

ОБЪЕДИНЕННЫЙ  
ИНСТИТУТ  
ЯДЕРНЫХ  
ИССЛЕДОВАНИЙ  
ДУБНА

19-88-151

19-88-151

М.Н.Бонев, С.Козубек, Е.А.Красавин

ВЛИЯНИЕ ГЕНОТИПА  
НА ИНДУКЦИЮ ПРОФАГА  $\lambda$   
У КЛЕТОК *E.coli*  
ИОНИЗИРУЮЩИМИ ИЗЛУЧЕНИЯМИ  
С РАЗНОЙ ЛПЭ

Направлено в журнал "Радиология"

1988

Установлено, что индукция профага  $\lambda$  в сильной степени зависит от функционирования системы SOS-репарации клеток<sup>1,2</sup>. Показано, что мутации в генах *lexA* и *recA* в значительной мере подавляют или полностью ингибируют процесс индукции профага у УФ- и  $\gamma$ -облученных клеток *E. coli*. Влияние генотипического блока различных путей репарации на индукцию профага  $\lambda$  у бактерии при действии плотноионизирующих излучений до последнего времени не выяснено. Между тем, учитывая специфику энерговыделения ионизирующих частиц с высокой линейной передачей энергии /ЛПЭ/ в генетических структурах клеток, можно ожидать, что влияние репарационного генотипа на индукцию профага излучениями с высокой ЛПЭ может отличаться от такового при  $\gamma$ -облучении. С учетом этого целью настоящей работы являлось изучение закономерностей индукции профага  $\lambda$  при действии излучений, различающихся по ЛПЭ / $\gamma$ -лучей и ускоренных ионов гелия/, на клетки *E. coli* с различным репарационным генотипом.

**Материалы и методы.** В экспериментах использовали следующие бактериальные штаммы: W 3110 (*polA*<sup>+</sup>, B1, *thy*<sup>-</sup>, *deoC*,  $\lambda^{\pm}$ ), P 3478 (*polA*<sup>-</sup>, B1, *thy*<sup>-</sup>,  $\lambda^{\pm}$ ), JC 5491 (*Hfr*, *Thr*,  $\lambda^{\pm}$ , *val*, B1, *recB recC*), 30S0 (*recA*-37, *thy*<sup>-1</sup>, *lac*<sup>-</sup>,  $\lambda^{\pm}$ ), *C*<sub>str</sub><sup>r</sup> и *Ay*( $\lambda$ ).

Штамм *C*<sub>str</sub><sup>r</sup> использовали как индикаторный, а *Ay*( $\lambda$ ) - в качестве донора фага  $\lambda$  дикого типа при лизогенизации остальных штаммов.

Клеточные культуры /лизогенные и индикаторный штаммы/ инкубировали в жидкой питательной среде /мясо-пептонный бульон производства Института эпидемиологии и микробиологии имени Н.Ф.Гамалеи МЗ СССР/ в течение 16 ч при температуре 37°C до достижения стационарной фазы /2-4·10<sup>9</sup> клеток/мл/. Затем клетки переносили в 10 мл свежей питательной среды при разведении 1:20 и снова инкубировали в течение 3 ч при температуре 37°C до достижения экспоненциальной фазы роста /3-7·10<sup>8</sup> клеток/мл/ культуры. В этом интервале концентраций индикаторный штамм проявляет максимум эффективности по отношению к формированию негативных колоний /НК/<sup>1,3</sup>.

**Методика и постановка эксперимента.** Последующие этапы работы включали центрифугирование лизогенных клеток в течение 15 мин /8000 g/ и ресуспендирование осадка двух пробирок в 1 мл 0,01 М раствора MgSO<sub>4</sub>. После этого отбирали 1 мл клеточной суспензии, фильтровали через стерильные лавсановые

ядерные фильтры, 18 мм в диаметре /диаметр пор 0,5 мкм/, и промывали в 1 мл дистиллированной воды. Фильтры ставили на специальную подложку, впитывающую проходящую через поры фильтра воду, низкомолекулярные соединения и бактериофаги. Оставшиеся бактериальные клетки смывали с поверхности фильтра встряхиванием в 1 мл 0,01 М раствора MgSO<sub>4</sub>.

Облучение клеток  $\gamma$ -лучами проводили на установке с  $\gamma$ -источником <sup>137</sup>Cs, мощность дозы облучения 35 Гр/мин. Клетки облучали на ядерных фильтрах, расположенных на поверхности мясо-пептонного агара /МПА/ производства Института эпидемиологии и микробиологии им.Н.Ф.Гамалеи МЗ СССР, приготовленных в форме цилиндра с диаметром 12 мм и высотой 2-3 мм в чашках Петри. Во время подготовки и в течение облучения температуру поддерживали на уровне около 0°C.

Для облучения клеток на ускорителе многозарядных ионов фильтры помещали на МПА, разлитый в специально изготовленные металлические чашки. На поверхность фильтров микропипеткой наносили суспензию клеток объемом 0,01 мл. Облучение проводили через 20-30 мин после подсыхания поверхности фильтров.

После облучения клетки смывали с поверхности фильтров встряхиванием в 2 мл 0,01 М раствора MgSO<sub>4</sub>. Суспензию облученных клеток разводили тем же раствором и высевали на чашки Петри, содержащие 15 мл МПА с добавкой 3 мл/л одномолярного раствора MgSO<sub>4</sub>.

Для определения инфекционных центров /ИЦ/ использовали верхний агар /10 г пептона, 1 г дрожжевого экстракта, 8 г NaCl, 7 г агара на 1 л H<sub>2</sub>O с добавлением 3 мл 1 М раствора MgSO<sub>4</sub> после автоклавирования/. Чашки Петри заливали 3 мл верхнего агара вместе с 0,1 мл индикаторного штамма и 0,1 мл облученных образцов после соответствующего разведения в 0,01 М растворе MgSO<sub>4</sub>. Определение выживаемости (S) клеток проводили стандартным методом макроколоний путем посева на чашки Петри с МПА. Чашки с клетками инкубировали при температуре 37°C в течение 24 ч.

Облучение многозарядными ионами проводили на ускорителе У-200 Лаборатории ядерных реакций ОИЯИ на установке с комплексом электронно-физической аппаратуры, специально сконструированной для облучения биологических объектов. Мощность дозы облучения составляла 600 Гр/мин. В экспериментах использовали ионы гелия с  $L = 22$  кэВ/мкм /энергия 8,0 МэВ/нуклон/.

**Обработка результатов.** Частоту индукции профага (I) определяли как отношение наблюдаемых негативных колоний (Ni) при титровании ИЦ к количеству образующихся колоний необлученной культуры (No) :  $I = Ni / No$ . Зависимость I от дозы аппроксимировали функцией  $I(D) = \alpha D \cdot \exp(-\beta D) \cdot (1 - \exp(-D_0^{-1} \cdot D))$ , дефиниро-

ванной нами ранее<sup>4/</sup>. Наклон линейного участка I(D) определяется параметром  $\alpha$ , названным нами индуцибельностью. Для обработки результатов использовали стандартные статистические методы, а для оптимизации параметров - метод Розенброка<sup>5/</sup>.

**Результаты.** На рис.1 представлены кривые выживания штаммов W3110 ( $\lambda^\pm$ ), P3478 ( $\lambda^\pm$ ), GC244 ( $\lambda^\pm$ ) при  $\gamma$ -облучении и действии ионов гелия. Приведены также кривые выживания штамма 30S0 ( $\lambda^\pm$ ) при  $\gamma$ -облучении. Значения радиочувствительности указанных штаммов представлены в таблице. Видно, что с возрастанием ЛПЭ излучений радиочувствительность клеток увеличивается. Относитель-

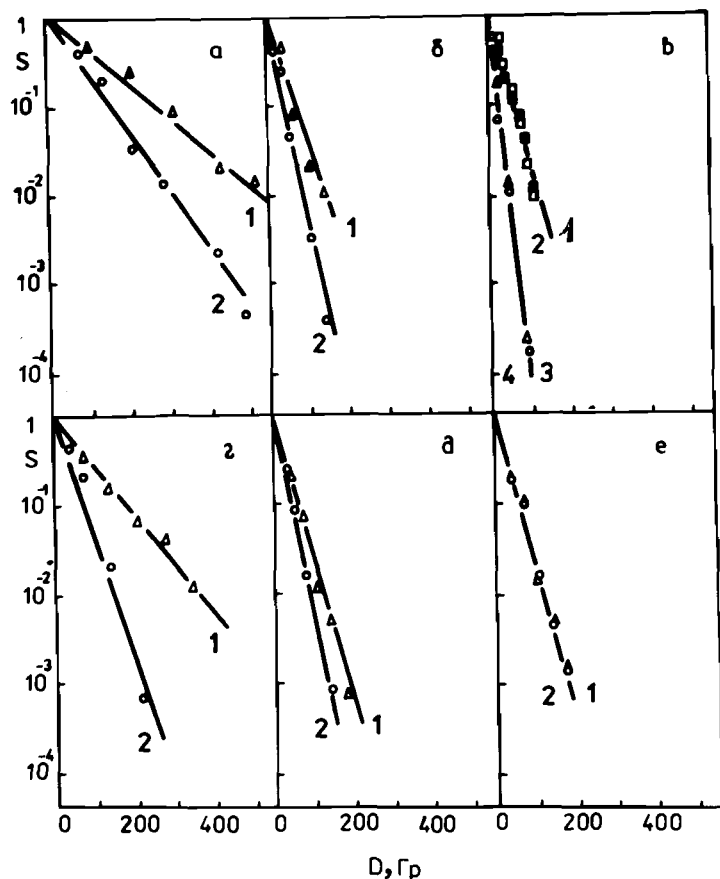


Рис.1. Летальное действие  $\gamma$ -лучей /кривые 1,2 на рис.а, б, в/ и ионов гелия /3,4 на рис.в; г, д, е/ на клетки *E. coli*: а,г - штамм W3110,  $\lambda^+$  - 2,  $\lambda^-$  - 1; б,д - штамм P3478,  $\lambda^+$  - 2,  $\lambda^-$  - 1; в - штамм GC244,  $\lambda^+$  - 2,4,  $\lambda^-$  - 1,3; е - штамм 30S0,  $\lambda^+$  - 2,  $\lambda^-$  - 1. По оси абсцисс - доза облучения, Гр; по оси ординат - выживаемость, отн.ед.

Таблица. Значения параметров кривых I(D) и радиочувствительностей клеток W3110, P3478, GC244, 30S0 при  $\gamma$ -облучении и действии ускоренных ионов гелия

Генотип клеток	Тип излучения и ЛПЭ		
	$\gamma$ -лучи (0,3 кэВ/мкм)	ионы гелия (22 кэВ/мкм)	
W3110	$\times 10^{-3}$		
	$D_0^{-1}(-)$	14,91 $\pm$ 0,75	12,3 $\pm$ 0,70
	$D_0^{-1}(\lambda)$	28,39 $\pm$ 1,00	25,60 $\pm$ 1,40
	$\alpha$	4,76 $\pm$ 0,25	11,9 $\pm$ 1,40
	$\beta$	6,50 $\pm$ 0,42	6,27 $\pm$ 0,49
P3478	$D_0^{-1}(-)$	60,70 $\pm$ 3,16	40 $\pm$ 2,0
	$D_0^{-1}(\lambda)$	94,35 $\pm$ 5,20	50 $\pm$ 2,3
	$\alpha$	56,80 $\pm$ 6,50	54,2 $\pm$ 12,5
	$\beta$	48,00 $\pm$ 2,72	54,9 $\pm$ 6,0
GC244	$D_0^{-1}(-)$	68 $\pm$ 3,6	83 $\pm$ 3,7
	$D_0^{-1}(\lambda)$	68 $\pm$ 3,6	83 $\pm$ 3,7
30S0	$D_0^{-1}(-)$	68 $\pm$ 3,6	-
	$D_0^{-1}(\lambda)$	68 $\pm$ 3,6	-

ные изменения в величинах  $D_0$  изогенных ( $\lambda^+$ ), ( $\lambda^-$ ) штаммов с ростом ЛПЭ примерно одинаковы. Для штамма GC244, несущего мутацию в гене *lexA*, кривые выживания изогенных ( $\lambda^+$ ), ( $\lambda^-$ ) штаммов не различаются как при  $\gamma$ -облучении, так и при действии ионов гелия. Аналогичная картина наблюдается и для лизогенного и нелизогенного штамма 30S0, являющегося *recA*-мутантом.

На рис.2 представлены дозовые зависимости индукции профага  $\lambda$  у штаммов W3110 ( $\lambda^\pm$ ) и P3478 ( $\lambda^\pm$ ) при облучении  $\gamma$ -лучами и ионами гелия. На рис.3 изображены такого же типа зависимости для штаммов *lexA* / $\gamma$ -облучение и ионы гелия/ и *recA* / $\gamma$ -облучение/. Видно, что индукция профага  $\lambda$  штаммов, несущих мутации в генах *lexA* и *recA* /участвующих в SOS-репарации/, очень слабо выражена и не меняется с дозой облучения. Для штаммов дикого типа и *rolA*-мутанта /W3110 ( $\lambda$ ) и P3478 ( $\lambda$ ) соответственно/ зависимости I от дозы облучения представляют собой кривые с максимумом, которые хорошо аппроксимируются функцией I(D). Видно, что форма кривых I(D) существенно меняется как с ростом ЛПЭ, так и при изменении генотипа клеток. Параметры функции I(D) представлены в таблице.

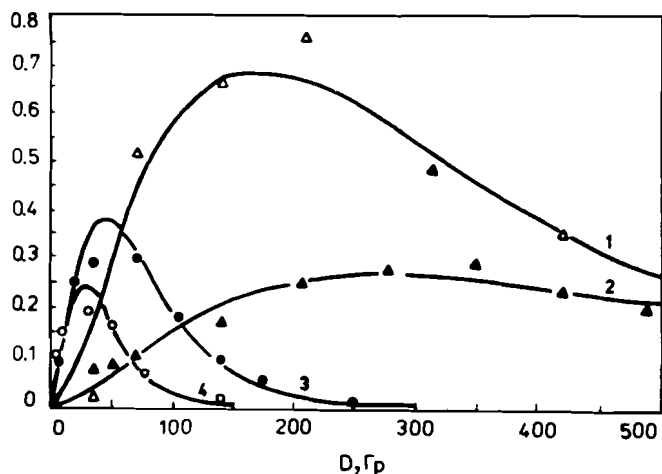


Рис.2. Индукция профага  $\lambda$  у клеток *E. coli* при действии  $\gamma$ -лучей / темные символы/ и ионов гелия / светлые символы/: 1,2 - штамм W3110; 3,4 - штамм P3478. По оси абсцисс - доза облучения, Гр; по оси ординат - индукция профага, отн.ед.

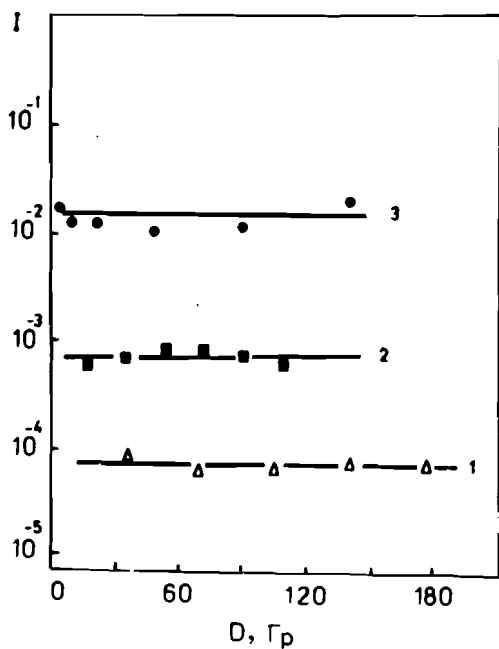


Рис.3. Индукция профага  $\lambda$  у клеток *E. coli*: 1 -  $\gamma$ -лучи /штамм 3080/; 2,3 -  $\gamma$ -лучи и ионы гелия соответственно /штамм GC244/. По оси абсцисс - доза облучения, Гр; по оси ординат - индукция профага, отн.ед.

*Дикий тип.* Из представленных материалов видно, что с ростом ЛПЭ степень индуцибельности профага повышается и максимум на кривой  $I(D)$  смещается влево, в область малых доз, и вверх.

*Мутация polA.* Мутация в гене *polA*, во-первых, повышает радиочувствительность клеток и, во-вторых, увеличивает их индуцибельность. Величина фактора изменения дозы ФИД<sub>g</sub>, рассчитанная как  $ФИД_g = a_m/a_w$ , где  $a_m$  и  $a_w$  - величины индуцибельности профага для мутанта и клеток дикого типа соответственно, составляет 11,9 при  $\gamma$ -облучении и 4,5 при действии ионов гелия. Величина ФИД<sub>s</sub>, определяемая как  $ФИД_s = D_{om}^{-1}/D_{ow}^{-1}$ , где  $D_{om}^{-1}$  и  $D_{ow}^{-1}$  - величины радиочувствительности *polA*-мутанта и штамма дикого типа соответственно, составляет 3,3 при  $\gamma$ -облучении и 1,9 при действии ионов гелия. Для нелизогенных штаммов аналогичные величины составляют 4,07 и 3,25 соответственно. С возрастанием ЛПЭ индуцибельность увеличивается и максимум на  $I(D)$  смещается влево вниз.

*Мутация lexA.* Мутация в гене *lexA* также вызывает повышение радиочувствительности клеток, однако снижает частоту индукции профага, которая с возрастанием ЛПЭ излучений несколько повышается.

*Мутация gesA.* Так же, как и у мутантов *polA* и *lexA*, у штамма с мутацией в гене *gesA* наблюдается высокая радиочувствительность клеток. Величина индукции профага резко снижается /см. рис.3/.

*Мутация gesBC.* Мутации, затрагивающие гены *gesB* и *gesC*, также повышают радиочувствительность клеток к  $\gamma$ -облучению  $/D_0^{-1} = 0,073$  Гр/. Частота индукции профага, так же как и у *lexA*-мутанта, низкая и с дозой облучения не меняется. Ее величина составляет около 0,007 отн.ед.

*Обсуждение.* Полученные нами материалы свидетельствуют о том, что влияние мутаций *polA*, *lexA*, *gesA* и *gesBC* на выживаемость клеток и частоту индукции профага  $\lambda$  у лизогенных штаммов при действии ионизирующих излучений различно. Видно, что радиочувствительность вышеуказанных мутантов выше по сравнению с клетками дикого типа, а индуцибельность профага  $\lambda$  при облучении у них существенно различна.

У мутанта *polA*, как известно, блокирована быстрая репарация одонитевых разрывов /ОР/ ДНК и эксцизионная репарация короткими фрагментами, что обусловлено отсутствием ДНК-полимеразы  $I^{16}$ . Из рис.1 и 2 видно, что при  $\gamma$ -облучении этого штамма по сравнению с клетками дикого типа наблюдается увеличение чувствительности и повышение индуцибельности.

Известно, что высокая радиочувствительность *polA*-мутанта обусловлена увеличением выхода ферментатических дунитевых раз-

рывов /ЭДР/ ДНК, образующихся из первичных  $\gamma$ -сайтов, не восстановленных из-за отсутствия *rolA*-зависимой репарации<sup>/7/</sup>. Дозовая зависимость частоты индукции профага у этого штамма, так же как и у клеток дикого типа, описывается кривой с максимумом. Возможные механизмы, лежащие в основе такого типа зависимости, обсуждались нами ранее<sup>/8/</sup>. Указывалось на важную роль изменения протеазной активности *гесА*-белка с ростом дозы облучения в формировании характера зависимости  $I(D)$ . То обстоятельство, что у *rolA*-мутанта, как и у клеток дикого типа, дозовые кривые индукции профага имеют одинаковый вид, говорит о том, что у этого штамма индуцибельная SOS-система работает столь же эффективно, как и у клеток дикого типа. При анализе данных, касающихся радиочувствительности, индуцированной  $\gamma$ -излучением индукции профага у *rolA*-мутанта, необходимо обратить внимание на следующее обстоятельство. Как видно из представленных данных, величина  $FID_g$ , выявленная для клеток этого штамма, в три раза больше, чем величина  $FID_s$  того же штамма. Этот факт может указывать на то, что участие индуцированных  $\gamma$ -облучением  $\gamma$ -сайтов в формировании летальных и переключающих "профаг-вирулентный фаг" событий существенно различно.

Повреждениями ДНК, запускающими литический цикл развития бактериофага у клеток *E. coli*, служат, как известно, главным образом однонитевые /ОН/ участки или бреши ДНК с длиной больше чем  $8 \text{ нп}$ <sup>/9/</sup>. Двунитевые разрывы /ДР/ и ЭДР ДНК являются летальными для клеток *E. coli*. Повреждения оснований, составляющие наиболее частый тип нарушений структуры ДНК, у *rolA*-мутанта могут удаляться после инцизии только в процессе *гесА*-*lexA*-зависимой репарации. В результате этого у *rolA*-мутанта выявляется большой выход ЭДР ДНК, обуславливающий повышенную радиочувствительность клеток<sup>/10/</sup>. Параллельно с этим повышается количество связанного с ДНК *гесА*-белка и тем самым увеличивается число молекул *гесА*-белка, приобретающих *гесА*-протеазную конформацию. Поскольку часть указанных повреждений ДНК восстанавливается в процессе SOS-репарации, то и величина  $FID_g$  больше величины  $FID_s$ .

При облучении изогенной пары штаммов W3110 и P3478 выявлено, что величина параметра  $\alpha$ , отражающего индуцибельность клеток, более высокая при действии ионов гелия, чем при  $\gamma$ -облучении. Причины возрастания относительной индуцибельной эффективности /ОИЭ/ с увеличением ЛПЭ рассмотрены нами ранее<sup>/8/</sup>. Здесь лишь заметим, что некоторое возрастание величины ОИЭ наблюдается и в экспериментах с *rolA*-мутантом. Этот факт, по-видимому, связан с тем, что "комплексные" повреждения ДНК, которые не восстанавливает *rolA*-зависимая репарация<sup>/10/</sup>, являются

молекулярным субстратом, связывающим *гесА*-белок. Последнее обстоятельство, по-видимому, является причиной увеличения протеазной активности в клетках и тем самым повышения их индуцибельности.

Анализ материалов, представленных на рис.3 и в таблице, показывает, что у *lexA*-мутанта, так же как и у мутанта *rolA*, выявляется высокая чувствительность к облучению. Известно, что повышенная по сравнению с клетками дикого типа радиочувствительность *lexA*-мутанта обусловлена отсутствием индуцибельного синтеза *гесА*-белка вследствие наличия у *lexA*-мутанта нерасщепляемого *гесА*-протеазой суперрепрессора *LexA*. Вместе с тем известно, что у *lexA*-мутанта имеется определенный конститутивный уровень *гесА*-белка. С учетом вышеуказанных обстоятельств можно ожидать у *lexA*-мутанта снижение частоты индукции профага по сравнению с клетками дикого типа. Как видно из рис.3, это действительно имеет место. Частота индукции профага  $\lambda$  при  $\gamma$ -облучении штамма GC244 резко снижена, и зависимость от дозы облучения не выявляется. Эти особенности проявления частоты индукции профага у клеток *E. coli* можно связать с уменьшением вероятности образования тройного протеолитического комплекса: ДНК - *RecA*-белок -  $\lambda$ -репрессор. Образование этого комплекса, по-видимому, лимитируется ограниченным количеством *RecA*-белка. При действии ускоренных ионов гелия наблюдается резкое возрастание частоты индукции, однако характер зависимости  $I(D)$  не меняется, то есть она остается постоянной при изменении дозы облучения. Величина фактора изменения дозы, рассчитанная как  $FID = I_h / I_\gamma$ , где  $I_h$  и  $I_\gamma$  - величины частоты индукции профага при действии ионов гелия и  $\gamma$ -излучения, составляет 28,6. Увеличение величины  $I$  можно, по-видимому, связать с теми же "комплексными" повреждениями ДНК, которые возникают дополнительно вследствие особенностей энерговыделения плотной ионизирующей частицы. Из материалов, представленных на рис.1, видно, что у *гесА*-мутанта, так же как и у *rolA*- и *lexA*-мутантов, выявляется высокая радиочувствительность. Повышенная радиочувствительность по сравнению с клетками дикого типа обусловлена отсутствием у *гесА*-мутанта медленной репарации. Блок медленной репарации, являющейся частью интегрального SOS-ответа клеток, обусловлен отсутствием нормального *RecA*-белка, способного выполнять свои функции.

Как видно из рис.3, частота индукции профага  $\lambda$  у *гесА*-мутанта, так же как и у *lexA*-мутанта, с дозой не меняется и ее величина довольно низка и равна величине спонтанной индукции<sup>/11/</sup>. Аналогичные результаты получены в экспериментах с фаго-продукцией у клеток *E. coli* при  $\gamma$ -облучении и другими авторами<sup>/1/</sup>.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о сложном и неоднозначном влиянии репарации ДНК на процесс профага  $\lambda$  у клеток *E. coli*, вызванный излучениями с разной ЛПЭ. Решающую роль в нем играет индуцибельная репарационная SOS-система.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. West C.S., Powel A.K., Emmerson P.T. - *Molec. Gen. Genet.*, 1975, v.141, p.1-8.
2. Carvalho R.E.S., Letao A.C. - *Photochemistry and Photobiology*, 1984, v.39, No.5, p.619-623.
3. Аносова М.Г., Бонев М.Н., Данилов В.И. - *Микробиология*, 1987, т.56, вып.3, с.484-487.
4. Бонев М.Н., Козубек С., Красавин Е.А. Сообщение ОИЯИ Р19-88-47, Дубна, 1988.
5. James F., Roos M. - *Computer Phys. Commun.*, 1975, v.10, p.146-150.
6. Bridges B.A., Mottereskhead R.P. - *Heredity*, 1972, v.29, p.203-211.
7. Bonura T., Smith K., Kaplan N.S. - *Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A.*, 1975, v.72, No.11, p.4265-4269.
8. Бонев М.Н. и др. Сообщение ОИЯИ Р19-88-49, Дубна, 1988.
9. Leahy L.C., Radding C.M. - *J.Biol.Chem.*, 1986, v.261, No.15, p.6954-6960.
10. Жестяников В.Д. Репарация ДНК и ее биологическое значение. Л.: Наука, 1979, с.54-66.
11. Bertany G. - *J.Bacteriol.*, 1951, v.62, No.3, p.293-300.

Рукопись поступила в издательский отдел  
1 марта 1988 года.

Бонев М.Н., Козубек С., Красавин Е.А. 19-88-151  
Влияние генотипа на индукцию профага  $\lambda$   
у клеток *E. coli* ионизирующими излучениями  
с разной ЛПЭ

Исследована зависимость индукции профага  $\lambda$  при действии излучений с различной ЛПЭ у лизогенных клеток *E. coli*, различающихся по репарационным генотипам. Бактериальные штаммы W3110, P3478, GC244 и 30S0 облучали  $\gamma$ -лучами и ионами гелия с ЛПЭ, равной 22 кэВ/мкм. Индукция профага у штаммов GC244 и 30S0, дефектных по *lexA* и *lexA* генов, либо подавлена (GC244), либо полностью отсутствует (30S0). У штамма P3478, несущего мутацию в гене *polA*, индуцибельность увеличивается в сравнении со штаммом дикого типа в 12 и 5 раз соответственно при  $\gamma$ -облучении и действии ионов гелия.

Работа выполнена в Лаборатории ядерных проблем ОИЯИ.

**Препринт Объединенного института ядерных исследований. Дубна 1988**

Перевод О.С.Виноградовой

Bonev M.N., Kozubek S., Krasavin E.A. 19-88-151  
The Genotype Influence on the Prophage  $\lambda$   
Induction in Lysogens *E. coli* Exposed  
to Ionizing Radiation with Different LETs

The prophage  $\lambda$  induction dependence on the radiations with different LETs in lysogen cells *E. coli* of different repair genotypes has been investigated. The bacterial strains W3110, P3478, GC244 and 30S0 have been exposed to  $\gamma$ -rays and helium ions with LET=22 keV/ $\mu$ m. The prophage  $\lambda$  induction in the strains GC244 and 30S0, defective in *lexA* and *recA* genes is either reduced (GC244) or completely absent (30S0). The induction potency in the strain P3478 with mutation in the *polA* increases with respect to the wild type by a factor of 12 for  $\gamma$ -irradiation and 5 for helium ions.

The investigation has been performed at the Laboratory of Nuclear Problems, JINR.

**Preprint of the Joint Institute for Nuclear Research. Dubna 1988**