

**ОБЪЕДИНЕННЫЙ
ИНСТИТУТ
ЯДЕРНЫХ
ИССЛЕДОВАНИЙ
ДУБНА**

Б-812

P19-88-49

**М.Н.Бонев, С.Козубек, Е.А.Красавин,
А.П.Череватенко**

**ИНДУКЦИЯ ПРОФАГА λ
ПРИ ОБЛУЧЕНИИ КЛЕТОК E.COLI
ИЗЛУЧЕНИЯМИ С РАЗНОЙ ЛПЭ**

Направлено в журнал "Радиобиология"

1988

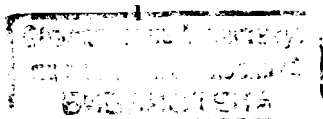
Одним из проявлений SOS-реакции клеток *E. coli* на воздействие ДНК-тропных агентов является индукция профага [1]. Поэтому на основании изучения закономерностей индукции можно судить о состоянии клеточной SOS-системы в целом. Эксперименты по индукции бактериофага λ у лизогенных культур *E. coli*, начатые в 50-х годах [2-5], проводились главным образом с использованием ультрафиолетовых (УФ) лучей, рентгеновского, а позднее γ -излучения. До последнего времени работы с плутонионизирующими излучениями не проводились. Между тем для выяснения механизмов летального и мутагенного действия излучений с разными физическими характеристиками важно иметь информацию о реакции SOS-системы клеток при действии излучений с разной линейной передачей энергии (L).

Известно, что с возрастанием ЛПЭ ионизирующих излучений в ДНК клеток увеличивается количество повреждений, восстановление которых происходит лишь в процессе медленной репарации [6]. По степени выражения SOS-ответа клеток можно судить о том, участвуют ли вышеупомянутые повреждения в формировании сигнала, запускающего SOS-реакцию. С учётом вышеназванного целью настоящей работы явилось изучение закономерностей индукции профага λ у клеток *E. coli* излучениями с разной ЛПЭ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА

Бактериальные штаммы и среды. В эксперименте использовали следующие штаммы *E. coli*: HfrH(thi-1), Ay(λ), C(str), HfrH(thi-1, λ). Штамм C(str) использовали как индикаторный, а Ay(λ) в качестве донора фага λ дикого типа при лизогенизации штамма HfrH.

Культуру клеток (лизогенный и индикаторный штаммы) инкубировали в жидкой питательной среде (мясо-пептонный бульон производства Института эпидемиологии и микробиологии имени Н.Ф. Гамалеи) в течение 16 ч при температуре 37°C до стационарной фазы ($2-4 \cdot 10^8$ клеток/мл). Затем клетки переносили в 10 мл свежей питательной среды при разведении 1:20 и снова



инкубировали в течение 3-х ч при температуре 37°C до достижения эконенациальной фазы роста (3-7,10⁶ клеток/мл) культуры. В этом интервале концентрировали инкубаторный шлам, промывает осадок инфузионными растворами и формовалио негательных колоний (НК) [7].

Методика и постановка эксперимента. Исследуемые штаммы родоты включали центрифугирование лиофильных клеток в течение 15 мин (8000 в) и ресуспендирование осадка двух прородок в 1 мл 0,01 М раствора NaSO₄. После этого отбирали 1 мл чистой суспензии, фильтровали через стерильные лабораторные фильтры, 18м в диаметре (диаметр пор 0,5 мкм), и помещали в 1 мл инкубированной воды. Фильтр ставили на стерильную подложку, впитывающую прохладитель через порь фильтра, воду, низкомолекулярные соединения и дачериофилы. Оставшиеся дачерильные клетки смывали с поверхности фильтра.

Встряхивали в 1 мл 0,01 М раствора NaSO₄. Облучение клеток 2-лучами проводили на установке с 2-источником 137 Cs, мощность дозы облучения 35 П/мин. Клетки облучали на лиофильных, распыленных на поверхности мясо-пептонного агаре (МПА) производств Института эволюционной и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи КС ССР, приготавливаемых в форме цилиндров 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 установке многозарядных ионов фильтр помещали на МПА, разлитый в специально изготовленные металлические чашки. На поверхность фильтра вводились нанодози суспензии клеток объемом 0,01 мл. Облучение проводили через 20-30 мин после подсыхания поверхности фильтра. После облучения клетки смывали с поверхности фильтра раствором NaSO₄. Суспензию облученных клеток разводили тем же раствором и высевали на чашки Петри, содержащие 15 мл МПА с добавлением 3 мл/мл однокомпонентного раствора NaSO₄.

Для определения инфекционных центров (ИЦ) использовали верхний агар (10 г пептона, 1 г дрожжевого экстракта, 8 г NaCl, 7 г агары на 1 л H₂O с добавлением 3 мл 1 М раствора NaSO₄ после автоклавирования). Чашки Петри заливали 3 мл верхнего агара вместе с 0,1 мл индикаторного шлама и 0,1 мл облученных образцов после соответствующего разведения в 0,01 М растворе

24 ч. Облучение многозарядными ионами проводили на ускорителе У-200 лаборатория лиофильных культур НИИ на установке с комплексом электронно-физической аппаратуры, специально сконструированной для облучения биологических объектов. Мощность дозы облучения составляла 600 П/мин. В экспериментах использовали концы гелия с L = 22 кВ/мм (энергия 8,0 МэВ/нуклон) и L = 72 кВ/мм (энергия 1,7 МэВ/нуклон).

Обработка результатов. Частоту индукции профиля (I) определяли как отношение надложечных НК (N') при титровании ИЦ к количеству образующихся колоний неодлученной культуры (N): I = N'/N. Зависимость I от дозы (D) аппроксимировали функцией (D) с помощью БМ. Наклон линейного участка I(D) определяют параметром k, названным нами индукционной способностью. Для обработки результатов использовали стандартные статистические методы, для оптимизации параметров — метод Розенброка [8].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИИ

Для всех типов использованных в экспериментах излучений в исследованном диапазоне доз наблюдается экспоненциальный закон зависимости S(D). На рис. 1 представлено кривые зависимости штаммов НЕТН (λ1) для γ-облучения и ионов гелия (L=22 кВ/мм, L=72 кВ/мм). Значения радиочувствительности обоих штаммов для указанных доз показаны в таблице. Видно, что лиофильные штаммы более радиочувствительны. С возрастанием дозы радиочувствительность штаммов увеличивается, и разница в радиочувствительности изолятов уменьшается, и разница в радиочувствительности изолятов γ, γ-штамов сохраняется. Дозовые зависимости индукции профиля приравлены на рис. 2. Заметьно, что с увеличением дозы максимум кривых возрастает и сдвигается в область малых доз облучения. Увеличение крутизны начального участка зависимости I(D) с возрастанием дозы до исследованных значений свидетельствует об увеличении эффективности индукции профиля γ. Зависимость I(D) с достаточной точностью можно описать функцией

$$I(D) = a \cdot D^b - b \cdot D^{-c} \cdot e^{-D \cdot d},$$

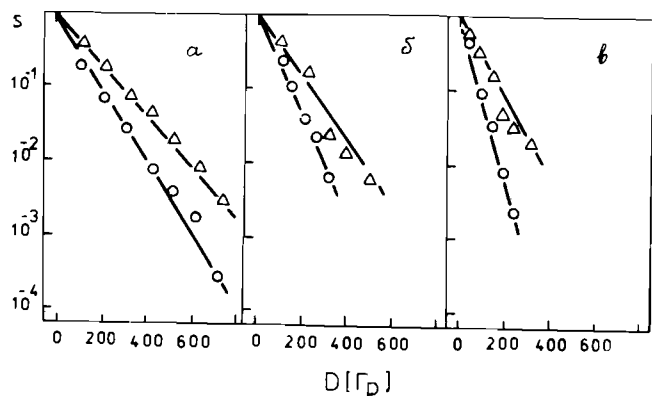


Рис.1. Выживаемость изогенных (λ^-) (Δ), (λ^+) (\circ) бактерий HfrH при действии разных типов излучений. а) γ -лучи, б) ионы гелия, $L=22$ кэВ/мкм, в) ионы гелия, $L=72$ кэВ/мкм. По оси абсцисс: доза облучения, Гр, по оси ординат: выживаемость, отн.ед.

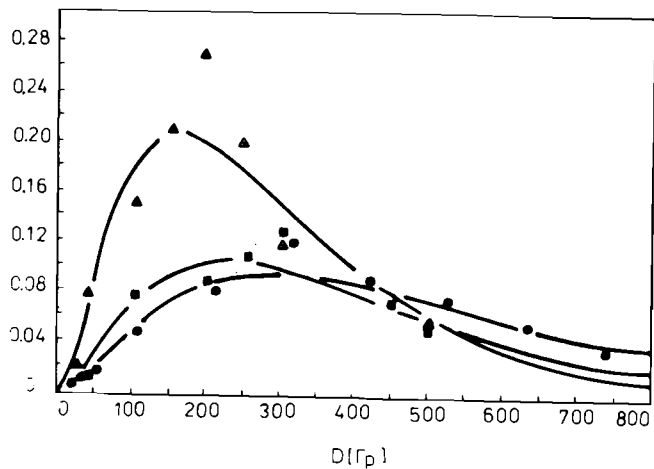


Рис.2. Зависимость индукции профага λ бактериального штамма $\text{HfrH}(\lambda)$ от дозы облучения при действии γ -лучей (\bullet), ионов гелия с $L=22$ кэВ/мкм (\blacksquare) и с $L=72$ кэВ/мкм (\blacktriangle), по оси абсцисс: доза облучения, Гр, по оси ординат: индукция профага λ , отн.ед.

где α, β - параметры, D_0^{-1} -радиочувствительность лизогенного штамма и D -доза облучения. Функция $F(D) = \alpha \cdot D \exp(-\beta \cdot D)$ в правой части (1) выражает долю погибших клеток, в которых произошла индукция профага. В таблице даны значения параметров, соответствующих трём величинам ЛПЭ, и показаны также значения доз, при которых $I(D)$ имеет максимум.

ОБСУЖДЕНИЕ

Центральную роль в SOS-ответе бактериальных клеток играет продукт гена recA - белок. Известно, что запуск SOS-функции клетки происходит путём расщепления репрессора LexA . Этот белок, так же как и репрессоры фагов λ и P22, расщепляется RecA -белком в строго определенном месте, в пептидной связи Ala-Gly . Кроме того, RecA -белок принимает участие в других жизненно важных процессах, таких как рекомбинация, репарация, репликация, мутагенез, клеточное деление и синтез новых белков [9]. Во всех перечисленных функциях RecA -белка обязательным является присутствие двух основных кофакторов реакции - АТФ или его негидролизуемого аналога АТФ γ S, полинуклеотидов или односторонней (ОН) ДНК. Для осуществления различных функций RecA -белка требования к протяжённости ОН участков ДНК различны. Так, например, для активации рекомбинационного центра RecA -белка требуются длинные фрагменты, а для протеолитического комплекса - короткие фрагменты [9]. В зависимости от размера матрицы реализуется различная степень мультимеризации RecA -белка, определяющая одну либо другую его функцию. Известно также, что зависимость протеазной активности RecA -белка от концентрации ОН-участков ДНК *in vitro* представляет собой кривую с максимумом [10]. Возможно, это связано с тем, что с увеличением дозы облучения в клетках возрастает не только количество повреждений, способствующих превращению RecA -белка в протеазу, но также и общая длина ОН-бреши. В ходе репарации этих повреждений RecA -белок связывается с бреши и защищает их от дальнейшей дегградации. В этой связи можно ожидать, что с увеличением дозы облучения количество протеазы будет сначала возрастать и по мере связывания RecA -белка с ОН-участками ДНК её количество будет падать. В связи с вышеизложенным возникает вопрос о том, преимущественно какие повреждения индуцируют ионизирующие излучения, различающиеся по ЛПЭ.

Известно, что ионизирующие излучения вызывают образование как двунитевых разрывов ДНК, не репарируемых бактериальной клеткой, так и ОН-разрывов ДНК, являющихся субстратом для разнообразных репарационных ферментов. Так, например, в процессе осуществления эксцизионной репарации в клетке возникают короткие бреши ДНК и короткие фрагменты ОН ДНК. В результате действия RecBC-экзонуклеазы возникают длинные бреши ДНК [11]. Все эти повреждения могут выполнять роль кофактора при проявлении полифункциональности RecA-белка. С ростом ЛПЭ меняется спектр индуцированных излучением повреждений [12,13,14,15]. Увеличивается количество прямых двунитевых разрывов, ОН-разрывов, не восстанавливаемых быстрым типом репарации, и падает выход повреждений, возникающих от одного акта передачи энергии, таких, как первичных ОН-разрывов или поврежденных оснований.

Анализ кривых $S(D)$ и $I(D)$ на рис. 1 показывает, что невозможно объяснить разницу в выживаемости изогенных λ^+ и λ^- штаммов исходя из предположения о независимости двух типов гибели клетки вследствие наличия невосстановленных повреждений и вследствие индукции профага [16]. В сущности процессы индукции профага и восстановление повреждений ДНК связаны между собой полифункциональностью RecA-белка. При радиационном повреждении генетического аппарата клеток две его функции выходят на первое место: протеолитическая, ведущая к запуску SOS-ответа, и функция ограничения процессов деградации ДНК. Наличие λ -репрессора является "дополнительной нагрузкой" для протеолитической активности RecA-белка. Известно также, что λ -репрессор связывается с ОН-бреши ДНК [17] и может препятствовать реализации функции RecA-белка, ограничивающей деградацию ДНК RecBC-экзонуклеазой. По-видимому, по этой причине у λ^+ штамма деградация ДНК увеличивается, вследствие этого увеличивается выход энзиматических двунитевых разрывов ДНК и возрастает радиочувствительность клеток. При этом снижение концентрации λ -репрессора до критического значения, необходимого для индукции λ -фага, может не произойти.

Индукция фага λ в лизогенной клетке происходит лишь тогда, когда приблизительно 90% λ -репрессора инактивируется [18]. Для этого, по-видимому, требуется значительное количество RecA-белка в протеазной конформации, что может произойти при задержке репарации ДНК. Возможно, что клетки, в которых

запускается литический цикл развития фага, неспособны отрепарировать поврежденные участки своей ДНК. Таким образом, бактериофаговая индукция происходит на фоне уже погибающих клеток. Прямая связь между протеазной активностью RecA-белка и инактивацией λ -репрессора, как и естественное допущение о том, что с увеличением дозы γ -облучения в клетке возрастает количество ОН-бреши ДНК, даёт основание для следующей интерпретации параметров α и β . Наклон линейного участка $F(D)$ определяется параметром α , который является, таким образом, мерой индуцибельности клеток, т.е. увеличения количества индуцированных клеток на единицу дозы. Это увеличение, по-видимому, можно связать с ростом количества повреждений ДНК, являющихся сигналом SOS-системы, превращающим RecA-белок в RecA-протеазу. Параметр β определяет падение $F(D)$, которое можно связать с ингибированием RecA-протеазы. По-видимому, при этом идёт процесс переключения протеолитической функции RecA-белка в другие репарационные функции. Механизм этого ингибирования неясен.

При малых дозах облучения функция $I(D)$ имеет квадратичный характер, быстро переходящий в линейный. Наклон линейного участка зависимости $I(D)$ определяется параметром α .

Можно полагать, что процесс превращения RecA-белка в RecA-протеазу будет значительно более эффективным в клетках, где в результате расщепления λ xA-репрессора произошла дерепрессия λ SA-оперона. Количество RecA-белка в этих клетках резко увеличивается.

Параметры α и D_0^{-1} описывают начальный квадратичный участок зависимости $I(D)$. В этом участке каждое дополнительное повреждение ДНК, которое является сигналом, не только увеличивает среднее количество RecA-белка в популяции клеток, но и превращает свою долю из того RecA-белка, который уже есть, в протеазу. Этим объясняется квадратичная зависимость индукции профага от дозы облучения. Как видно из рисунков, этот квадратичный участок, однако, быстро переходит в линейный. Нарастание $I(D)$ описывается параметром α , последующее падение описывается параметром β . С увеличением параметра β и увеличением радиочувствительности D_0^{-1} положение максимума на кривой $I(D)$ смещается влево. Данные, представленные в таблице, показывают, что с возрастанием ЛПЭ параметры α , β и D_0^{-1} увеличиваются. При этом относительное увеличение параметра α

ТАБЛИЦА. Параметры кривых I(D)

Тип излучения и ЛПЭ	γ -лучи 0.3 кэВ/мкм	Ионы гелия 22 кэВ/км 72 кэВ/мкм	
$D_{0^{-1}}(\lambda +)$	0.0120 ± 0.0005	0.017 ± 0.002	0.024 ± 0.003
$D_{0^{-1}}(\lambda -)$	0.0086 ± 0.0004	0.010 ± 0.001	0.013 ± 0.001
$\alpha (\times 10^{-3})$	1.47 ± 0.32	2.25 ± 0.77	5.07 ± 2.60
$\beta (\times 10^{-3})$	4.51 ± 0.33	5.99 ± 0.75	7.69 ± 1.69
D (max) [Гр]	301	226	167

больше, чем параметра β . Очевидно, что возрастание максимального количества индуцированных клеток при увеличении ЛПЭ связано с ростом наклона линейного участка кривой I(D) и тем самым с увеличением количества повреждений ДНК, активирующих RecA-белок. Смещение влево положения максимума, по-видимому, обуславливается повышенной радиочувствительностью клеток и увеличением выхода повреждений, эффективно переключавших протеолитическую функцию RecA - белка в репарационные.

Таким образом, на основании вышесказанного можно прийти к выводу о том, что с возрастанием ЛПЭ излучений интенсивность SOS-ответа клеток увеличивается. Аналогичный результат получен также в работе [18]. Можно полагать, что этот факт связан с возникновением в клеточной ДНК большего количества повреждений, которые не восстанавливаются в процессе polA-зависимой репарации, а лишь при участии recA-lexA зависимой SOS-репарации. Такими повреждениями могут быть некоторые типы ОН-разрывов ДНК со сложной структурой концевых групп, комбинированные повреждения, возникающие после двух и более актов передачи энергии [8, 19].

Литература

- [1] Lwoff L., Siminovitch N., Kjeldgaard N. Induction de la production de bacteriophages une bacteries lysogene. Ann.Inst.Pasteur, 79, 1950, pp.815-859.
- [2] Bertany G. Studies of Lysogenesis. I.The mode of phage liberation by Lysogenic E.coli. J.Bacteriol., 62, 1951, pp.01-318.
- [3] Marcovich H. Quantitative Biological Test Sensitive to Low Doses of Ionizing Radiation. Nature, 174, 1954, pp.796-797.
- [4] Marcovich H., Latarget R. Radiobiological aspects of the induction of lysogenic bacteria to produce phage with X-Ray, Gamma ray, and ultraviolet radiations. Adv.Biol.Med.Phys., 6, 1958, pp.75-94.
- [5] West S.C., Powell U.A., Emmerson T. recA+ dependent Inactivation of the Lambda Repressor in Escherichia coli Lysogens by γ -Radiation. Mol.Gen.Genet., 141, 1975, pp.1-8.
- [6] Хестников В.Д. Репарация ДНК и ее биологическое значение. Л.: Наука, 1979.
- [7] Аносова М.Г., Бонев М.Н., Данилов В.И. Роль чувствительных бактерий в определении числа негативных колоний фага на плотных питательных средах. Микробиология, 56, 1987, с. 484-487.
- [8] James F., Roos M. MINUIT - a system for function minimization and analysis of the parameter errors and correlations. Computer Phys. Commun., 10, 1975.
- [9] Ланцов Б.А. Бактериальный белок RecA: Биохимический, генетический и физико-химический анализ. Генетика, 21, 1985, с. 1413-1427.
- [10] Craig N.L., Roberts J.W. E.coli recA protein-directed cleavage of phage λ repressor requires polynucleotide. Nature, 283, 1982, pp.26-30.
- [11] Kozubek S., Krasavin E.A. Cell Sensitivity to Irradiation and DNA Repair Processes. DNA Damage and Its Repair in Escherichia coli. Neoplasma, 31, 1984, pp.675-683.
- [12] Kozubek S., Krasavin C.A. Cell Sensitivity to Irradiation and DNA Repair Processes. The Cell Sensitivity to Ionizing Radiation of Different LETs. Neoplasma, 31, 1984, pp.684-694.
- [13] Christensen R.C., Tobias C.A. Heavy ion induced single- and double strand breaks in ϕ X 174 replicative form DNA. Int.J. Radiol.Biol., 22, 1972, pp.457-477.
- [14] Roots R., Yang T.C., Craize L., Blake J.E.A., Tobias C.A.

Impaired Repair Capacity of DNA Breaks Induced in Mammalian Cellular DNA by Accelerated Heavy Ions. *Radiat. Res.*, 78, 1979, pp.38-49.

[15] Ritter M.A., Cleaver J.E., Tobias C.A. High-LET radiation induce a large proportion of non-rejoining breaks in mammalian cell DNA. *Nature*, 266, 1977, pp.653-655.

[16] Бонев М., Козубек С., Красавин Е.А. Сообщение ОИЯИ. P19-88-47. Дубна 1988.

[17] Sussman R., Resnick J., Calame K., Baluch J. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 75, 1978, pp.5817-5821.

[18] Козубек С., Красавин Е.А., Линь Н., Сошка И., Драшил В., Амиртаев К.Г., Токарова Б., Бонев М. Индукция SOS-системы у клеток *E. coli* при действии ускоренных тяжелых ионов. Препринт ОИЯИ P19-87-215, Дубна 1987.

[19] Bridges B.A., Mottershead R.P. Gamma ray mutagenesis in a strain of *Escherichia coli* deficient in DNA polymerase I. *Heredity*, 29, 1972, p.203-211.

Рукопись поступила в издательский отдел
21 января 1988 года.

Бонев М.Н. и др. P19-88-49
Индукция профага λ при облучении клеток
E. coli излучениями с разной ЛПЭ

Изучена зависимость индукции профага $\lambda I(D)$ при облучении лизогенных клеток *E. coli* ионизирующими излучениями с разной ЛПЭ (L). Показана роль баланса активностей полифункционального Rec A-белка в формировании характера кривой $I(D)$. Экспериментальные данные аппроксимируются функцией $I(D) = \alpha D(1 - \exp(-D_0^{-1}D)) \exp(-\beta D)$. Возрастание индукцибельности α с ростом L связывается с возрастанием выхода повреждений ДНК, являющихся сигналом запуска SOS-системы.

Работа выполнена в Лаборатории ядерных проблем ОИЯИ.

Препринт Объединенного института ядерных исследований. Дубна 1988

Bonev M.N. et al. P19-88-49
The λ Prophage Induction in Lysogens *E. coli* by
Exposure to Ionizing Radiation of Different LET

The dependence of λ prophage induction on the dose $I(D)$ in lysogens of *E. coli* irradiated by ionizing radiation with different LET(L) has been investigated. The role of the balance of pleiotropic activities of Rec A protein has been analysed. The experimental data were fitted by the function $I(D) = \alpha D(1 - \exp(-D_0^{-1}D)) \exp(-\beta D)$. The increase of induction potency α with increasing L was connected with increasing production of DNA lesions which are a signal for the SOS-system induction.

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

Preprint of the Joint Institute for Nuclear Research. Dubna 1988