

СООБЩЕНИЯ  
ОБЪЕДИНЕННОГО  
ИНСТИТУТА  
ЯДЕРНЫХ  
ИССЛЕДОВАНИЙ  
ДУБНА

Б-812

P19-88-81

М.Н.Бонев, С.Козубек, Е.А.Красавин

ВЛИЯНИЕ ПРЕРАДИАЦИОННЫХ УСЛОВИЙ  
КУЛЬТИВИРОВАНИЯ НА ИНДУКЦИЮ ПРОФАГА  
 $\lambda$  У БАКТЕРИЙ *ESCHERICHIA COLI*  
ПРИ  $\gamma$ -ОБЛУЧЕНИИ

1988

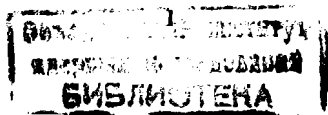
Известно, что эффективность медленной репарации у бактерий зависит от среды роста клеток [1]. Медленная репарация, являющаяся частью сложной индуцибельной SOS - системы, полностью определяется экспрессией генов *gesA* и *lexA* [2]. У лизогенных штаммов *E.coli* об экспрессии гена *gesA* можно судить, изучая закономерности индукции профага, поскольку репрессор профага расщепляется продуктом гена *gesA* - *ResA* - белком в результате приобретения им протеазных свойств [3]. Поэтому, если эффективность работы *gesA-lexA* - системы у клеток, выращиваемых в богатых и бедных ростовых условиях, неодинакова, то это должно отразиться и на характере зависимости индукции профага у клеток, культивировавшихся в предрадиационный период в различных условиях. Для проверки этого предположения и была выполнена настоящая работа.

#### 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  $\lambda$  дикого типа при лизогенизации штамма *HfrH*.

Применяли следующие питательные среды: среду, приготовленную на основе аминокислот (АМП-среда: аминокислоты, производства завода медпрепаратов Ленинградского мясокомбината, разбавленный на 2/3, 0,15 М раствор  $\text{NaCl}$ ), мясопептонный бульон (МПБ) и мясопептонный агар (МПА), производства института эпидемиологии и микробиологии им. Х.Ф.Гамалеи МЗ СССР, Москва, минимальную среду М9 (6г  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 3г  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,5г  $\text{NaCl}$ , 1г  $\text{NH}_4\text{Cl}$  - на 1 л  $\text{H}_2\text{O}$  с добавлением 1 мл 0,1 М раствора  $\text{CaCl}_2$ , 1 мл 1 М раствора  $\text{MgSO}_4$ , 1,25 мл 40% глюкозы и 0,0001% тиамин после автоклавирования).

Культуру клеток (лизогенный и индикаторный штаммы) выращивали на разных питательных средах до стационарной фазы роста ( $2-4 \cdot 10^8$



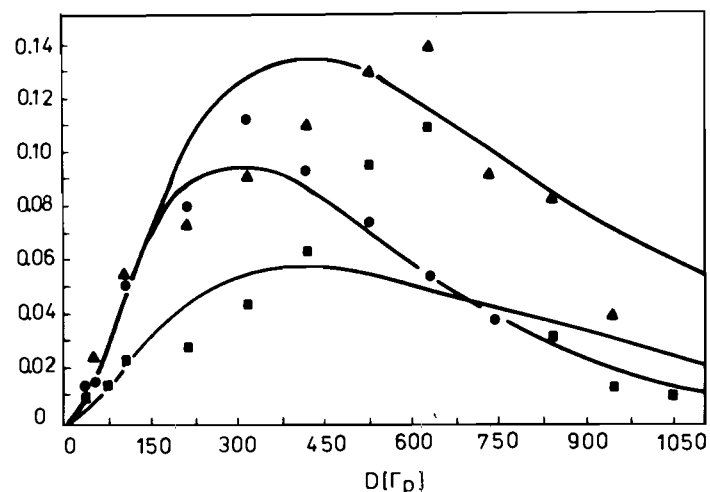


Рис. 2. Зависимость индукции фага  $\lambda$  бактериального штамма HfgH( $\lambda$ ) от дозы облучения для разных предрадиационных условий культивирования: среда М9 (■), среда МПБ (●), и среда АМП (▲). По оси абсцисс - доза облучения, Гр, по оси ординат - индукция, отн.ед.

величины  $I$  при дальнейшем возрастании дозы облучения. Зависимость  $I(D)$  можно описать функцией:

$$I(D) = \alpha \cdot D \cdot \exp(-\beta \cdot D) \cdot (1 - \exp(-D \cdot D_0^{-1})) \quad (1)$$

ТАБЛИЦА. Значения параметров кривой  $I(D)$  при разных предрадиационных условиях культивирования клеток

Тип ростовой среды	$\alpha (\times 10^{-3})$	$\beta (\times 10^{-3})$	$D_0^{-1} (\lambda) (\times 10^{-3})$	$D_0^{-1} (\lambda-) (\times 10^{-3})$	$D_m$ [Гр]
М 9	$10,45 \pm 0,09$	$2,76 \pm 0,36$	$19,5 \pm 0,5$	$9,5 \pm 0,5$	375
МПБ	$11,04 \pm 0,17$	$3,88 \pm 0,17$	$12 \pm 0,6$	$8,6 \pm 0,5$	300
АМП	$11,09 \pm 0,10$	$2,80 \pm 0,17$	$17,5 \pm 0,4$	$5,7 \pm 0,3$	413

Начальный наклон этой кривой ( $\alpha$ ) назван нами ранее индукцибельностью [6]. Значения параметров кривых  $I(D)$  и радиочувствительность штаммов ( $\lambda \pm$ ) приведены в таблице.

Из представленных материалов видно, что индукцибельность фага возрастает при культивировании клеток из среды М9 в МПБ- и АМП-среды.

Значения радиочувствительности  $D_0^{-1}$  возрастают в последовательности АМП, М9, МПБ. Параметр  $\beta$  в рамках экспериментальных ошибок для сред М9 и АМП не меняется, и для среды МПБ возрастает в 1,4 раза.

#### ОБСУЖДЕНИЕ

В работе [7] было показано, что изменение чувствительности клеток к облучению при выращивании клеток в разных ростовых средах следует связывать с разной способностью клеток репарировать повреждения ДНК, а именно с разной эффективностью медленного типа репарации. Медленная репарация осуществляет восстановление нарушенной структуры ДНК как одна из индукцибельных SOS - функций клеток.

Центральную роль в SOS - индукции играет, как известно, RecA - белок, который может обладать протеолитическими свойствами. RecA - протеаза способна расщеплять LexA - репрессор и репрессоры фагов  $\lambda$  и P22 [8].

Кроме того, одной из основных функций RecA - белка является его способность к связыванию с однонитевыми брешнями ДНК и защите этих брешней от дальнейшего воздействия экзонуклеаз, что предотвращает образование значительных двуниевых разрывов ДНК, которые являются летальными для клетки. Распределение RecA - белка в клетке в соответствии с его отдельными функциями, по-видимому, может зависеть от характера и количества возникающих в ДНК повреждений и от подготовленности клетки к SOS - индукции.

Следует иметь в виду, что отдельные опероны SOS - системы индуцируются в процессе SOS - ответа в разной степени и по разной кинетике [2]. Поэтому перераспределение RecA - белка может влиять на некоторые из SOS - зависимых функций. Наиболее чувствительным к расщеплению является LexA - репрессор, что обеспечивает индукцию синтеза RecA - белка уже при малых концентрациях RecA - протеазы.

При культивировании в богатой ростовой среде в клетке, по-видимому, синтезируется достаточно большой конститутивный

уровень белков, в том числе и RecA - белка. Это обстоятельство, очевидно, должно сопровождаться эффективной экспрессией различных SOS - функций. Этим можно объяснить увеличение индуцибельности профага  $\lambda$  у клеток, выращенных в богатых средах, и увеличение максимума кривой I(D).

Нарастание и падение I(D) описываются параметрами  $\alpha$  и  $\beta$  соответственно. Увеличение параметра  $\beta$  и увеличение радиочувствительности  $D_{0.1}$  смещают максимум на кривой I(D) влево, к малым дозам. Увеличение максимума кривой I(D) в среде АМП относительно среды МПБ, очевидно, определяется параметром  $\beta$ , так как индуцибельность  $\alpha$  для двух сред культивирования практически одинакова. Смещение максимума при среде МПБ влево, по-видимому, определяется более высокой радиочувствительностью и увеличением выхода повреждений, переключающих протеазную активность RecA - белка на другие его функции. Здесь, возможно, играет роль и баланс между деградационной активностью RecBC - экзонуклеазы и ограничивающим ее действие RecA - белком. В среде АМП этот баланс, по-видимому, смещается в сторону RecA - белка. В бедной среде (М9) индуцибельность  $\alpha$  в 2 раза меньше, чем в богатых средах, что вместе со значением величин  $\beta$  и  $D_{0.1}$  объясняет низкий максимум и его промежуточное положение на оси абсцисс.

Разница в чувствительности изогенных  $\lambda^+$  и  $\lambda^-$  штаммов к  $\gamma$ -облучению объясняется, как отмечено ранее [9], не индукцией профага, а взаимодействием RecA - протеазы с  $\lambda$  - репрессором. Поэтому при уменьшении степени выраженности SOS - индукции у клеток, культивированных в бедной среде, можно ожидать не только уменьшения индуцибельности профага ( $\alpha$ ), но также и уменьшения разницы в чувствительности между  $\lambda^+$  и  $\lambda^-$  штаммами. Действительно, если величина ФИД: 1,3-1,4 для богатых сред (АМП и МПБ), то для М9 среды ФИД: 1.

В связи с изложенным, можно прийти к заключению о том, что индуцибельность профага у  $\gamma$ -облученных лизогенных клеток увеличивается при предрадиационном культивировании в богатой ростовой среде по сравнению с бедной ростовой средой. Это связано с предуготовленностью SOS - системы к индукции, главным образом, с повышением количества ключевого в SOS - системе RecA - белка.

#### ЛИТЕРАТУРА

- [1] Хестяников В.Д. Репарация ДНК и ее биологическое значение. Наука, Л., 1979.
- [2] Little J.W., Mount D.W., Cell, 1982, 20, p.11-22.
- [3] Roberts J.W., Roberts C.W., Proc.Nat.Acad.Sci.USA, 1975, 72, p.147-153.
- [4] Аносова М.Г., Бонев М.Н., Данилов В.И., микробиология, 1987 56, с.484-487.
- [5] Roos J.F., Computer Phys.Commun., 1975, 10.
- [6] Бонев М.Н., Козубек С., Красавин Е.А., Череватенко А.П. P19-88-49, Дубна 1988.
- [7] Kozubek S., Krasavin E.A., Neoplasma, 1984, 31, p.675-683.
- [8] Ланцов Б.А., Генетика, 1985, 21, стр.1413-1427.
- [9] Бонев М.Н., Козубек С., Красавин Е.А., P19-88-47, Дубна 1988.

Рукопись поступила в издательский отдел  
29 января 1988 года.