

Радиационная генетика

1. Мутагенное действие излучений (исторический аспект).
2. Типы генных и структурных мутаций.
3. Методы определения мутаций.
4. Премутационные повреждения.
5. Особенности мутагенного действия излучений на клетки прокариот.
6. Количественные закономерности мутагенного действия излучений.
7. Модели мутагенного действия излучений.
8. Механизмы репаративного мутагенеза.
9. TLS механизм.
10. Мутагенные и немутагенные пути репарации.
11. Механизмы репликативного мутагенеза.
12. Мутатест, SOS-хромотест.
13. Люкс-тест, лямбда-тест.
14. Мутагенное действие излучений с разной ЛПЭ на клетки прокариот.
15. Мутагенное действие излучений с разной ЛПЭ на клетки эукариот.
16. Цитогенетические эффекты облучения (задержка митоза, хромосомные aberrации, апоптоз, некроз).
17. Количественные закономерности цитогенетического действия излучений.
18. Методы изучения цитогенетических нарушений при облучении (анафазный, метафазный методы, FISH-техника).
19. Мутагенез у клеток млекопитающих. Типы мутаций. Методы определения мутаций в HPRT гене.

Исторический аспект

Историю изучения мутационного процесса можно разделить на 5 периодов. В течение *первого периода* (1900--1927) были развиты представления о мутациях и о частоте их возникновения, сформулированы основные вопросы, касающиеся природы мутаций, и разработаны методы количественной оценки скорости мутационного процесса. *Второй период* начался в 1927 г. открытием мутагенного действия рентгеновских лучей; оно дало в руки исследователей превосходное орудие для изучения природы мутаций. К концу второго периода, т. е. на исходе 30-х годов, была создана общая теория мутаций, так называемая «теория мишени». Она была изложена в книгах трех физиков: в двух обширных и исчерпывающих руководствах, одно из которых написали Тимофеев-Ресовский и Циммер, другое -- Ли, а также в небольшой по объему книге Шредингера, который рассмотрел феномен мутации с квантовомеханической точки зрения.

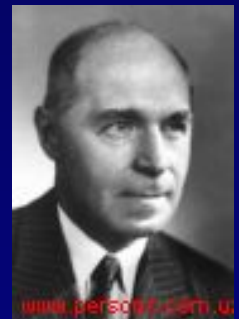
Мутагенез



XIX век – Август Вейсман:
безуспешные попытки изменить наследственность
используя температуру, влажность и механические
воздействия.



1925 – Г. А. Надсон (и его сотрудник Г. С. Филиппов) -
Ленинградский Институт рентгенологии и радиологии:
после воздействия рентгеновых лучей выросли колонии
дрожжей, отличавшиеся величиной, формой и окраской.



1927 - Герман Джозеф Меллер - V Международный

Нобелевская премия - 1946

вые удачные опыты по
ных мутаций с помощью
рентгеновых лучей у дрозофилы.



1927 - Л. Стадлер: искусственные мутации у ячменя и
кукурузы после воздействия рентгеновых лучей.

Третий период начался незадолго до второй мировой войны, когда открытие химического мутагенеза поставило новые проблемы, а использование микроорганизмов в качестве объекта генетического исследования дало новые методы экспериментального анализа мутационного процесса, в особенности мутаций, индуцированных УФ-лучами. Большинство данных, полученных в этот период, требовало для своего объяснения создания химической модели гена. Но поскольку такой модели еще не существовало, весь этот период характеризовался бурной деятельностью в экспериментальной области при бесплодности теоретических изысканий. Это положение изменилось в 1953 г., когда Уотсон и Крик, исходя из доказанной к тому времени роли ДНК как носителя генетической информации и из результатов кристаллографических исследований Уилкинса и Р. Франклин, предложили модель двойной спирали, которая объясняла точность репликации гена и вселяла надежду, что мутации можно будет объяснить в терминах химии нуклеиновых кислот. Это открытие ознаменовало начало *четвертого периода* в изучении мутагенеза, в течение которого преобладали исследования по химии нуклеиновых кислот.

Это направление оказалось весьма плодотворным и до сих пор служит источником информации о действии мутагенов на ДНК. Тем временем, однако, генетики начинали все лучше понимать, что важную роль в мутационном процессе играют такие клеточные механизмы, как репарация и фенотипическая реализация. В самые последние годы исследование роли этих клеточных процессов в мутагенезе все более настойчиво выдвигалось на передний план научных интересов. С этого начался нынешний, *пятый период*, в котором физические и химические знания, накопленные за предыдущие годы, явились необходимой основой для анализа мутаций как биологического процесса.

Первый период: с 1900 по 1927 г.

Голландский ботаник Гуго Де Фриз, один из тех, кто вновь открыл законы Менделя, ввел термин *мутация* для обозначения внезапно возникающих наследуемых изменений *Oenothera lamarckiana* (ослиника). Хотя впоследствии оказалось, что эти изменения связаны не с мутациями, а с полиплоидией, полисомией или редкими рекомбинациями в очень необычном кариотипе, термин этот был сохранен для обозначения изменений в качестве, количестве и расположении генов.

В 1910 г. Мёллер присоединился к группе талантливых молодых ученых, которые под руководством Моргана в опытах на дрозофиле доказали хромосомную теорию наследственности. Мёллер заинтересовался природой и происхождением мутаций, которые ПОСЛУЖИЛИ отправной точкой для этих замечательных исследований.

Он понял, что при рода мутаций нерасторжимо связана с природой гена. В своем выступлении, относящемся к 1921 г., он подчеркнул, что ген обладает одним уникальным свойством, без которого не могла бы произойти эволюция. Это свойство заключается в способности гена к самовоспроизведению в том смысле, что, «когда изменяется структура гена... каталитические свойства гена могут соответственно измениться так, чтобы сохранить его способность к аутокатализу». Он высказал догадку, что должно существовать «некое свойство конструкции гена - общее для всех генов, - которое обеспечивает каждый ген единой способностью к аутокатализу - дает своего рода «carte blanche» для воспроизведения материала любой специфичности, из которого он сам состоит». В этом состояла *центральная проблема мутации*, которую Мёллер пытался решить генетическими методами, а позднее была решена методами химии и кристаллографии. Мёллер впервые ввел в практику генетических исследований концепцию «скорости мутационного процесса» .

Фундаментальные проблемы, которые возникли в первый период:

- 1. Какое свойство генетического материала позволяет ему точно реплицироваться даже после мутации?**
- 2. Все ли мутации представляют собой утрату генетического материала?**
- 3. Действительно ли мутации возникают только в момент репликации гена?**

Второй период:

(с 1927 г. до начала второй мировой войны)

В 1927 г. на III Международном генетическом конгрессе в Берлине Мёллер представил данные, которые неопровержимо доказывали способность рентгеновских лучей вызывать мутации у дрозофилы. В 1928 г. Стадлер показал то же самое для кукурузы. В течение двух последовавших за этим десятилетий мутагенез, индуцированный рентгеновскими лучами, господствовал почти во всех областях генетики. Это дало в руки исследователей мощный инструмент, который нашел широкое применение при решении самых разнообразных задач.

Третий период:

(с начала второй мировой войны до 1953 г.)

Этот период в изучении мутагенеза был ознаменован двумя событиями - открытием химических мутагенов и использованием микроорганизмов в качестве объекта мутационных исследований. Направления, возникшие из этих отправных точек, развивались в течение всего этого периода более или менее независимо. Химические мутагены впервые были применены на микроорганизмах, однако почти все важные открытия по химическому мутагенезу в этот период были сделаны на дрозофиле, тогда как наиболее важные результаты по УФ-мутагенезу были получены в опытах на микроорганизмах. Эти два направления независимо друг от друга привели к одному принципиально важному заключению: они показали существование *предмутационных*, или *потенциальных*, повреждений, предшествующих возникновению мутаций. Изучение на микроорганизмах условий, которые способствуют или препятствуют закреплению индуцированных УФ-лучами предмутаций, привело к открытию механизма репарации. На дрозофиле было показано, что предмутационное состояние может воспроизводиться в потомстве (или иначе «реплицироваться»).

К концу этого периода накопилось большое количество следующих проблем:

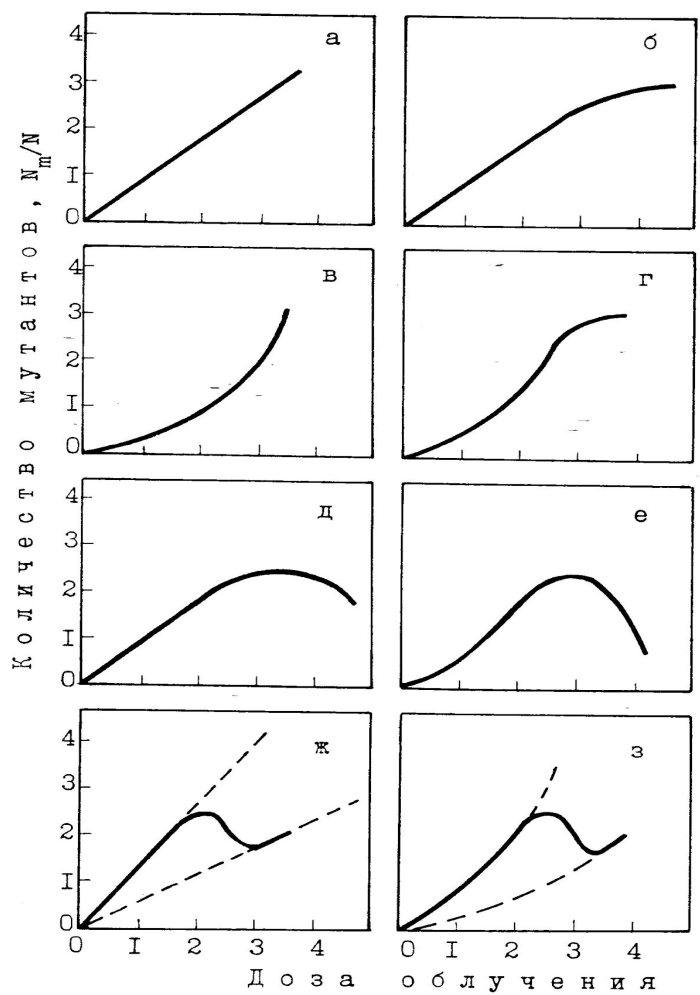
- 1. Загадка *точной репликации генов* лишь осложнилась открытием химических мутагенов, которые, по-видимому, вызывают мутации посредством различных химических изменений.**
- 2. Загадка *нестабильных генов* отнюдь не прояснилась, когда было установлено, что такие гены могут появиться *de novo* в результате химического воздействия.**
- 3. Проблема возникновения мутаций в нереплицирующихся генах, усложнилась еще больше после получения парадоксальных результатов на бактериях, растущих в условиях длительного культивирования.**
- 4. Сложность кривых *доза-эффект* для мутагенов, отличающихся по механизму действия от ионизирующего излучения, породила сомнение в теории мишени.**
- 5. Еще менее перспективными оказались спекуляции относительно природы предмутационного состояния гена и потенциальных хромосомных повреждений, которые предшествуют мутации и разрыву хромосомы.**

Четвертый период: (с 1953 до начала 1965 г.)

Этот период менее четко определен во времени, чем все предыдущие. Он начался с открытия, которое революционизировало не только мутационные исследования, но и всю генетику и почти всю биологию; однако потребовалось несколько лет, чтобы двойная спираль стала общепризнанной как истинная структура генетического материала. С принятием модели гена, предложенной Уотсоном и Криком, *центральная проблема мутагенеза* была решена раз и навсегда. То, что Мёллер назвал «общей аутокаталитической способностью» гена, определяющей все специфические мутационные изменения, оказалось присущим комплементарной структуре ДНК. Самое важное достижение этого периода состояло в создании биохимической, или молекулярной, теории мутаций.

Пятый период: (с 1965 г. по сегодняшний день)

Сегодняшние исследования целиком базируются на достижениях предыдущих периодов. В них используются представления о частоте мутаций, созданные в первый период, теория мишени, выдвинутая во втором, модель Уотсона - Крика, ознаменовавшая начало четвертого, и молекулярные представления, с помощью которых можно теперь объяснить факты, накопленные в течение третьего периода. Взаимодействие между ДНК и мутагенами по-прежнему представляет интерес, особенно в связи с открытием новых мутагенов; однако с ДНК внимание переместилось на клетку в целом.



Типы зависимостей частоты образования мутаций от дозы облучения

**Возрастание вероятности инактивации клеток,
имеющих мутационное повреждение.**

Harm, Stein, 1956

Алиханян и соавт, 1960

Кривиский, 1960

Бреслер, 1976

**Не проявление мутантного фенотипа вследствие
взаимодействия с другими мутациями.**

Сойфер и соавт., 1965

Иванов, 1965

**Гетерогенность клеток по радиочувствительности или
по мутабельности.**

Pittman, 1956

Завильгельский и соавт., 1965

**Инактивация при высоких дозах облучения продукта,
индуцирующего мутации.**

Harm, Stein, 1956

ОСНОВНЫЕ ТИПЫ МУТАГЕННЫХ ПОВРЕЖДЕНИЙ ДНК

Мутагенные факторы можно разделить на три группы. В первую входят агенты, мутагенное действие которых не зависит от функционирования гес А-гена. Это аналоги оснований (бромурацил и аминопурин) и гидроксилламин. Мутагенное действие этих соединений обусловлено прямым влиянием на спаривание оснований.

Вторую группу представляют мутагены, для проявления действия которых необходимо правильное функционирование гес А-гена и, как правило, *ити* CD-генов. В эту группу входят УФ- и ионизирующие излучения, 4-нитрохинолин-М-оксид (НХО), метилметансульфонат (ММС) и др.

Промежуточное положение занимает третья группа агентов - этилметансульфонат (ЭМС), азотистая кислота, нитрозометилмочевина (НММ) и натрозонитрометил-гуанидин (ННГ). В основе мутагенного действия этих соединений лежит механизм, занимающий промежуточное положение между непосредственным действием на спаривание оснований и полной активацией ферментов мутагенной SOS-репарации. Эти соединения в некоторой мере индуцируют SOS-систему, однако характер премутационных повреждений ДНК не требует участия *ити* CD-белков, снижающих матричные требования к ДНК-полимеразе III.

При действии ионизирующих излучений

премутационными событиями служат в основном **щелочестабильные** повреждения ДНК. К ним следует прежде всего отнести тиминовые гликоли. Однонитевые и двунитевые разрывы (ОР и ДР) ДНК, по-видимому, не являются у *E.coli* премутационными повреждениями для возникновения генных мутаций. Однако ОР ДНК можно разделить, по крайней мере, на два класса ("обычные" разрывы и "комплексные") по их структуре и репарируемости разными системами репарации.

Калининым В.Л. было изучено мутагенное действие ионизирующего излучения на тДНК *Bac.subtilis*. Особенности интеграции тДНК в хромосому клеток позволили проверить гипотезу Бриджеса, согласно которой премутационными повреждениями являются γ -индуцированные ОР ДНК.

Так как ОР в данном случае не могут перейти из донорской ДНК в хромосому клетки, то γ -облучение тДНК не должно индуцировать мутации. Действительно, при облучении тДНК в физиологическом растворе, т.е. в условиях косвенного действия излучения, обнаружили лишь эффект инактивации тДНК, но не индукцию мутаций. При подавлении косвенного действия излучения выяснилось, что γ -излучение индуцирует премутационные повреждения, которые в трансформированных клетках превращаются в мутации. Такими повреждениями могут быть лишь модифицированные основания ДНК.

МУТАГЕННОЕ ДЕЙСТВИЕ γ -ИЗЛУЧЕНИЯ НА КЛЕТКИ БАКТЕРИЙ

Дозовая зависимость выхода мутаций к фагоустойчивости у бактерий, выявленная в экспериментах Демерца и Латарже (1946), носила линейный характер в широком диапазоне доз облучения.

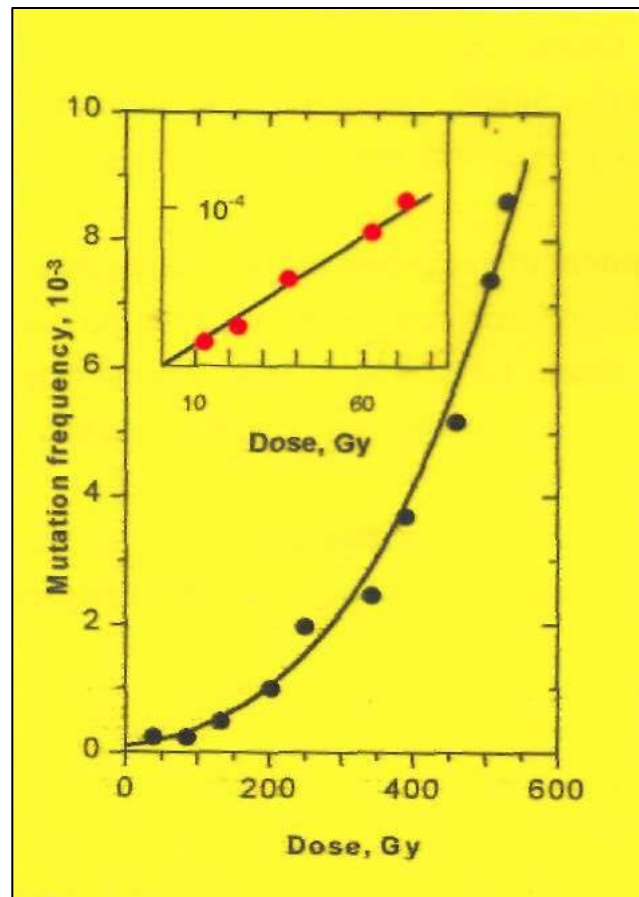
Аналогично частота образования реверсий резистентности к стрептомицину у клеток *E.coli* В/г при действии рентгеновского излучения также возрастала пропорционально дозе облучения (Андерсон,1951).

Линейные зависимости наблюдали в экспериментах на бактериальных клетках многие авторы с использованием различных тестов: образования реверсий к прототрофности по триптофану [Када и соавт, 1960], аргинину, треонину и метионину [Демерец, 1960], гистидину. Применяемые дозы облучения, как правило, были невелики и наиболее высокая доза составляла 130 Гр.

Квадратичная дозовая зависимость по образованию триптофановых реверсий у *E.coli* - WP-2 была обнаружена в 1978 . В опытах по индукции мутантов у фага лямбда, при изучении выхода реверсий по гистидину у клеток *E.coli* (Като, 1981) также были обнаружены квадратичные зависимости. Аналогичные результаты получены и в экспериментах по выявлению прямых мутаций в регуляторном *lac I*-локусе лактозного оперона *E.coli*, а также прямых мутаций устойчивости к рифампицину.

Отмечена модификация характера зависимости при изменении экспрессии генов, контролируют индуцибельные SOS-функции клеток.

Наряду с линейным характером зависимости некоторыми авторами был выявлен и ее степенной вид. Бриджес в 1971 у клеток дикого типа, с одной стороны, наблюдал линейную дозовую зависимость по выходу аргининовых ревертантов, с другой - квадратичную зависимость по частоте мутирования к резистентности к стрептомицину.



Индукция lac^- мутаций у бактерий *E.coli* при γ -облучении

ОСНОВНЫЕ ГИПОТЕЗЫ МЕХАНИЗМА МУТАГЕННОГО ДЕЙСТВИЯ ИОНИЗИРУЮЩИХ ИЗЛУЧЕНИЙ

1. Классическая модель

Линейный тип зависимости $N_m/N(D)$ часто наблюдается в экспериментах с микроорганизмами. Линейность, однако, во многих случаях реализуется только в ограниченном диапазоне доз облучения. При дальнейшем возрастании дозы в ряде случаев наблюдались отклонения от линейности. Такие зависимости описываются следующим выражением:

$$N_m/N = [1 - \exp(-\beta D)],$$

где D - доза облучения; β - константа. Произведение βD , пропорциональное дозе, есть среднее число мутаций на геном в облучаемой популяции клеток. При малых значениях D уравнение описывает прямолинейную зависимость $N_m/N = \beta D$. С увеличением дозы облучения наблюдается отклонение от линейной зависимости, и кривая, ее описывающая, выходит на плато.

2. Репарационная модель.

Для объяснения квадратичных зависимостей было предположено, что в формировании начального премутационного события участвуют два независимых повреждения на комплементарных нитях ДНК, не слишком сильно смещенных один относительно другого. Суть предложенного механизма к следующему:

Действительно, пусть l некоторая средняя длина расчистки вблизи повреждения и k - выход повреждений на единицу дозы на геном. Тогда при размере генома M нуклеотидов получаем среднее количество повреждений на длине l , равное $lkd/M = aD$. При случайном распределении повреждений в ДНК клеток вероятность возникновения хотя бы одного второго повреждения на участке $(0, l)$ от данного повреждения будет $1 - \exp(-aD)$. Умножив эту величину на общее число повреждений в исследуемом гене $M_l kD/M$, где M_l - размер гена, за которым ведется наблюдение, для относительного числа мутантов можно записать:

$$N_m/N(D) = (\beta D [1 - \exp(-aD)]),$$

где $\beta = kM/M$ - коэффициент пропорциональности.

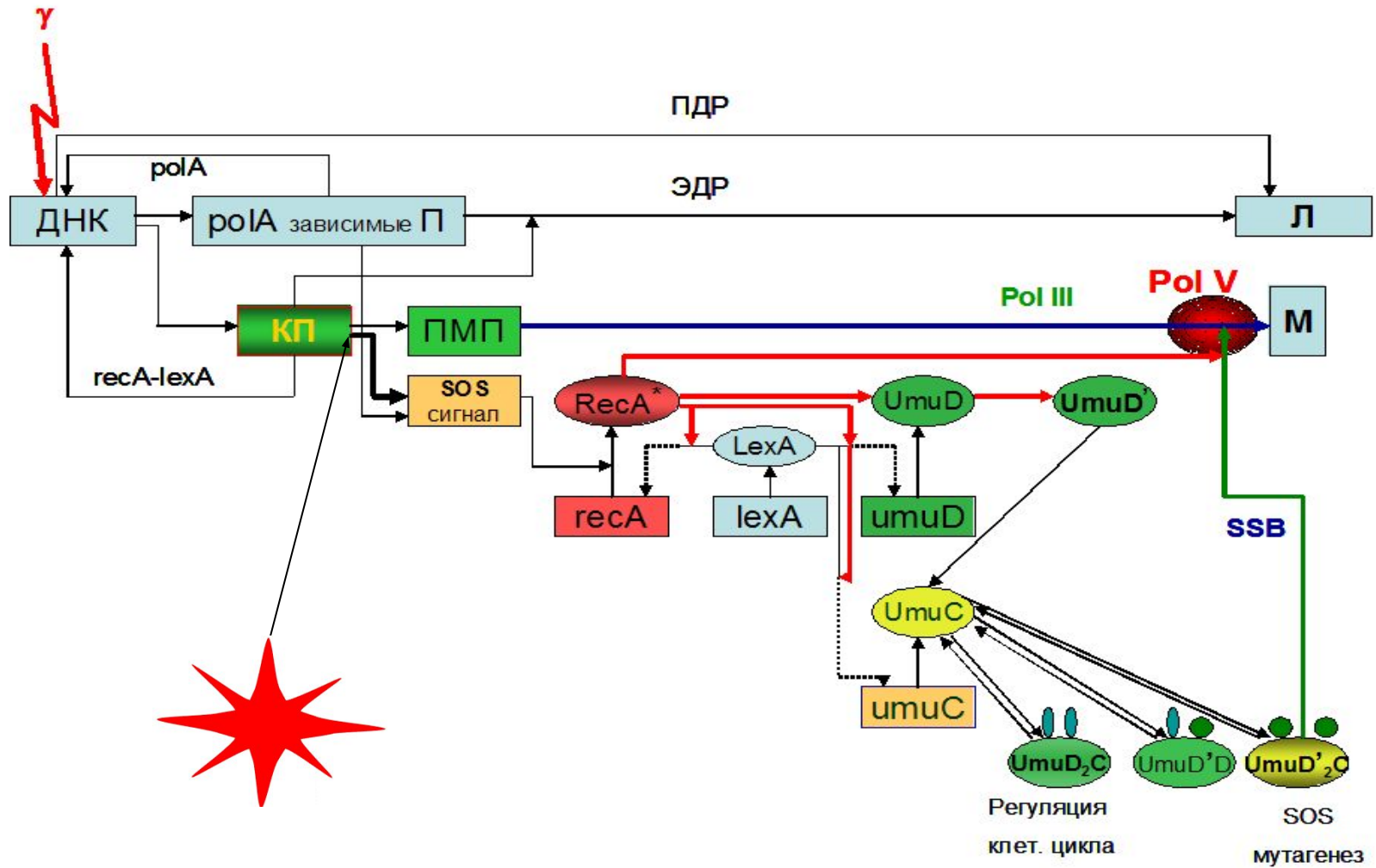
Из этого следует, что зависимость $N_m/N(D)$ может быть существенно нелинейной, так как определяется взаимодействием двух повреждений в процессе их репарации. При малых дозах облучения, когда $aD \ll 1$, на основании этого уравнения получаем квадратичную зависимость, которая с увеличением дозы выпрямляется.

Противоречия:

Во-первых, при дозах, при которых реализуется квадратичная зависимость, величина l , судя по выходу первичных повреждений ДНК должна составлять примерно 10^3 нуклеотидов. И если летальное действие излучений обусловлено перекрывающимися участками расчистки в комплементарных 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 быстро репарируются.

Для получения необходимого соответствия предложенного объяснения экспериментальным данным требуется допустить размер деградации ДНК (значение параметра l) достигающий 10^5 нуклеотидов и более. Однако у клеток дикого типа такой степени деградации ДНК не наблюдается.

3. Биофизическая модель.

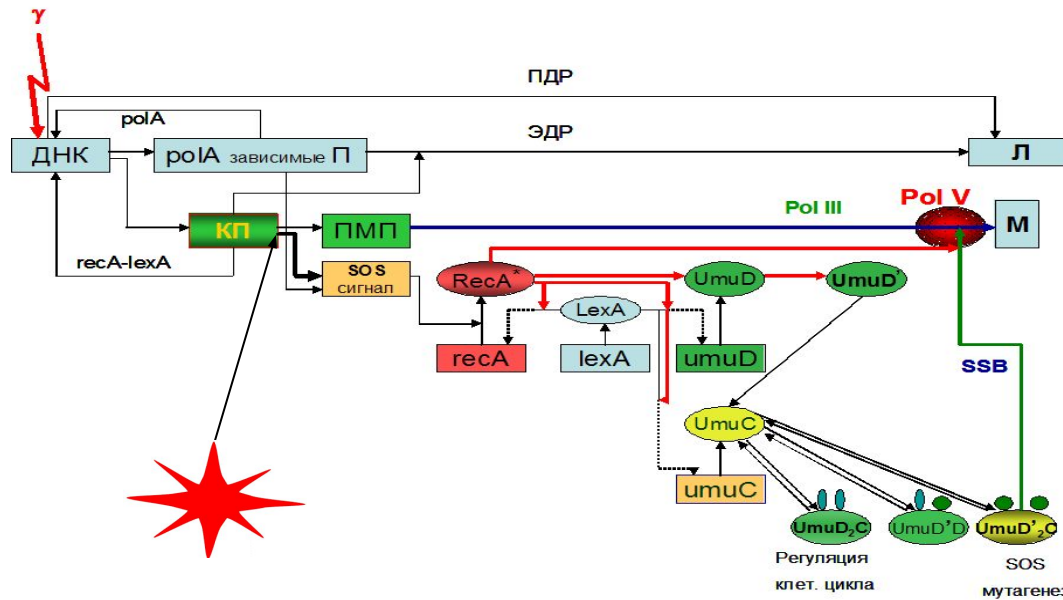


При действии ионизирующего излучения в ДНК клеток с некоторой частотой образуются прямые двунитевые разрывы (ПДР) ДНК, приводящие к летальному для клетки событию, и широкий спектр первичных повреждений ДНК (γ -сайты). Первичные γ -сайты включают в себя разрывы фосфодиэфирных связей с разными концевыми группами, модификации азотистых оснований, АП-сайты, сшивки ДНК-ДНК, ДНК-белок. ОР ДНК, имеющие 3'ОН-5'PO₄ концы, восстанавливаются ДНК-лигазой. Разрывы с 3' PO₄ -5'ОН, 3' ОН -5'ОН концевыми группами, 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. 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 оппозитных нитях ДНК, разрывы главной цепи валентности, нарушения сахара. 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 (*SOS-сигнал*) в облученных клетках. Формирование SOS-сигнала также происходит и из части polA-зависимых повреждений, которые не смогли быть восстановлены этим типом репарации и стали объектом атаки экзонуклеазных активностей различных ферментов. КП подвергаются медленной репарации с участием recA-lexA генов.

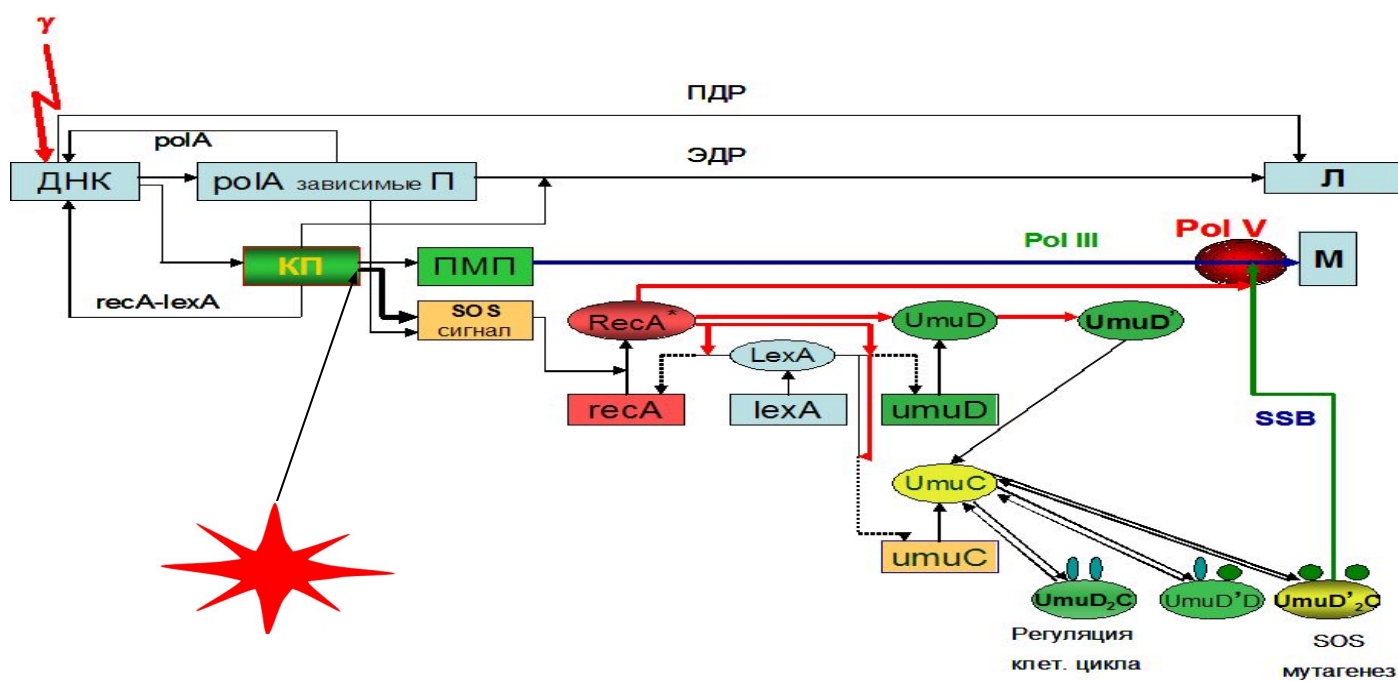
Из неотрепарированных данным типом репарации КП и повреждений, которые не смогли быть отрепарированы *polA*-зависимой и *recA-lexA*-зависимой репарационными системами, формируются энзиматические двунитевые разрывы (ЭДР) ДНК. ЭДР вместе с ПДР ДНК являются летальными событиями для клеток. Возникновение SOS-повреждения в клетке активирует конститутивный *RecA*-белок в *RecA*-протеазу (*RecA*^{*}). Повышение уровня *RecA*-протеазы приводит к дерепрессии индуцибельных генов, и прежде всего генов *recA*, *umuD*, *umuC*, а также *lexA* и других генов. Увеличение экспрессии *lexA*-гена не приводит к повышению уровня *LexA*-белка, поскольку он сразу расщепляется *RecA*-протеазой /Е.А.Красавин, С.Козубек, 1991/. *RecA* протеаза в ходе SOS ответа расщепляет *UmuD* белок, переводя его в активную *UmuD'* форму. *UmuD'* тесно связывается с *UmuC*-белком в стабильный *UmuD'*₂*C* 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. *UmuD'*₂*C* комплекс (*UmuD'*₂*C*), включаясь в регуляцию клеточного цикла, останавливает репликативный синтез ДНК при наличии SOS-индуцирующих повреждений и позволяет осуществить процесс TSL.

Комплекс UmuDD'С играет ингибирующую роль в SOS-мутагенезе, секвестрируя UmuD' активности. Участие ДНК-полимеразы III или некоторых её субъединиц приводит к повышению эффективности TLS. Её участие может реализовываться либо на стадии инициации TLS, либо этот фермент способствует протягиванию комплекса UmuC, UmuD', RecA, SSB через сайты с повреждениями.

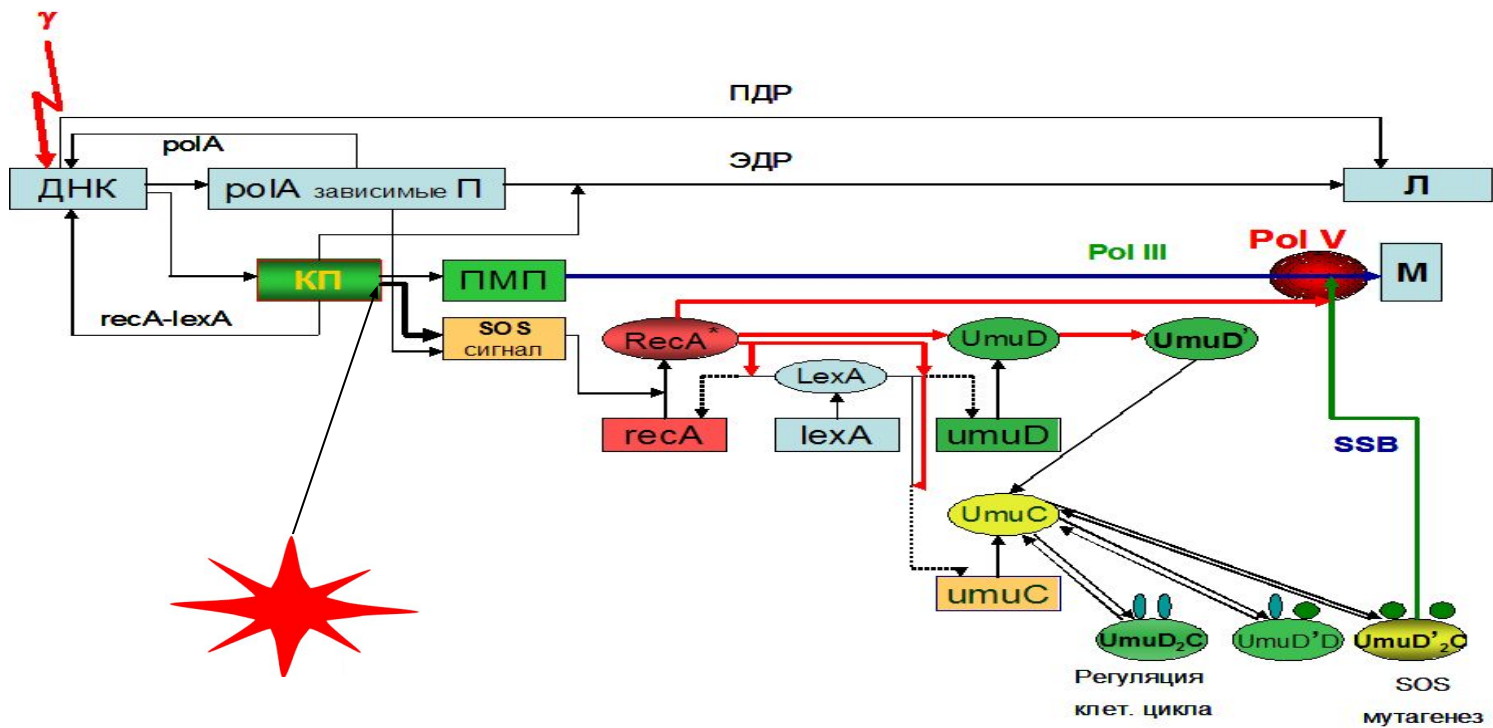
Таким образом, в биофизической модели закрепление премутационного повреждения в мутацию точкового типа при действии ионизирующих излучений есть результат работы различных энзиматических механизмов и в том числе, как одного из главных - мультиферментного комплекса, включающего в себя индуцибельную ДНК-полимеразу V (UmuD'₂C), RecA-протеазу, SSB-белки, субъединицы ДНК-полимеразы III. В разработанной модели реализация индуцибельного мутационного процесса у клеток E.coli отражает лишь главные, магистральные пути индуцированного мутагенеза, но она даёт представление о сложности этого процесса у данного типа клеток при действии ионизирующих излучений.



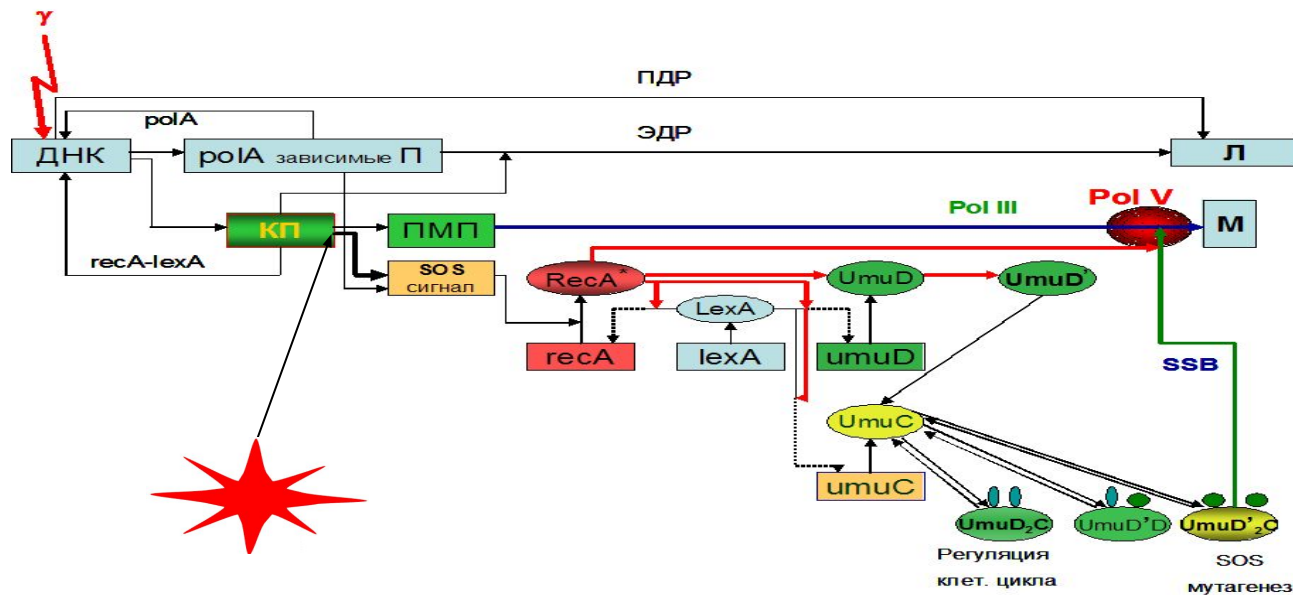
Из неотрепарированных данным типом репарации КП и повреждений, которые не смогли быть отрепарированы *polA*-зависимой и *recA*-*lexA*-зависимой репарационными системами, формируются энзиматические двунитевые разрывы (ЭДР) ДНК. ЭДР вместе с ПДР ДНК являются летальными событиями для клеток. Возникновение SOS-повреждения в клетке активирует конститутивный *RecA*-белок в *RecA*-протеазу (*RecA*^{*}). Повышение уровня *RecA*-протеазы приводит к дерепрессии индуцибельных генов, и прежде всего генов *recA*, *umuD*, *umuC*, а также *lexA* и других генов. Увеличение экспрессии *lexA*-гена не приводит к повышению уровня *LexA*-белка, поскольку он сразу расщепляется *RecA*-протеазой.



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. Дегградация мутагенной активности UmuD' субъединицы и снижение активности ДНК-полимеразы V позволяет клетке вернуться в стационарное состояние и репарировать повреждения безошибочными путями репарации. UmuD₂C комплекс (UmuD₂C), включаясь в регуляцию клеточного цикла, останавливает репликативный синтез ДНК при наличии SOS-индуцирующих повреждений и позволяет осуществить процесс TSL.



UmuC, UmuD', RecA, SSB через сайты с повреждениями. Комплекс **UmuDD'C** играет ингибирующую роль в SOS-мутагенезе, секвестрируя **UmuD'** активности. Участие ДНК-полимеразы III или некоторых её субъединиц приводит к повышению эффективности TLS. Её участие может реализовываться либо на стадии инициации TLS, либо этот фермент способствует протягиванию комплекса

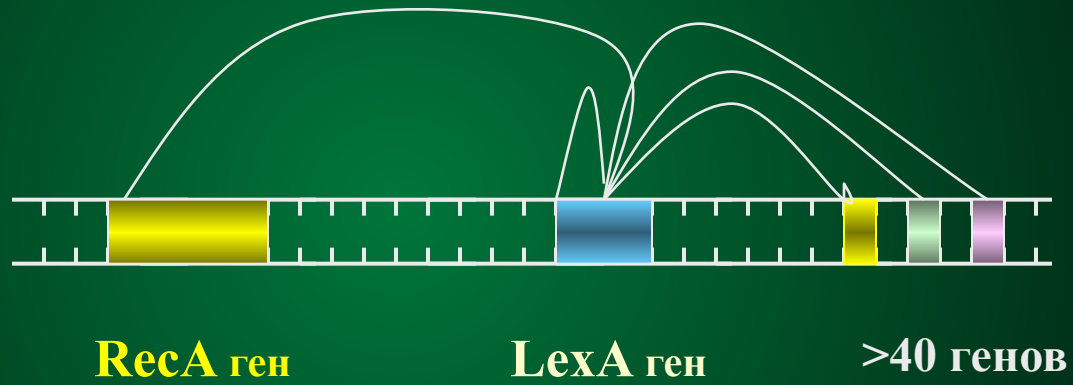


Таким образом, в биофизической модели закрепление премутационного повреждения в мутацию точечного типа при действии ионизирующих излучений есть результат работы различных ферментативных механизмов и в том числе, как одного из главных - мультиферментного комплекса, включающего в себя индуцибельную ДНК-полимеразу V ($UmuD'_2C$), RecA-протеазу, SSB-белки, субъединицы ДНК-полимеразы III. В разработанной модели реализация индуцибельного мутационного процесса у клеток *E. coli* отражает лишь главные, магистральные пути индуцированного мутагенеза, но она даёт представление о сложности этого процесса у данного типа клеток при действии ионизирующих излучений.

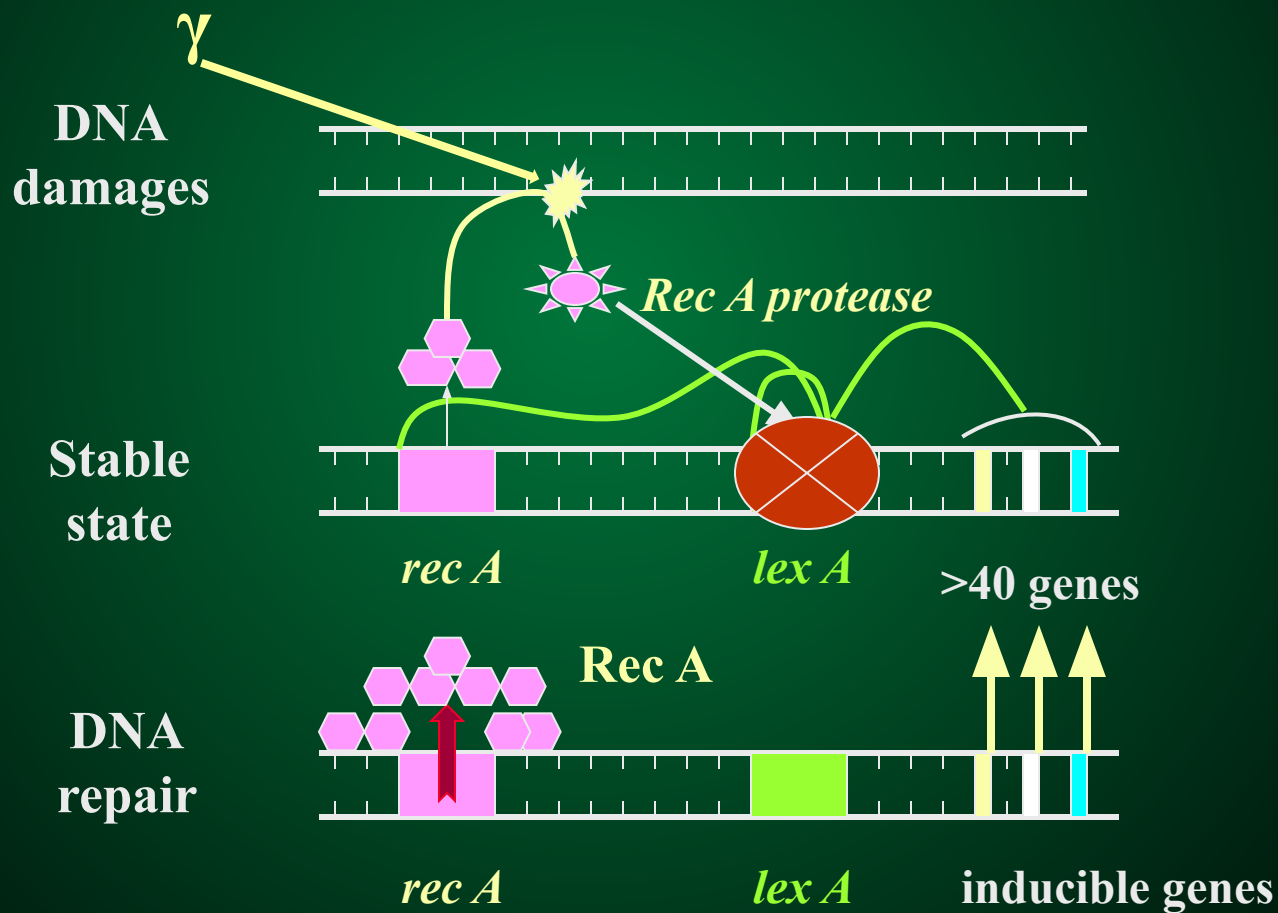
SOS –тест системы



SOS регуляция

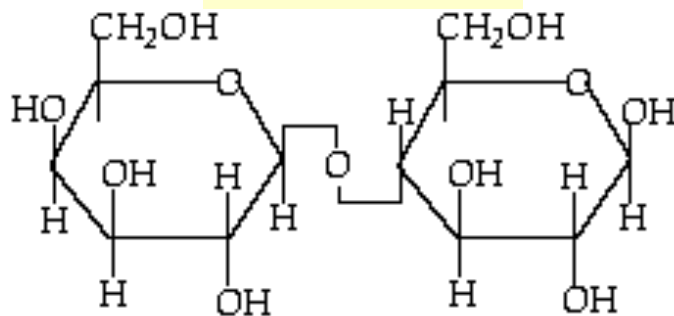


SOS-репарация ДНК



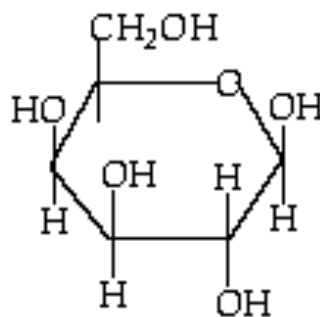
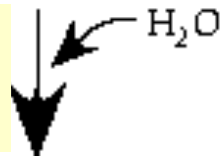
β -галактозидаза

лактоза

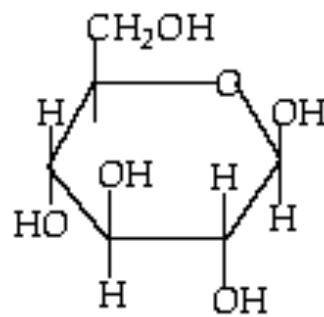


β -галактозидаза

lacZ

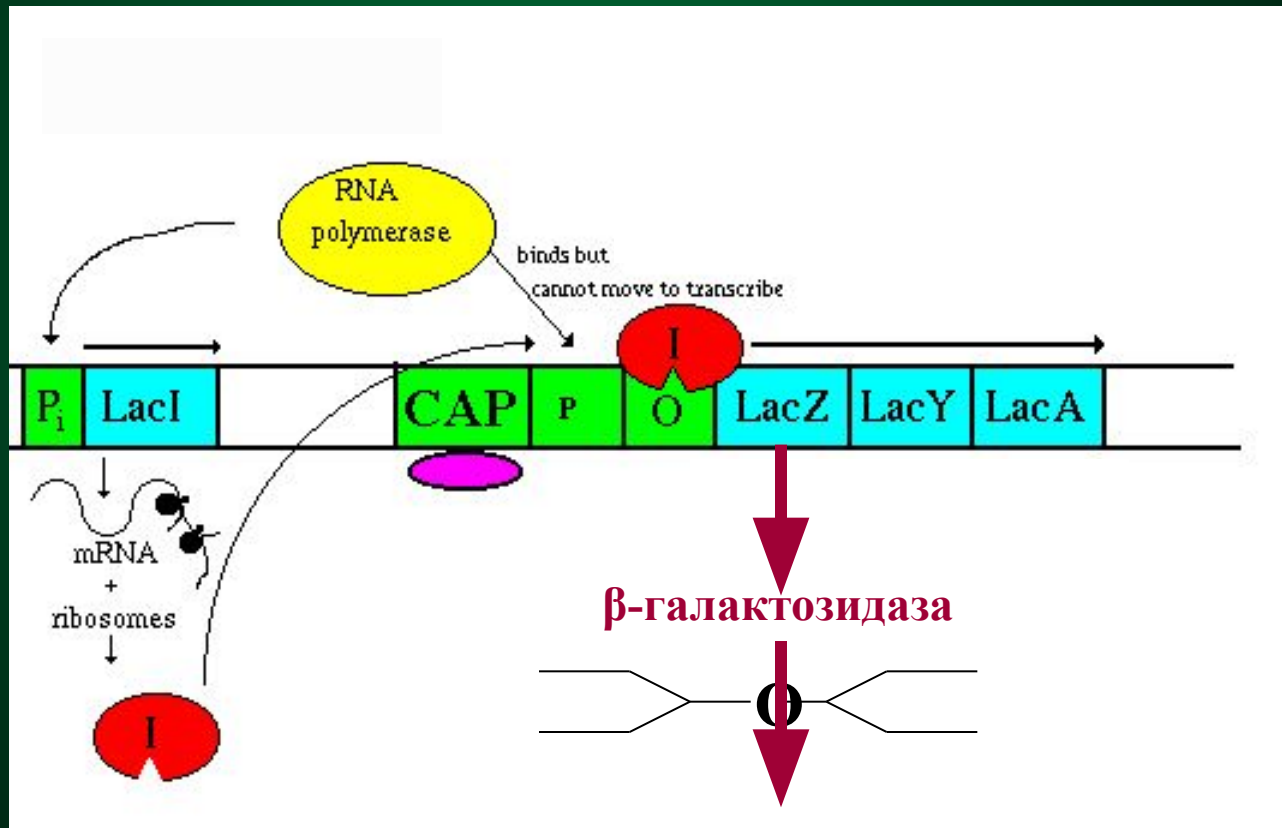


галактоза



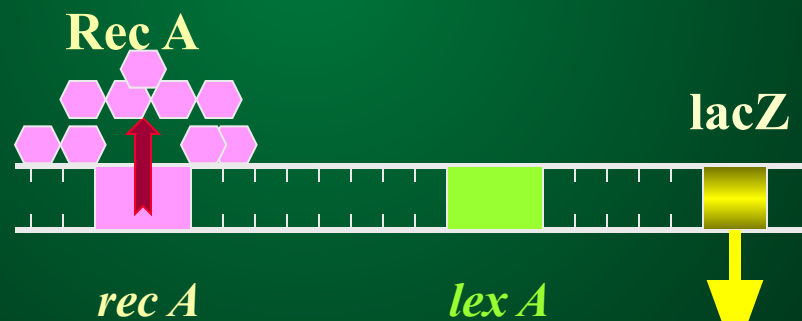
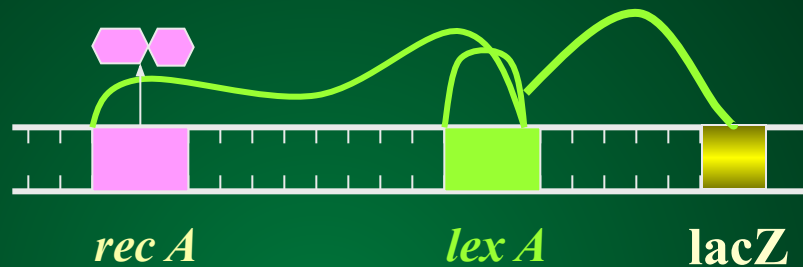
глюкоза

Lac-оперон

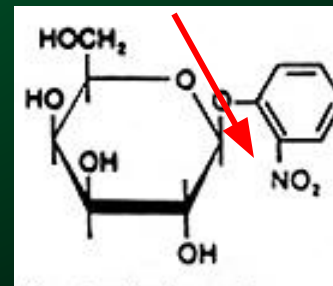




SOS-хромотест



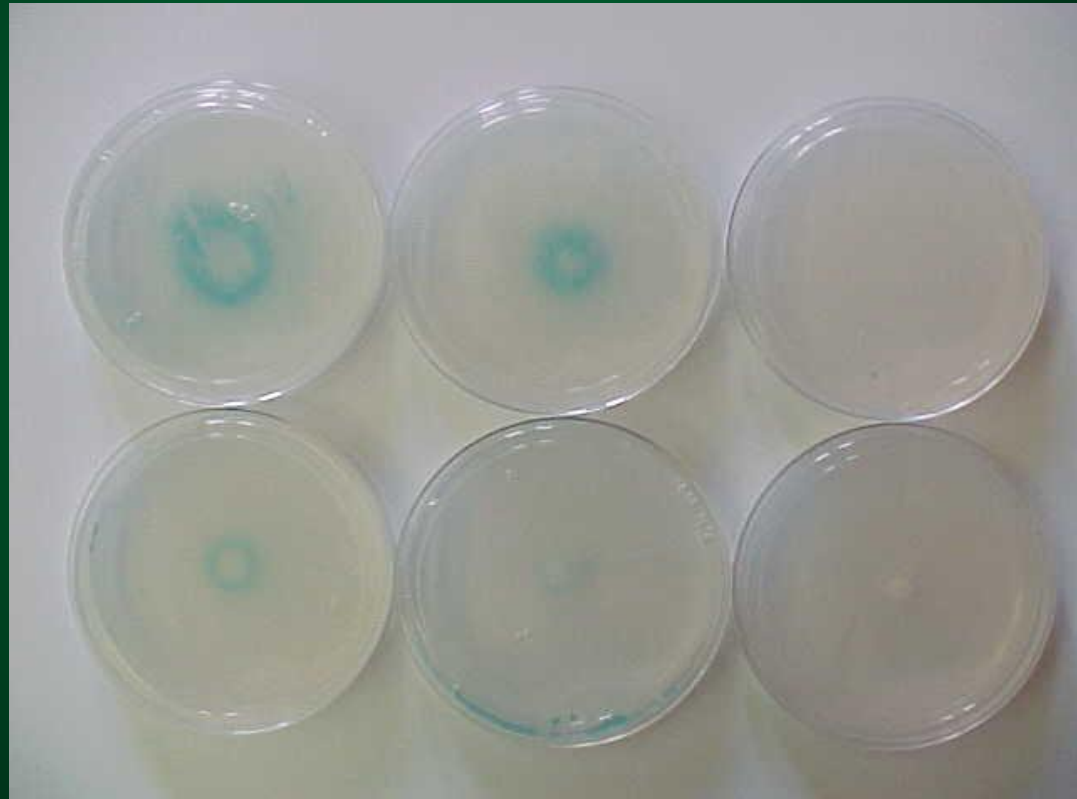
β -галактозидаза



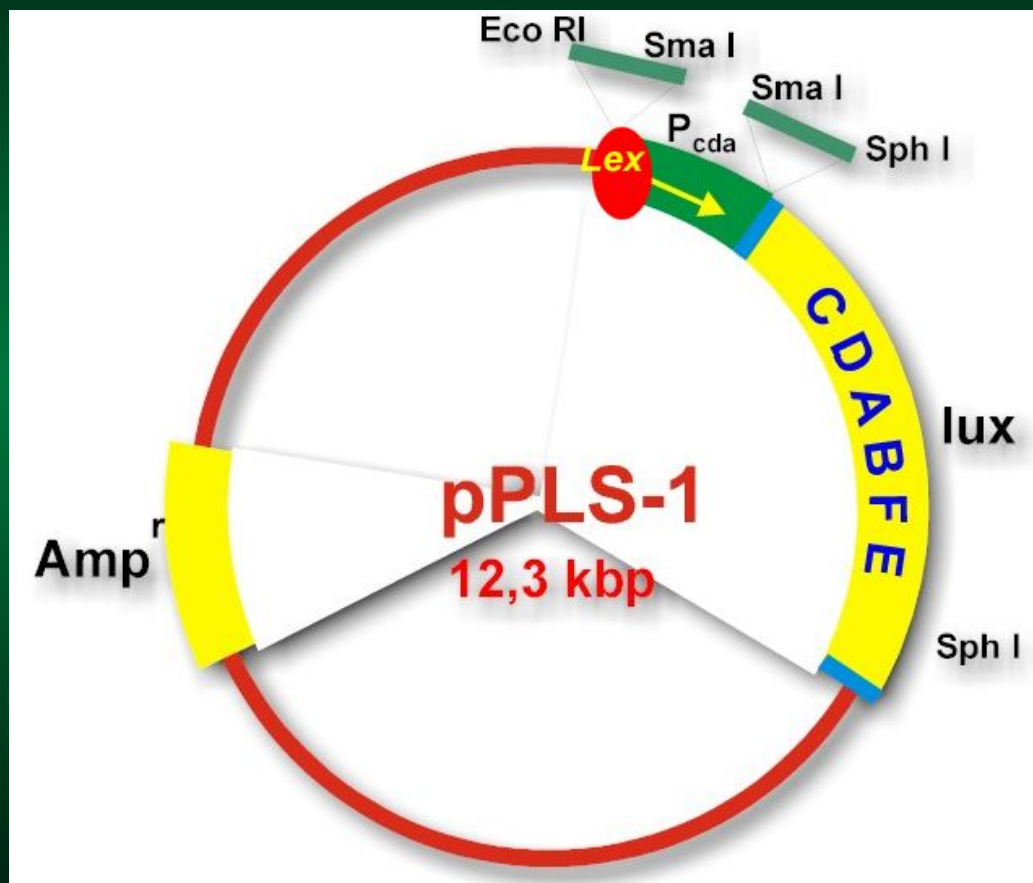
ОНФГ



SOS-хромотест



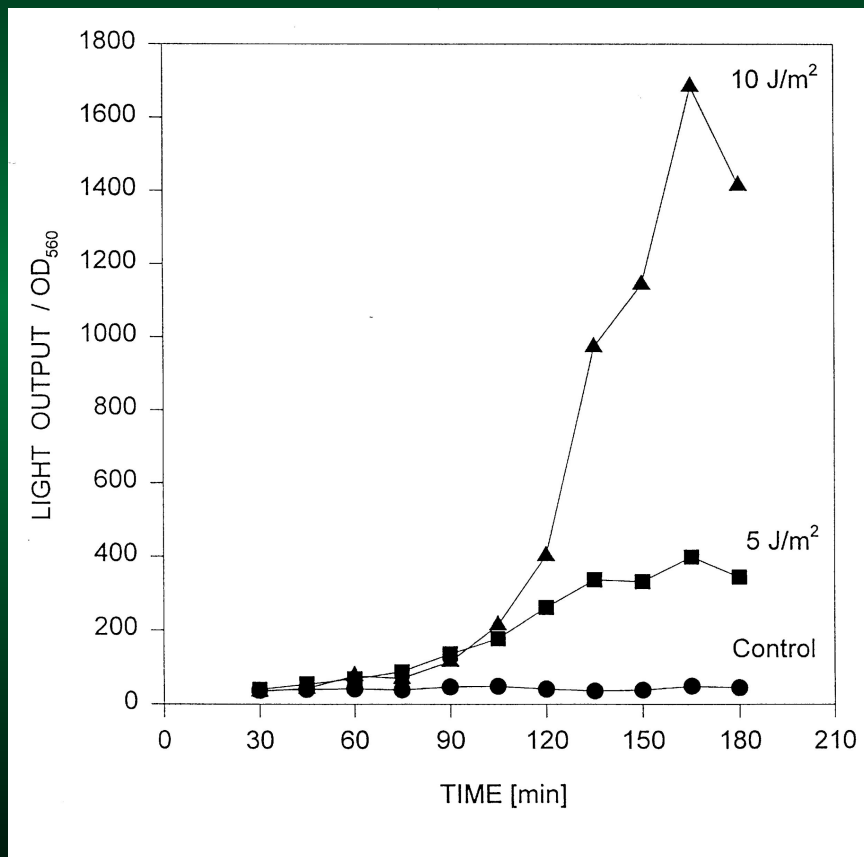
Конструкция рPLS-1 плазмиды



luciferase



SOS – ответ при УФ-облучении



**Кинетика SOS
lux индукции**

Чувствительность SOS-lux теста к различным генотоксинам

Genotoxin	Lower limit of detection
MMC	$4.3 \cdot 10^{-9} \text{ M}$
MNNG	$7.1 \cdot 10^{-7} \text{ M}$
NA	$4.6 \cdot 10^{-6} \text{ M}$
DMS	$7.5 \cdot 10^{-6} \text{ M}$
H ₂ O ₂	$8.3 \cdot 10^{-5} \text{ M}$
CH ₂ O	$6.5 \cdot 10^{-3} \text{ M}$
UV (254 nm)	0.32 J/m^2
γ-rays	2.56 Gy

Сравнительная оценка чувствительности различных тест-систем

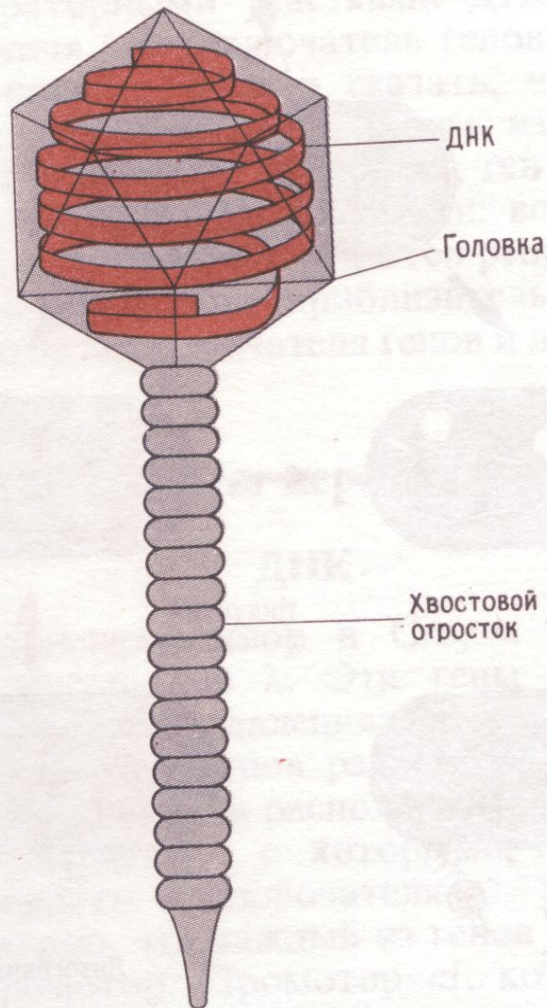
Genotoxin (unit of measurement)	Lower limit of detection		
	SOS <i>lux</i> test	SOS chromotest	umu test
MMC (M)	$5.0 \cdot 10^{-9}$	$1.7 \cdot 10^{-8}$	$1.5 \cdot 10^{-7}$
MNNG (M)	$7.1 \cdot 10^{-7}$	$5.0 \cdot 10^{-7}$	$2.0 \cdot 10^{-6}$
DMS (M)	$7.5 \cdot 10^{-6}$	$6.7 \cdot 10^{-6}$	$3.0 \cdot 10^{-4}$
γ -rays (Gy)	2.56	$\angle 5$	2-3

λ

λ фаг

Частица фага λ

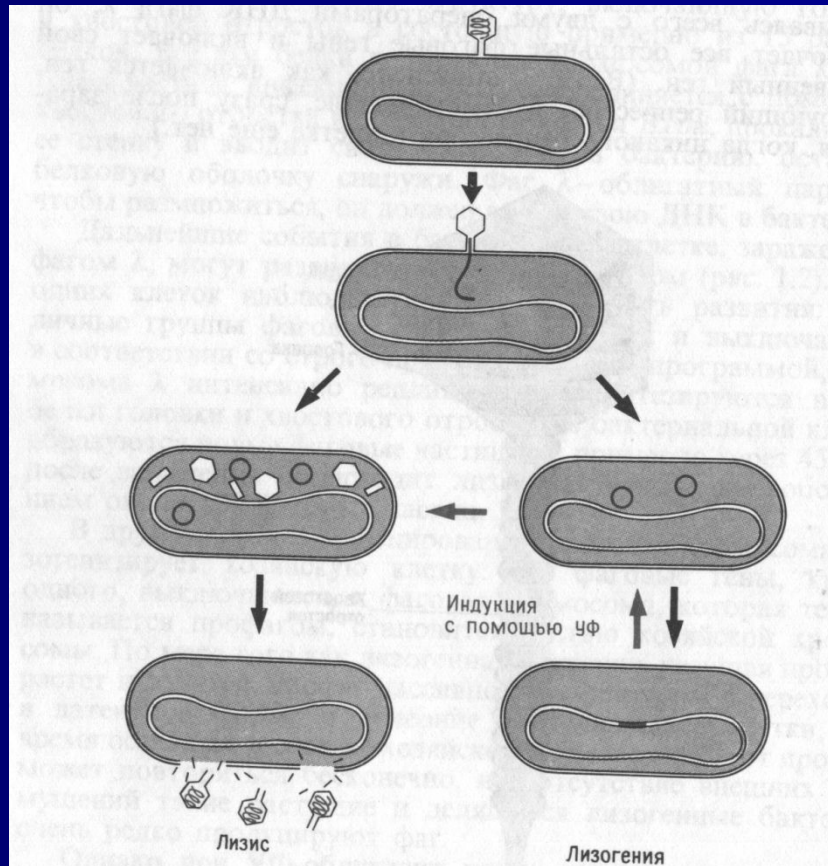
λ



- Хромосома фага λ длиной около 50000 пар оснований находится в головке фага, где она намотана на белковую сердцевину.

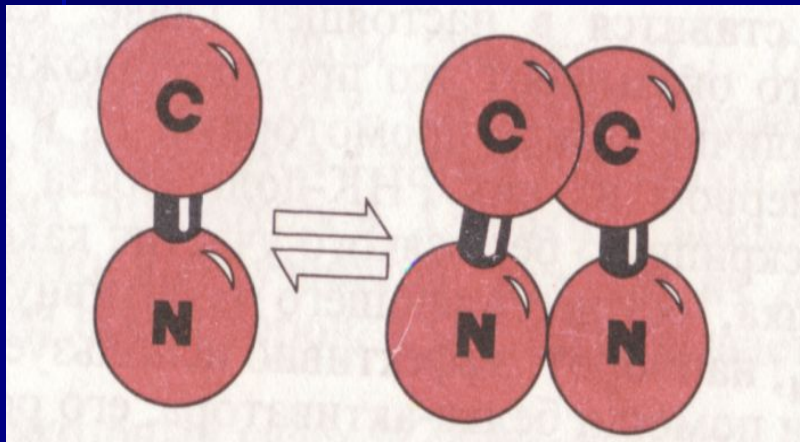
Пути развития фага λ

λ



Репрессор

λ

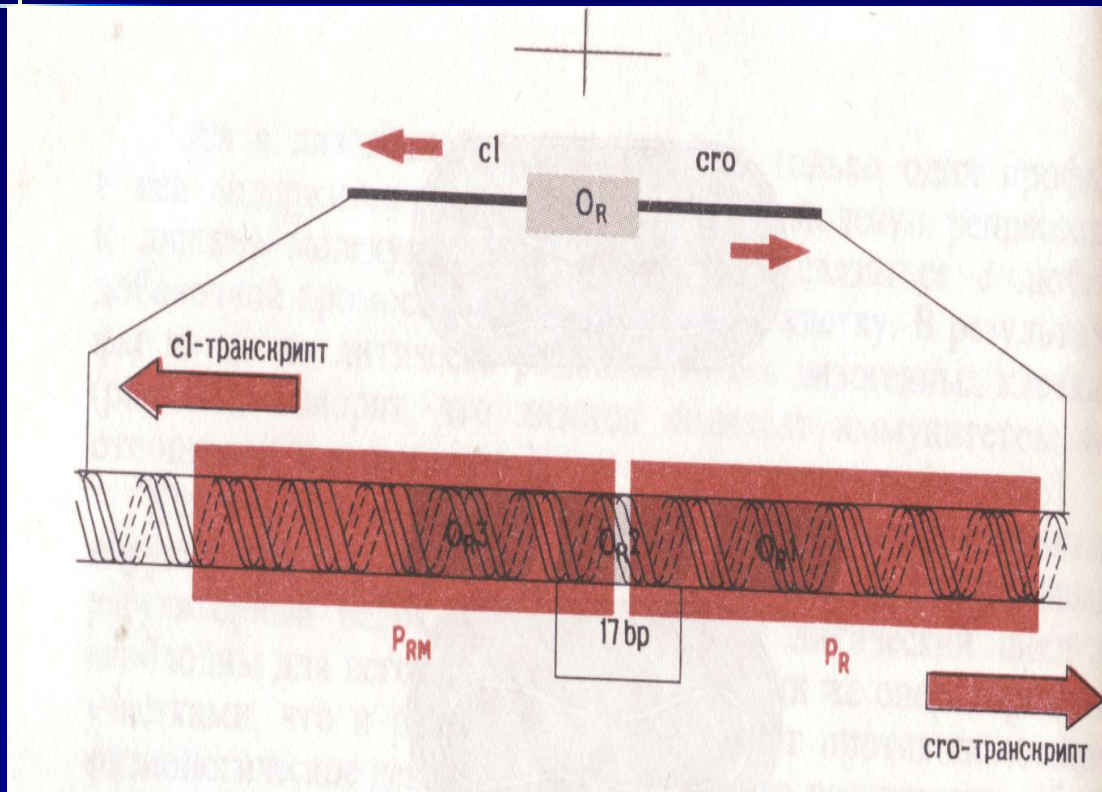


- Репрессор-белок из 236 аминокислот.
- Димер формируется главным образом за счет контактов между карбокси-концевыми доменами.

Белок Cro



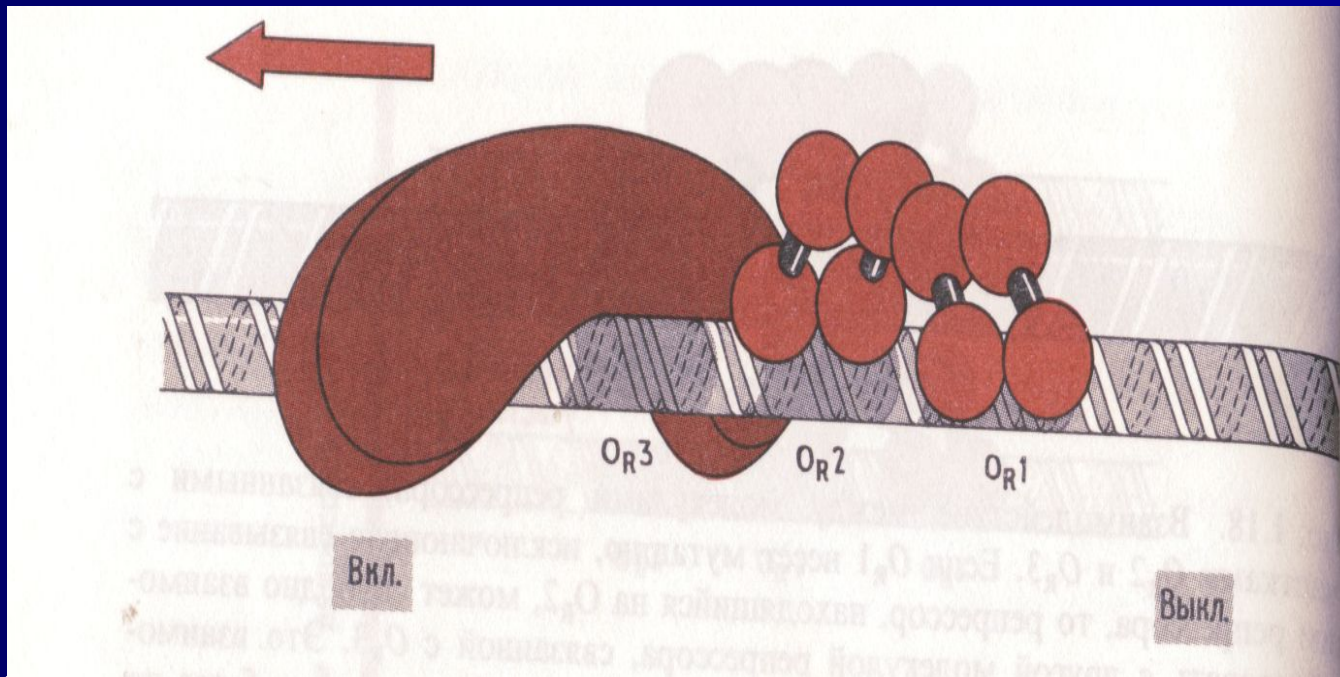
- Cro -control of *repressor* and other genes



- Два промотора, расположенные «спина к спине», запускают движение полимеразы в противоположные стороны. Правый оператор состоит из трех частей и перекрывается с обоими промоторами. Каждый из трех участков, образующих оператор, называют операторным участком.

Действие репрессора и Cro

Репрессор, связанный с O_{R2} и O_{R1} .



- Репрессор, связанный с O_{R1} и O_{R2} , стимулируют промотор P_{RM} и одновременно выключает P_R .

**Как УФ-облучение
изменяет поведение
лизогенных клеток?**

Расщепление репрессора белком RecA.

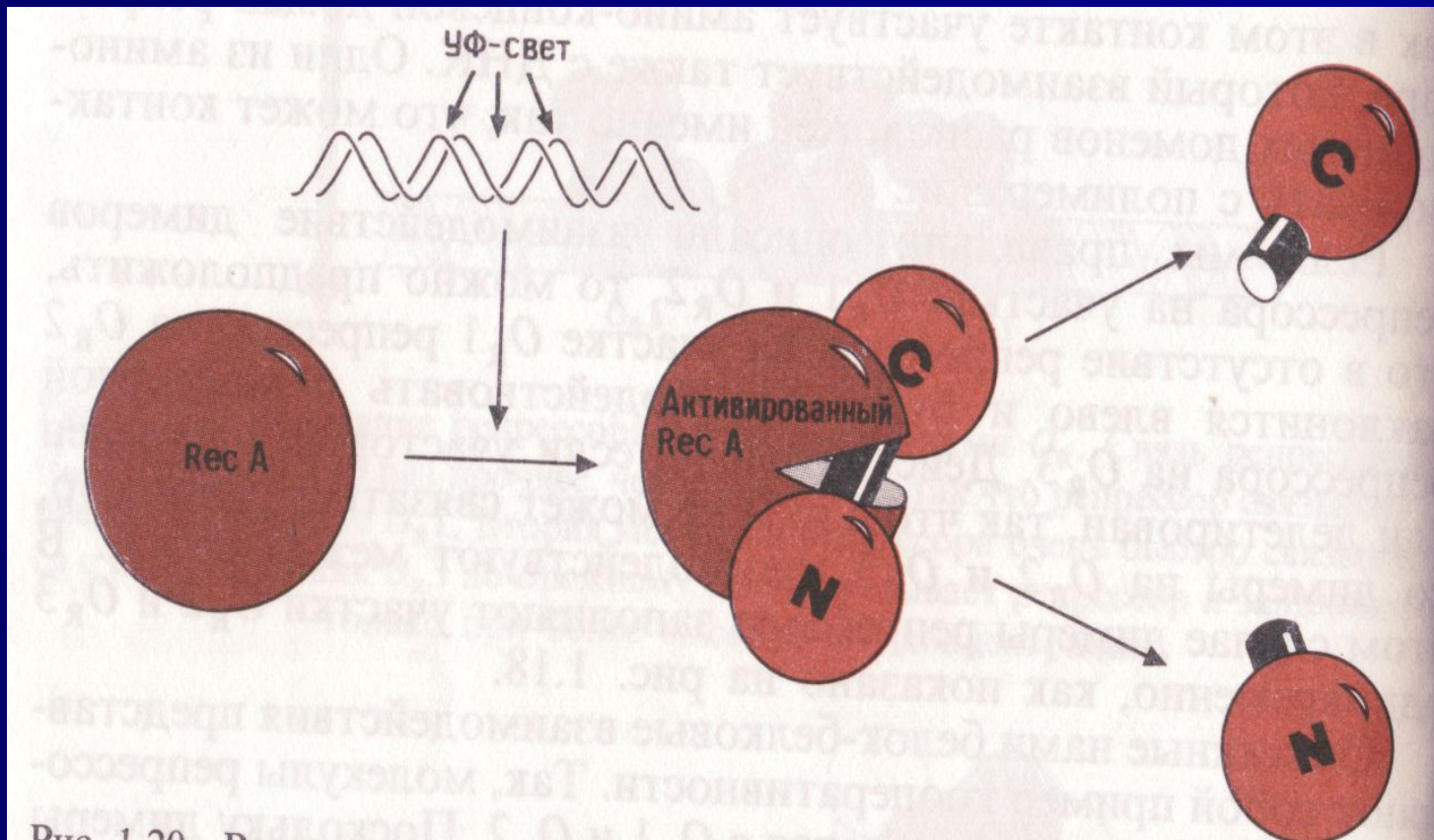
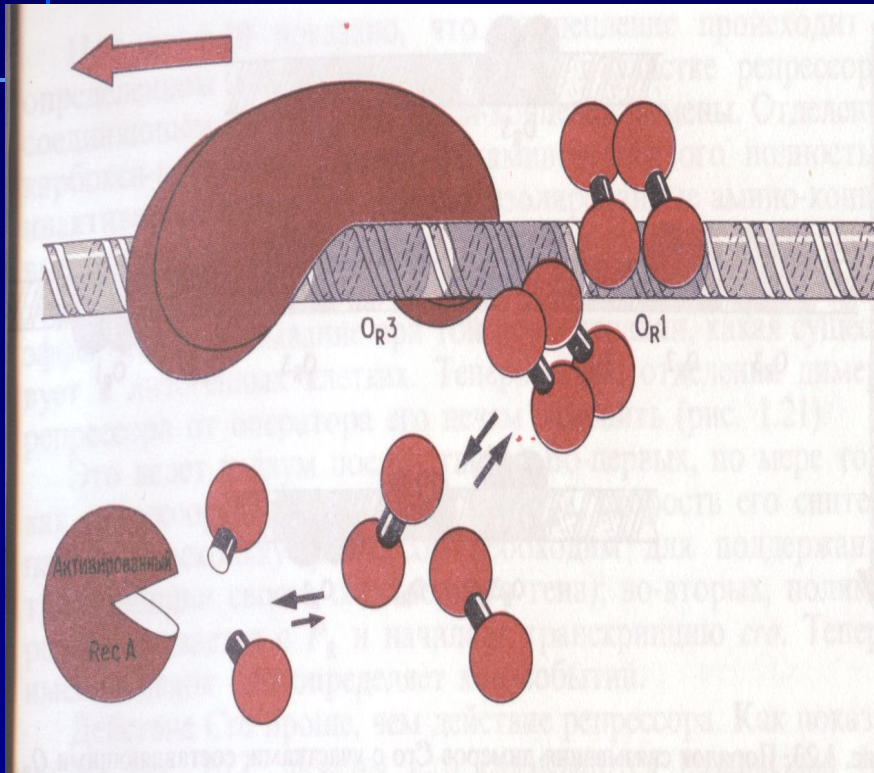
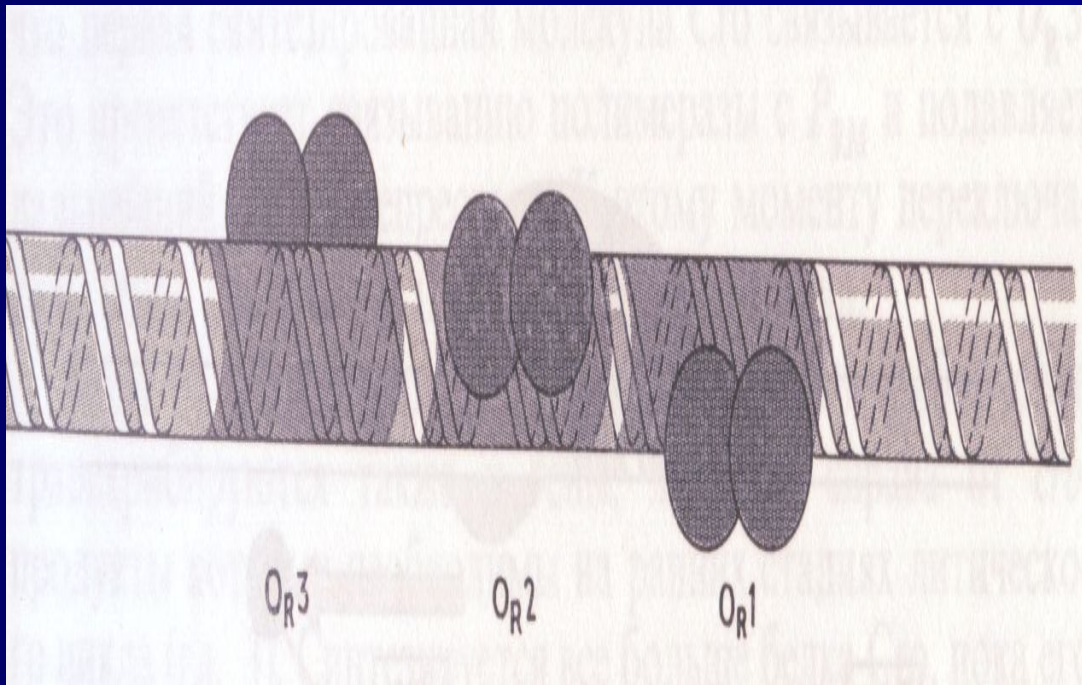


Рис. 1.20. Д.



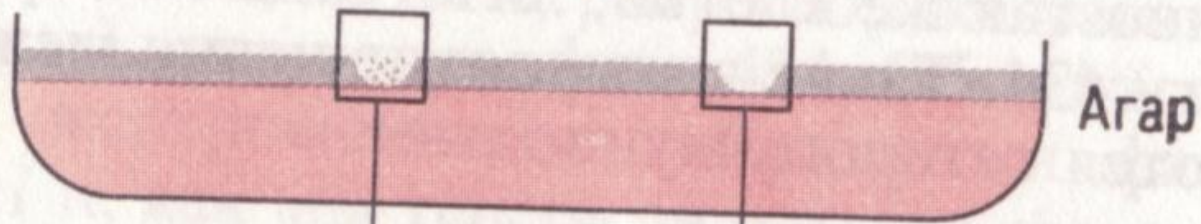
- Расщепленные молекулы репрессора не могут образовывать димеры, поэтому в результате облучения они отсоединяются от оператора и не замещаются другими молекулами.

Связывание белка Cro с O_R .

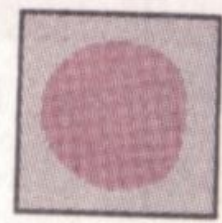


- Димеры Cro независимо связываются с каждым из трех участков оператора.

Бактериальный газон

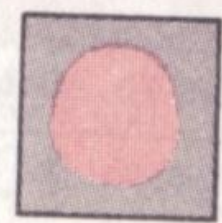


Лизогены

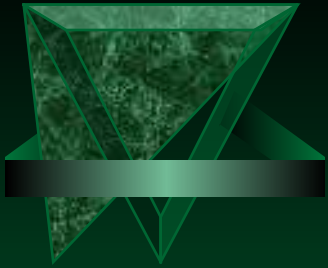


Мутные
бляшки

Область
лизиса



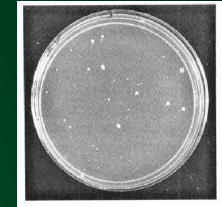
Прозрачные
бляшки



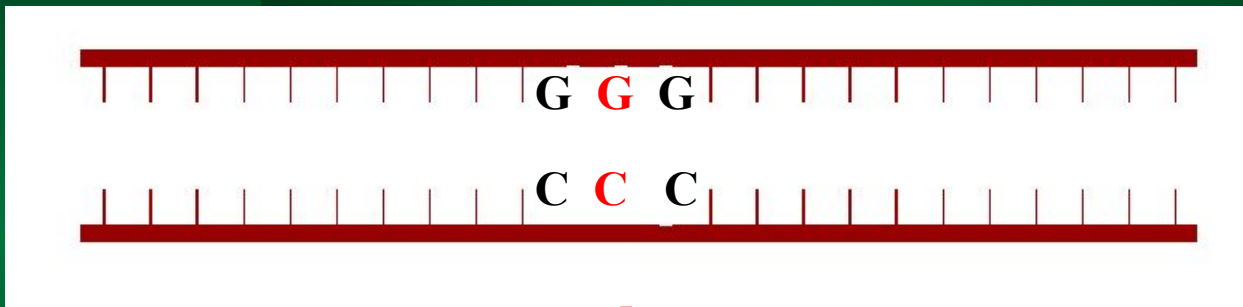
Мутатест

(тест Эймса)

Мутация his G46

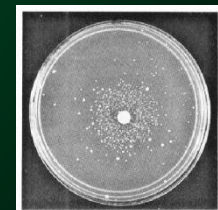


Клетки не растут на среде без гистидина

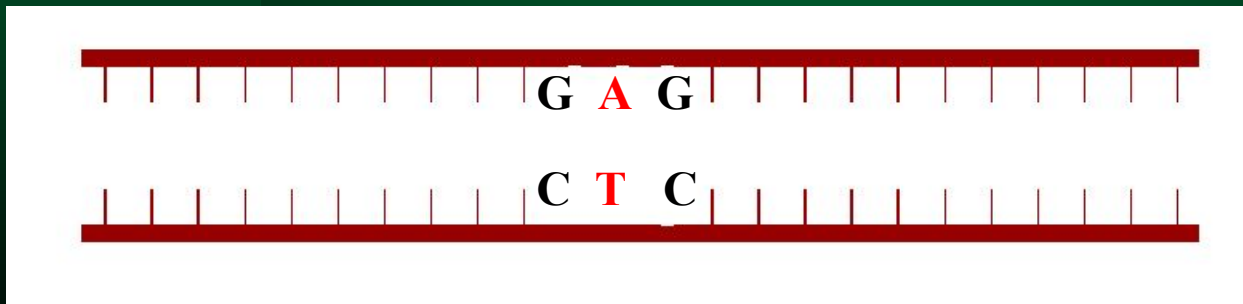


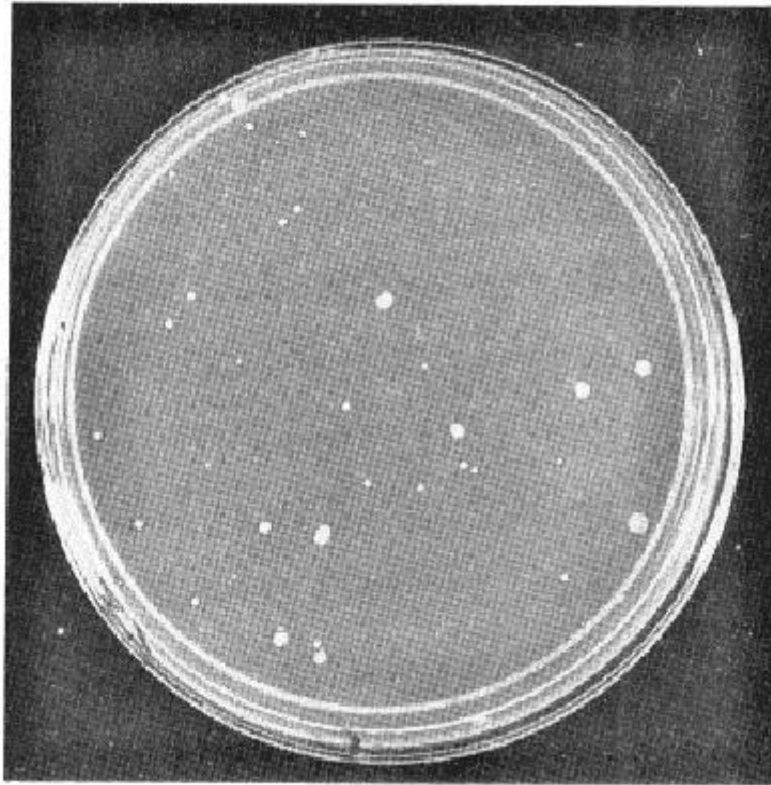
реверсия

Дикий тип

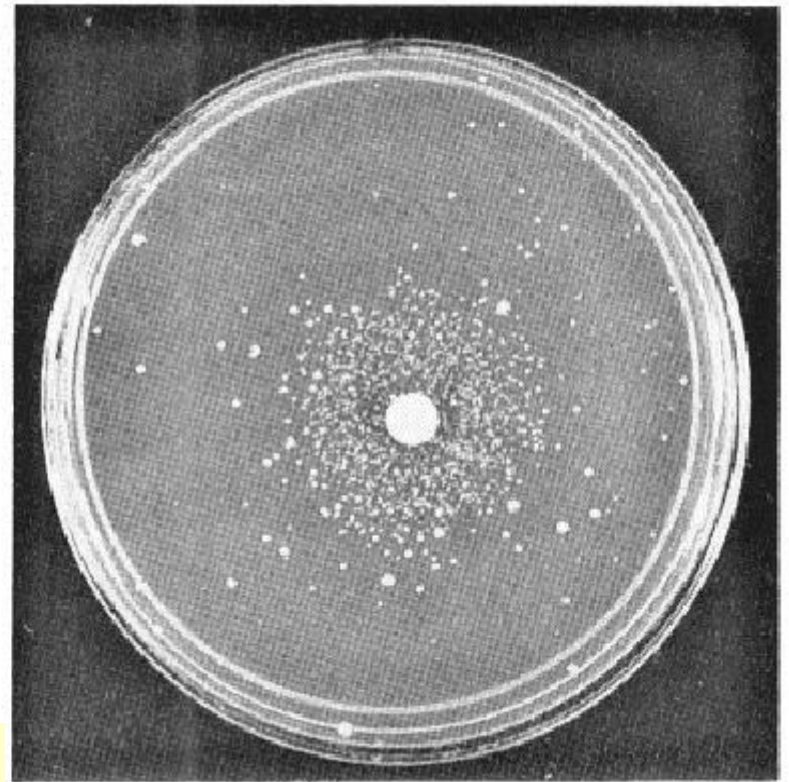


Клетки растут





КОНТРОЛЬ



МУТАГЕН