

СООБЩЕНИЯ
ОБЪЕДИНЕННОГО
ИНСТИТУТА
ЯДЕРНЫХ
ИССЛЕДОВАНИЙ
ДУБНА

Б-812

P19-88-47

М.Бонев, С.Козубек, Е.А.Красавин

ИНДУКЦИЯ БАКТЕРИОФАГА λ
И РАДИОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ
ЛИЗОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ *ESCHERICHIA COLI*
ПРИ γ -ОБЛУЧЕНИИ

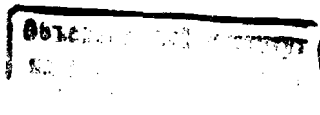
1988

Одновременно с открытием индукции профага у лизогенных бактерий была установлена их повышенная чувствительность к действию ультрафиолетового (УФ) и рентгеновского излучения [1,2]. Оказалось, что разницу в выживаемости лизогенных λ^- и λ^+ штаммов невозможно объяснить только на основании индукции у лизогенных клеток *E.coli* профага λ [1]. В работе [3] было показано, что иммунные к фагу нелизогенные бактерии обладают чувствительностью к УФ-излучению, характерной для лизогенных штаммов. С учётом этого можно было прийти к выводу о том, что повышенная радиочувствительность лизогенных бактерий скорее всего связана с фактором иммунитета клеток, чем с индукцией профага.

Успешное развитие молекулярной биологии в последнее время дало обширную информацию о структурной организации клеточного генома, механизмах репликации и репарации ДНК, генетической регуляции лизогенного состояния и механизмах индукции профага. В настоящее время индуцибельные процессы репарации ДНК клеток объединены концепцией SOS - системы [4,5], а изучение механизмов индукции профага λ привело к пониманию организации генетического контроля репрессированного состояния бактериофага. С учётом указанных обстоятельств появляется возможность рассмотрения внутриклеточных механизмов, определяющих радиочувствительность лизогенных бактерий *E.coli* при γ -облучении. Проведение такого анализа и явилось целью настоящей работы.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

В опытах использованы следующие бактериальные штаммы *Escherichia coli*: Hfr H(thi-1, λ), Hfr H(thi-1), C(str) и $\Delta\lambda$. Штамм C(str) использовали как индикаторный, а $\Delta\lambda$ в качестве донора фага λ дикого типа при лизогенизации штамма Hfr H(thi-1). Облучение клеток проводили на установке с γ -источником ¹³⁷Cs, мощность дозы облучения 35 Гр/мин. Методика и постановка эксперимента подробно описаны в работе [6].



На рисунке представлены зависимости индукции (I) профета и выживаемости (S) неизлученных и лизогенных штаммов E.coli от дозы (D) β -облучения. Видно, что в одних случаях кривые S (D) экспоненциальны, и радиочувствительность лизогенного штамма достаточно высока. Величина фактора наименьшей дозы ФМД, рассчитанная как $\Phi_{MД} = D_{0.1} / D_{0.2}$, где $D_{0.1}$ и $D_{0.2}$ - радиочувствительность лизогенного и неизлученного штаммов соответственно, составляет 1,4. Кривая индукции I(D) = N₁/N₀, где N₁ - число инфекционных центров, N₀ - число жизнеспособных колоний необлученной культуры, является кривой с максимумом, которая наблюдается при дозе около 300 r.

Очевидно, что при облучении клетки лизогенных штаммов могут получать как из-за неотррапированных повреждений ДНК, так и по причине лиазиса клеток вследствие индукции профета. Два типа наблюдаемых летальных эффектов β -облучения ставит вопрос о взаимосвязи этих явлений. Однако независимость професов лиазиса клеток от неотррапированных повреждений и от индукции профета γ была бы возможна, если бы ферменты перапатии не принимали участие в индукции профета.

Расчетная доля порошко литозая о взаимной независимости двух типов лиазиса лизогенных клеток. Обозначим p₁ - вероятность лиазиса клетки от облучения (из - за неотррапированных повреждений), p₂ - вероятность лиазиса клеток от индукции профета. Тогда получаем следующие расклады вероятностей:

клетка выживает, пана - (1-p₁)(1-p₂);
 лиазис только от облучения - p₁(1-p₂);
 лиазис только от индукции профета - p₂(1-p₁);
 лиазис от облучения и от профета - p₁p₂.

Сумма всех этих вероятностей должна быть равна единице.
 Фракции выживающих клеток лизогенной культуры равняются

$$S_2 = (1-p_1)(1-p_2) \quad (1)$$

$$I = p_2 \quad (2)$$

Если также предположить, что вероятность лиазиса клеток лизогенной культуры от неотррапированных повреждений (p₁) равняется той же вероятности для неизлученной культуры клеток

(1-S₁), то есть p₁ = 1-S₁, мы получаем из (1) и (2) экспериментально проверенное уравнение

$$S_2 = S_1(1-I) \quad (3)$$

В этом уравнении все величины могут быть определены при разных дозах облучения. Теоретическая зависимость S₂(D), рассчитанная на основании уравнения (3), приведена на рисунке. Видно, что во всем диапазоне доз выживаемость лизогенного штамма ниже ожидаемой величины (обозначена штриховой линией). Таким образом, на основании изложенного можно прийти к заключению о том, что професы радиационной лиазиса клеток лизогенного штамма и индукция профета взаимосвязаны. В результате этого эффективность професов перапатии повреждений ДНК, влияющих на выживаемость клеток, у лизогенного штамма по сравнению с неизлученным штаммом меньше.

В настоящее время хорошо установлено, что центральную роль в сложном многоступенчатом професе перапатии повреждений ДНК занимает меленная лса-лса - зависимость перапатии. [7]. Главной функцией лсаА - белка является его способность осуществлять залуск SOS - системы путем расширения перапроцара лсаА - белка. Кроме этого, лсаА - белок связывается с однонитевыми участками поврежденной ДНК и препятствует действию экзонуказыва V [8] и тем самым уменьшает вероятность возникновения энзиматических лавинных разрывов ДНК. Если облученная клетка является лизогенной, лсаА - белок расширяет и γ - перапроцар. Расширение перапроцаров лсаА и лсаА - белок имеет различную кинетику. Известно, что лсаА - перапроцар расширяется лснее, что приводит к быстрому залуску SOS - системы [9]. Дополнительно к этому является важным то обстоятельство, что индукция профета происходит лишь в том случае, если уровень концентрации перапроцара снижается до 90% [10]. Для этого, по-видимому, требуется значительное количество лсаА - белка в профезной конфигурации, что может происходить при некоторой задержке перапатии ДНК. В этом случае увеличивается вероятность возникновения энзиматических лавинных разрывов ДНК, метельных или клеток. Можно полагать, что индукция профета происходит в тех клетках, в которых повреждена ДНК метельным металлами. С другой стороны, наличие

λ - репрессора является "дополнительной нагрузкой" как для реализации протеазной активности RecA - белка, так и для осуществления его функций ограничения деградации ДНК RecBC - экзонуклеазой. Поэтому степень дерепрессии SOS - функции, а следовательно, и уровень вновь производимого RecA - белка у λ^+ штаммов по сравнению с λ^- штаммами, по-видимому, понижены. В результате этого можно ожидать, что у λ^+ штамма деградация ДНК а значит, и выход энзиматических двуниевых разрывов ДНК, приводящих к летальному эффекту, более высокий, чем у λ^- штаммов. Заметим, что при образовании в клетках энзиматических двуниевых разрывов ДНК, по-видимому, в большинстве случаев индукции профага не происходит, поскольку снижение концентрации λ - репрессора до критического значения, необходимого для индукции λ - фага, происходит медленно.

Таким образом, различие в чувствительности к γ -облучению лизогенных и нелизогенных штаммов E.coli может объясняться различной эффективностью репарации медленного типа, обусловленной взаимодействием RecA - белка с λ - репрессором у лизогенного штамма. При этом сам факт индукции профага незначительно влияет на радиочувствительность клеток. Это хорошо видно из кривых выживания лизогенных штаммов E.coli после γ -облучения, представляющих собой экспоненциальные зависимости, форма которых не искажается индукцией профага. Даже при облучении клеток УФ излучением, когда максимум индукции достигает 90% индуцированных клеток [11], зависимость S(D) лизогенного штамма остаётся экспоненциальной. Из этого следует, что вопрос о том, погибнет ли клетка, решается в первую очередь, а вопрос об индукции профага возникает уже среди клеток, обречённых на гибель.

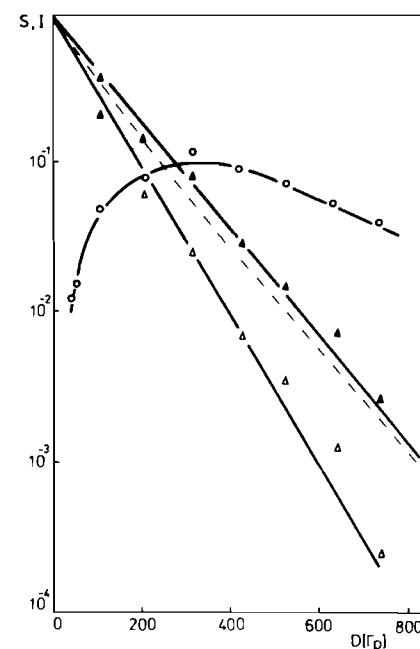


Рис. Выживаемость (S) изогенных (λ^-) (\blacktriangle), (λ^+) (\triangle) штаммов E.coli HfrH и зависимость индукции (I) профага λ (o) от дозы γ -облучения. Штриховой линией представлена расчётная кривая выживаемости для лизогенного штамма при условии полной независимости процессов гибели этих клеток от облучения и от индукции фага. По оси абсцисс: доза облучения, Гр, по оси ординат: S, I, отн.ед.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Marcovich H., Latarget R., Adv.in Biol.Med.Physics, v.6 1958, p.75-94.
- [2] Weigle J.J., Delbruck M., J. Bacteriol., v.62, No 3, 1951, p.301-318.
- [3] Appleyard R.K., Genetics, v.39, 1954, p.440.
- [4] Radman M., Molecular and Environmental Aspects of Mutagenesis 1974, p.128-142.
- [5] Witkin E.M., Bacteriol.Rev., v.40, 1976, p.869-907.

- [6] Бонев М.Н., Козубек С., Сообщение ОИЯИ, P19-87-791. Дубна 1987.
- [7] Ланцов В.А., Генетика т.21, No.9, 1985, стр.1413-1427.
- [8] Williams J.C. et al., J.Biol.Chem., v.256, 1981, p.7573-7582.
- [9] Little J.W., Mount D.W., Cell, v.20, 1982, p.11-22.
- [10] Johnson A.D., Pottleete A.R., Lauer G., Sauer R.T., Askers G. K., Ptashne M., Nature, v.294, 1981, p.217-222.
- [11] Стент П., Калинин Р., Молекулярная генетика, " Мир ", Москва, 1981, стр.348.

НЕТ ЛИ ПРОБЕЛОВ В ВАШЕЙ БИБЛИОТЕКЕ?

Вы можете получить по почте перечисленные ниже книги, если они не были заказаны ранее.

D13-84-63	Труды XI Международного симпозиума по ядерной электронике. Братислава, Чехословакия, 1983.	4 р. 50 к.
D2-84-366	Труды 7 Международного совещания по проблемам квантовой теории поля. Алушта, 1984.	4 р. 30 к.
D1,2-84-599	Труды VII Международного семинара по проблемам физики высоких энергий. Дубна, 1984.	5 р. 50 к.
D17-84-850	Труды III Международного симпозиума по избранным проблемам статистической механики. Дубна, 1984. (2 тома)	7 р. 75 к.
D11-85-791	Труды Международного совещания по аналитическим вычислениям на ЭВМ и их применению в теоретической физике. Дубна, 1985.	4 р. 00 к.
D13-85-793	Труды XII Международного симпозиума по ядерной электронике. Дубна, 1985.	4 р. 80 к.
D4-85-851	Труды Международной школы по структуре ядра. Алушта, 1985.	3 р. 75 к.
D3.4,17-86-747	Труды V Международной школы по нейтронной физике Алушта, 1986.	4 р. 50 к.
—	Труды IX Всесоюзного совещания по ускорителям заряженных частиц. Дубна, 1984. (2 тома)	13 р. 50 к.
D1.2-86-668	Труды VIII Международного семинара по проблемам физики высоких энергий. Дубна, 1986. (2 тома)	7 р. 35 к.
D9-87-105	Труды X Всесоюзного совещания по ускорителям заряженных частиц. Дубна, 1986. (2 тома)	13 р. 45 к.
D7-87-68	Труды Международной школы-семинара по физике тяжелых ионов. Дубна, 1986.	7 р. 10 к.
D2-87-123	Труды Совещания "Ренормгруппа - 86". Дубна, 1986.	4 р. 45 к.
D4-87-692	Труды Международного совещания по теории малочастичных и кварк-адронных систем. Дубна, 1987.	4 р. 30 к.
D2-87-798	Труды VIII Международного совещания по проблемам квантовой теории поля. Алушта, 1987.	3 р. 55 к.
D14-87-799	Труды Международного симпозиума по проблемам взаимодействия мюонов и пионов с веществом. Дубна, 1987.	4 р. 20 к.

Рукопись поступила в издательский отдел
20 января 1988 года.