

Г. Д. ЗАСУХИНА, В. А. НЕСМАШНОВА, Г. Н. ЛЬВОВА

РОЛЬ РЕПАРАТИВНЫХ МЕХАНИЗМОВ КЛЕТКИ В РЕАЛИЗАЦИИ СПОНТАННЫХ И ИНДУЦИРОВАННЫХ МУТАЦИЙ У ВИРУСОВ ПОЗВОНОЧНЫХ

(Представлено академиком Н. П. Дубининым 14 III 1973)

В последние годы был обнаружен один из механизмов, влияющий на формирование мутаций и связанный с репаративными системами клетки. При этом было показано, что как часть предмутационных повреждений, вызванных физическими и некоторыми химическими мутагенами, так и в ряде случаев «спонтанные» повреждения могут восстанавливаться в клетках с активной системой репарации (¹, ²). На модели ДНК-содержащих вирусов позвоночных были получены данные о большей выживаемости вируса после у.-ф. облучения в клетках с активной системой репарации по сравнению с репаративной дефектной системой (³). Кроме того, был получен ряд данных, свидетельствующих о восстановлении повреждений, вызванных физическими и химическими мутагенами у РНК-содержащих вирусов в клетках с активной системой репарации (⁴, ⁵). Представленные в настоящем сообщении результаты включают данные по закономерностям мутационного процесса как спонтанного, так и индуцированного метилметансульфонатом на модели вируса западного лошадиного энцефаломиелита (WEE) в клетках с активной (первичные клетки почек сирийского хомяка) и дефектной (перевиваемые линии этих клеток) системой репарации. Первичные и перевиваемые клетки почек сирийского хомяка резко отличались по активности репаративной системы «вырезания», о чем судили по показателям кинетики удаления тиминовых и урациловых димеров, образующихся после у.ф. облучения, из клеточных ДНК и РНК (⁶, ⁷). В работе был использован крупнобляшечный мутант вируса WEE, образующий на 3 день после инфицирования в культурах клеток куриного эмбриона 95—99% бляшек диаметром 4—6 мм. Учет мутаций проводили по признаку размера бляшек.

Пассирование вируса WEE проводили в первичных и перевиваемых клетках почек сирийского хомяка, которые первоначально инфицировали вирусом из расчета 1—5 БОЕ на клетку и пассажи вируса проводили каждые 24 часа. На уровне 1, 5 и 9 пассажей проводили титрование вируса методом бляшек, при этом бляшки диаметром равные или меньше 2 мм считали мелкими, бляшки диаметром более 2,5 мм считали крупными.

Первичная и перевиваемые линии клеток хомяка характеризовались одинаковой чувствительностью к вирусу WEE и титры вируса (lg БОЕ/мл) в этих клетках после 1 суток культивирования составляли 7,0—7,5. Данные по выходу мелкобляшечных вариантов вируса, которые образовались в процессе пассирования в двух клеточных культурах следующие.

Пассажи	1	5	9
Число мелкобляшечных вариантов, %			
Первичные клетки	5	0	4
Перевиваемые клетки	13	36	76

Видно, что уже на уровне 1 пассажа (что соответствует примерно 4 вирусным циклам) образуется 5% мелких бляшек в первичных клетках хомяка (с активной системой репарации); тогда как в перевиваемых клетках

(с дефектной системой репарации) аналогичных вариантов было более чем в 2 раза больше (процент мелкобляшечных вариантов вычисляли при подсчете примерно 100 бляшек в результате 3—4 проведенных опытов).

При этом по мере пассирования число мелкобляшечных вариантов в перевиваемых клетках возрастало и к 9 пассажу достигало 76%, тогда как в первичных культурах число мелкобляшечных вариантов оставалось на том же уровне.

Одним из вероятных объяснений разной мутабельности вируса в клетках одного вида животного, для которых характерна равная чувствительность к вирусу, является отсутствие восстановления «спонтанных» ошибок в перевиваемых клетках с дефектом системы репарации, что приводит

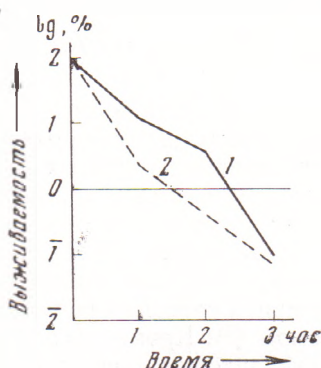


Рис. 1. Кинетика инактивации вируса WEE при воздействии метилметансульфонатом на вирус, репродуцирующийся в первичных и перевиваемых клетках почек сирийского хомяка. Клетки с активной (1) и дефектной (2) системой репарации

к большему возникновению и соответственно накоплению мутаций в потомстве вируса. Дополнительным доказательством, свидетельствующим в пользу участия репарационных механизмов клетки для формирования мутаций у вируса, могли бы служить опыты по индукции мутаций. С этой целью был использован метилметансульфонат, основным эффектом которого считают образование однонитевых разрывов в ДНК, которые являются следствием двух причин: прямого действия мутагена и вторичного — за счет удаления алкилированных оснований с помощью эндонуклеаз. Перевиваемые клетки, испытанные нами, были дефектны именно по первому этапу репарации — неактивности эндонуклеаз, осуществляющих процесс «вырезания» димеров.

В опытах с метилметансульфонатом ($2 \cdot 10^{-3}$ М) был использован крупнобляшечный мутант вируса WEE, которым инфицировали первичные и перевиваемые клетки из расчета 1—5 БОЕ на клетку, и на репродуцирующийся в клетках вирус воздействовали мутагеном в течение 1, 2, 3 час., после чего клетки отмывали от мутагена, ресуспендировали в свежей среде, разрушали их и проводили титрование вируса методом бляшек с учетом их размеров. Данные этих опытов (в результате подсчета примерно 100 бляшек на каждый срок экспозиции с мутагеном и около 300 бляшек в опытах с контрольным вирусом) следующие.

Время воздействия мутагеном, час.	1	2	3	0 (контроль)
Число мелкобляшечных вариантов, %				
Первичные клетки	2	6	16	1
Перевиваемые клетки	26	17	40	3

Из этого следует, что если в потомстве контрольного вируса при инфицировании первичных клеток образуется 1% мелких бляшек, то в перевиваемых клетках процент их возрастает в 3 раза. Кроме того, видно, что по мере увеличения времени воздействия мутагеном процент мелких бляшек возрастает как в первичных, так и в перевиваемых клетках. Однако к 3 часу воздействия мутагеном в первичных клетках мелких бляшек только 16%, тогда как в перевиваемых 40%. Эти данные также могут быть объяснены как результат репарации части предмутационных повреждений, выз-

ванных мутагеном, в клетках с активной системой репарации и реализации их в мутации в клетках с дефектом по этой системе. При этом процесс восстановления части сублетальных повреждений вируса наблюдался также при анализе кинетики инактивации вируса в первичных и перевиваемых клетках хомяка (рис. 1). Из данных рисунка видно, что в перевиваемых клетках вирус инактивируется при воздействии мутагеном более интенсивно, чем в первичных при 1 и 2 час. экспозиции. К 3 час. воздействия мутагеном различия в показателях инактивации вируса становятся незначительными, что, возможно, зависит от повреждения самой репарирующей системы в первичных клетках.

Таким образом, на основании полученных данных можно считать, что на процесс формирования спонтанных и индуцированных некоторыми мутагенами мутаций у вируса WEE репаративные механизмы клетки оказывают определенное влияние.

Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов
Академии медицинских наук СССР
Московская обл.

Поступило
14 III 1973

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Р. Howard-Flanders, Ann. Rev. Biochem., 37, 175 (1968). ² А. Проэров, Н. Б. Барабанщиков, Генетика, 4, 5 (1968). ³ С. Lytle, Int. J. Radiat. Biol., 19, 329 (1971). ⁴ Г. Д. Засухина, В. В. Чекова, ДАН, 197, 457 (1971). ⁵ Z. Zavodova, Nature New Biol., 233, 123 (1971). ⁶ Н. П. Дубинин, Л. Л. Матусевич и др., ДАН, 203, 693 (1972). ⁷ Г. Д. Засухина, Г. Н. Львова, М. М. Фролова, В кн. Актуальные проблемы вирусологии и профилактики вирусных инфекций, М., 1972, стр. 5.