhomenko A. Yu.* // *Biohysics*. 2010. V. 55. P. 682–690.
66. *Belov O. V., Krasavin E. A., Parkhomenko A. Yu.* *Rapid Diagnosis in Populations at Risk from Radiation and Chemicals*. IOS Press, 2010. P. 307–312.
67. *Kozubek S. et al.* // *Rad. Res.* 1995. V. 141. P. 199–207.
68. *Kiefer J.* // *Rad. Environ. Biophys.* 1992. V. 31. P. 279–288.
69. *Butts J. J., Katz R.* // *Rad. Res.* 1967. V. 30. P. 855–871.
70. *Chatterjee A., Magee H. D., Tobias C. A.* // *Rad. Res.* 1973. V. 54. P. 479–494.
71. *Тимофеев-Ресовский Н. В., Иванов В. И., Корогодин В. И.* *Применение принципа попадания в радиобиологии*. М.: Атомиздат, 1968. 228 с.