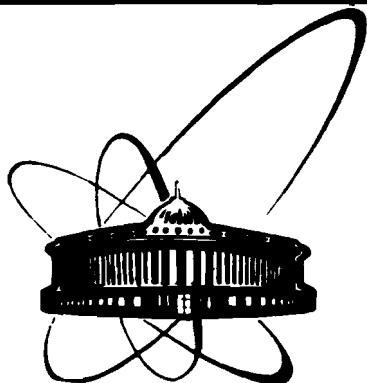


89-124



ОБЪЕДИНЕННЫЙ
ИНСТИТУТ
ЯДЕРНЫХ
ИССЛЕДОВАНИЙ
ДУБНА

Б 24

P19-89-124

В.В.Барцевич, К.Г.Амиртаев, Е.А.Красавин,
М.Н.Бонев

МОДИФИЦИРУЮЩЕЕ ВЛИЯНИЕ ГЛИЦЕРИНА
И ЦИСТЕАМИНА НА ИНДУКЦИЮ ПРОФАГА λ
У КЛЕТОК *E.coli* ПРИ γ -ОБЛУЧЕНИИ

Направлено в журнал "Радиобиология"

1989

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что центральную роль в механизме радиационно-индуцированного мутагенеза у прокариот играет SOS-система. Выражение SOS-ответа у клеток *E.coli* проявляется, в частности, в индукции профага λ , которая находится под генетическим контролем генов, участвующих также и в выражении других SOS-функций.

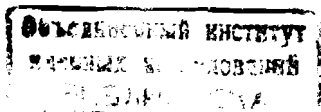
Одним из важных моментов в расшифровке механизма SOS-ответа является вопрос о SOS-сигнале. Установлено, что ими могут являться некоторые типы повреждений ДНК. В связи с этим представляется важным изучить влияние радиопротекторов различных классов, модифицирующих выход таких повреждений, на SOS-индукцию клеток. С учетом этого фактора нами было предпринято исследование модифицирующего влияния радиопротекторов глицерина и цистеина на индукцию профага λ у клеток *E.coli*.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В работе использовали следующие штаммы бактерий *Escherichia coli*: HfrH(λ) (*thi*), P3478(λ) (*poIA1*, *B1*, *thy*), C (*str*). Штамм C использовали как индикаторный, то есть чувствительный к фагу λ .

Культуру клеток /лизогенный и индикаторный штаммы/ инкубировали в 10 мл мясо-пептонного бульона /производства Института эпидемиологии и микробиологии имени Н.Ф.Гамалеи АМН СССР/ в течение 17 ч при температуре 37°C до стационарной фазы роста $/2-4 \cdot 10^8$ клеток/мл/. Затем клетки индикаторного штамма разводили 2 раза 0,01М раствором $MgSO_4$, а суспензию лизогенного штамма центрифугировали в течение 15 мин $/8000g/$ и ресуспендировали в 1-2 мл 0,01 раствора $MgSO_4$.

В опытах по определению индукции профага λ в целях очистки культуры от свободного фага, который всегда присутствует в растворе 0,1 мл клеточной суспензии фильтровали через стерильные лавсановые ядерные фильтры с диаметром пор 0,5 мкм /производства Лаборатории ядерных реакций Объединенного института ядерных исследований/. При этом фильтры помещали на специальную подложку, впитывающую в себя проходящую через поры воду, низкомоле-



кулярные соединения и бактериофаги. Данный метод позволяет снизить уровень фоновой концентрации больше, чем на два порядка: с $2,2 \pm 0,6 \cdot 10^5$ до $1,8 \pm 0,7 \cdot 10^3$ фаговых частиц на мл^{1/1}.

Фильтры с оставшимися клетками помещали в 2 мл 0,01М раствора $MgSO_4$ с оставлением или без добавления радиопротекторов до определенной концентрации - глицерина - 1М, цистеамина - 0,02М. При таких концентрациях указанные радиопротекторы обладают максимальной эффективностью^{2,3/}. Протекторы вводили за 30 мин до облучения. Облучение проводили на поверхности лавсановых ядерных фильтров, расположенных на специальных подложках из мясопептонного агара /МПА, производства Института эпидемиологии и микробиологии им.Н.Ф.Гамалеи АМН СССР/ приготовленных в форме цилиндров диаметром 12 мм, высотой 2-3 мм, в чашках Петри. Перед этим на поверхность фильтров наносили микропипеткой суспензию клеток объемом 0,01 мл.

После облучения клетки смывали с поверхности фильтров встряхиванием в 2 мл 0,01М раствора $MgSO_4$, разводили до нужной концентрации и рассевали на чашки Петри, содержащие 15-20 мл МПА с добавлением 3 мл/л одномолярного раствора $MgSO_4$. Затем чашки инкубировали в течение 2 ч при температуре 37°C. Этого времени достаточно для того, чтобы клетки, в которых началась индукция профага, были лизированы и произошел выход фага^{1/1}. После этого чашки заливали 3 мл верхнего агара /10 г пептона, 1 г дрожжевого экстракта, 8 г NaCl, 7 г агара в 1 л H_2O с добавлением 3 мл/л 1М раствора $MgSO_4$ после автоклавирования/ при температуре 42°C вместе с 0,1 мл культуры индикаторного штамма и добавлением 2 мг/мл стрептомицина. Антибиотик, убивая лизогенные клетки, предотвращает возникновение негативных колоний вследствие спонтанной индукции профага в течение последующей 20-часовой инкубации чашек при 37°C.

Частоту индукции определяли как отношение выявленных негативных колоний при титровании инфекционных центров к количеству образующихся колоний клеток необлученной культуры.

Выживаемость клеток и ее модификацию радиопротекторами определяли стандартным методом макроколоний.

Облучение проводили на γ -установке с источником ^{137}Cs /мощность дозы - 23 Гр/мин/. Опыты повторяли 3-5 раз. Кривые выживания аппроксимировали функцией $S = \exp(-D/D_0)$, где S - выживаемость, D - доза, D_0 - среднелетальная доза.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что в результате действия ионизирующих излучений в ДНК клеток возникают различные повреждения, из которых наибольшее биологическое значение имеют одно- и двунитевые раз-

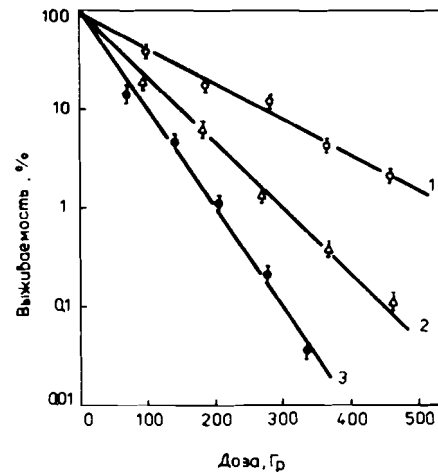


Рис.1. Выживаемость клеток *E.coli* HfrH(λ) при γ -облучении: 1 - с глицерином; 2 - с цистеамином; 3 - без протекторов. По оси абсцисс - доза облучения, Гр; по оси ординат - выживаемость, %.

рывы /ОР и ДР/, а также повреждение азотистых оснований /первичные γ -сайты/^{4/}. Разнообразные первичные γ -сайты "узнаются" клеточными эндонуклеазами, которые переводят их в ОР ДНК.

Под влиянием экзонуклеаз эти ОР могут "перерастать" в протяженные однонитевые бреши ДНК. С такими брешами хорошо связывается RecA-белок, который наряду с LexA-белком играет ключевую роль в SOS-ответе клеток^{5/}. В результате связывания RecA-белка с однонитевыми участками ДНК или полинуклеотидами формируется активный протеазный комплекс, который в присутствии АТФ или АТФ S /аденозин-5-тиотрифосфата - негидролизуемого аналога АТФ/ способен расщеплять λ -репрессор^{6,7/}. Расщепление λ -репрессора приводит к запуску литического цикла развития профага. Протеолизу подвергается также и LexA-белок, который является репрессором для ряда других генов, участвующих в SOS-ответе клеток.

Таким образом, при облучении индукция профага λ происходит в результате расщепления λ -репрессора RecA-белком, который может активироваться однонитевыми участками и брешами в ДНК.

Таким образом, при облучении индукция профага λ происходит в результате расщепления λ -репрессора RecA-белком, который может активироваться однонитевыми участками и брешами в ДНК.

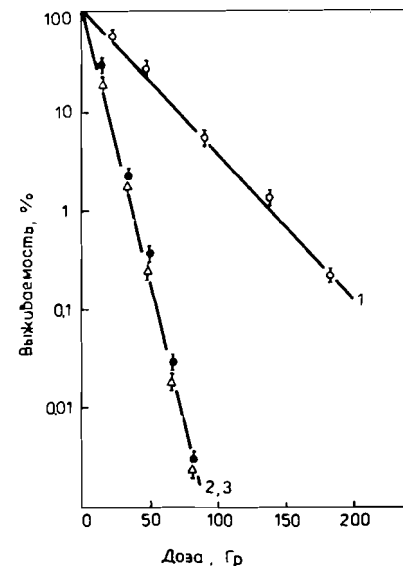


Рис.2. Выживаемость клеток *E.coli* P3478(λ) при γ -облучении: 1 - с глицерином; 2,3 - с цистеамином /светлые символы/ и без протекторов /темные символы/. По оси абсцисс - доза облучения, Гр; по оси ординат - выживаемость, %.

На рис.1 и 2 представлены кривые выживания штаммов HfrH(λ) и P3478(λ) соответственно при облучении в нормальных условиях и в присутствии радиопротекторов - глицерина и цистеина. Значения фактора изменения дозы /ФИД = D_0^{-1}/D_{op}^{-1} , где D_{op}^{-1} - радиочувствительность клеток при облучении в присутствии радиопротектора, а D_0^{-1} - при облучении без радиопротекторов/ приведены в таблице. Возможные механизмы защитного действия использованных радиопротекторов рассмотрены нами ранее^{/8,9/}.

Таблица

Значения ФИД при модифицирующем влиянии радиопротекторов на выживаемость клеток E.coli

Протектор \ Штамм	HfrH(λ)	P3478(λ)
	ФИД	ФИД
Глицерин	2,8±0,3	3,7±0,5
Цистеамин	1,5±0,2	1,0±0,1

На рис.3 и 4 представлены дозовые зависимости частоты индукции профага λ для клеток штаммов HfrH(λ) и P3478(λ) при γ -облучении в присутствии глицерина, цистеина и в отсутствие радиопротекторов. Видно, что зависимость частоты индукции профага для клеток обоих штаммов при облучении в отсутствие радиопротекторов представляет собой кривую с максимумом. Такая форма кривой, по-видимому, является результатом изменения протеазной активности RecA-белка в клетке при возрастании дозы облучения^{/10/}.

У *rolA*-мутанта максимум дозовой зависимости индукции профага достигается при дозе, в 5 раз меньшей, чем у клеток дикого типа. Вероятно, это обусловлено тем, что у *rolA*-мутанта остается много повреждений, которые удаляются только в процессе *recA*-*lexA*-зависимой репарации. А как известно, такая репарация сопровождается образованием большого числа одонитевых участков и брешей ДНК, которые являются сигналом для запуска SOS-системы^{/11/}.

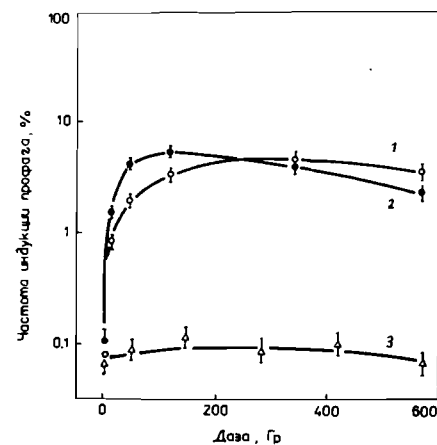


Рис.3. Зависимость частоты индукции профага λ от дозы γ -облучения у клеток E.coli HfrH(λ): 1 - в присутствии глицерина; 2 - в отсутствие радиопротекторов; 3 - в присутствии цистеина. По оси абсцисс - доза облучения, Гр; по оси ординат - частота индукции профага, %.

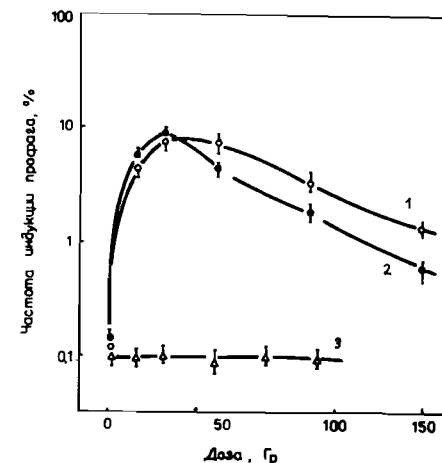


Рис.4. Зависимость частоты индукции профага λ от дозы γ -облучения у клеток E.coli P3478(λ): 1 - в присутствии глицерина; 2 - в отсутствие радиопротекторов; 3 - в присутствии цистеина. По оси абсцисс - доза облучения, Гр; по оси ординат - частота индукции профага, %.

При облучении клеток в присутствии глицерина форма кривых почти не меняется, но происходит некоторый сдвиг максимума в сторону больших доз. Ранее нами было показано^{/8/}, что протекторный эффект глицерина можно объяснить снижением выхода *OP* ДНК, восстанавливаемых *rolA*-зависимой репарацией. Поэтому можно предполагать, что либо такие повреждения также вносят некоторый вклад в формирование SOS-сигнала, либо глицерин способствует незначительному уменьшению повреждений, удаляемых в процессе *recA*-*lexA*-зависимой репарации.

Как видно из рис.3 и 4, цистеин существенно подавляет индукцию профага λ у обоих штаммов. Известно, что механизм действия этого радиопротектора отличен от механизма действия глицерина^{/9/}. Защитный эффект цистеина, по-видимому, осуществляется путем угнетения активности действия эндонуклеаз, производящих инцизию первичных γ -сайтов. Это происходит либо в результате модификации сайтов, либо в результате непосредственного взаимодействия молекул протектора с эндонуклеазами^{/12/}. Прямое взаимодействие цистеина с ферментами может быть обусловлено

образованием смешанных дисульфидных связей между SH-группами протектора и функциональными серосодержащими группами ферментов^{/13/}. Образование таких связей может привести к временной потере биологической активности фермента. Таким образом, угнетая процесс инцизии, а косвенно - и эксцизии, цистеамин способствует уменьшению степени деградации ДНК, что, вероятно, и является причиной его защитного эффекта^{/3/}.

На основании всего сказанного подавление цистеамином индукции профага λ , по-видимому, можно объяснить следующими причинами:

1/ радиопротектор в результате своего противодействия деградации ДНК способствует уменьшению выхода числа поврежденных, которые активируют протеазную активность RecA-белка, и тем самым предотвращает расщепление λ -репрессора;

2/ молекулы цистеамина напрямую взаимодействуют с RecA-белком, уменьшая его протеазную активность;

3/ молекулы цистеамина взаимодействуют с λ -репрессором, препятствуя его расщеплению.

В поддержку первого предположения говорит также тот факт, что у *recBC*-мутанта отсутствует индукция профага^{/11,14/}. А как известно, у этого мутанта имеется блок одной из самых мощных экзонуклеаз клетки - экзонуклеазы \bar{V} , и степень деградации ДНК мала. Взаимодействие с RecA-белком и λ -репрессором может происходить в результате образования дисульфидных связей с молекулами цистеамина. Что касается λ -репрессора, то такое взаимодействие, по-видимому, должно приводить к изменению его конформации, так как предполагается, что RecA-белок узнает непосредственно третичную структуру репрессора, а не сам сайт расщепления^{/5/}. Это предположение основано на том, что область расщепления различных репрессоров имеет весьма ограниченную гомологию.

Возникает вопрос: подавляет ли цистеамин только индукцию профага, или вообще SOS-ответ? Предварительные исследования SOS-ответа методом SOS-хроматеста показали, что этот радиопротектор незначительно подавляет SOS-ответ. В связи с этим заметим следующее. Метод SOS-хроматеста основан на измерении в среде уровня β -галактозидазы^{/15/}. Штамм PQ37, на котором ведутся такие исследования, сконструирован так, что ген, кодирующий β -галактозидазу, находится под негативным контролем LexA-репрессора, который так же, как и λ -репрессор, расщепляется RecA-белком. Однако было показано^{/5/}, что λ -репрессор расщепляется значительно хуже, чем LexA-репрессор. Кроме того, индукция профага происходит лишь в том случае, когда инактивируется приблизительно 90% его репрессора^{/16/}. Поэтому, вероятно, нет противоречия в том, что даже в случае снижения про-

теазной активности RecA-белка, индукция профага может и не произойти, хотя другие SOS-функции могут реализоваться.

Итак, проведенные исследования показали, что глицерин незначительно влияет на индукцию профага и лишь слегка изменяет форму кривой зависимости частоты индукции профага от дозы γ -облучения. Цистеамин же существенно подавляет индукцию профага. Это происходит, по-видимому, вследствие того, что цистеамин либо уменьшает протеазную активность RecA-белка /связываясь с ним или уменьшая количество повреждений, его активирующих/, либо взаимодействует с λ -репрессором, изменяя его конформацию и тем самым предохраняя от расщепления.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бонев М.Н., Козубек С. - ОИЯИ, P19-87-791, Дубна, 1987.
2. Alper T. - Cellular Radiobiology. Cambridge-L.-N.I. - Melbourne, Cambridge University Press, 1979.
3. Калинин В.Л. и др. - Радиобиология, 1979, т.19, с.548.
4. Жестяников В.Д. - Репарация ДНК и ее биологическое значение. Л.: "Наука", 1979.
5. Little J.W., Mount D.W. - The SOS regulatory system of *Escherichia coli*. Cell, 1982, v.29, p.11.
6. Roberts J.W., Roberts C.W., Mount D.W. - Inactivation and proteolytic cleavage phage λ repressor in vitro in an ATP dependent reaction. Proc. Nat. Acad. Sci., 1977, v.74, p.2283.
7. Craig N.L., Roberts J.W. - *E.coli* recA protein directed cleavage of phage λ repressor requires polynucleotide. Nature, 1980, v.283, p.26.
8. Амиртаев К.Г. и др. - ОИЯИ, P19-84-798, Дубна, 1984.
9. Красавин Е.А. и др. - ОИЯИ, P19-85-721, Дубна, 1985.
10. Бонев М.Н. и др. - ОИЯИ, P19-88-49, Дубна, 1988.
11. Бонев М.Н., Козубек С., Красавин Е.А. - ОИЯИ, P19-88-151, Дубна, 1988.
12. Bresler S.E. et al. - Mechanism of the radioprotecting action of chemical compounds on *Escherichia coli* cells. Molec. Gen. Genet., 1978, v.163, p.75.
13. Романцев Е.Ф. и др. - Биохимические основы действия радиопротекторов. М.: "Атомиздат", 1980.
14. Ibre R.M., Oishi M. - J.Bacteriol., 1980, v.144, p.1061.
15. Козубек С. и др. - ОИЯИ, P19-87-215, Дубна, 1987.
16. Johnson A.D. et al. - Nature, 1981, v.294, p.217.

Рукопись поступила в издательский отдел
24 февраля 1989 года.