

ОБЪЕДИНЕННЫЙ  
ИНСТИТУТ  
ЯДЕРНЫХ  
ИССЛЕДОВАНИЙ

Дубна

99-272

P19-99-272

О.В.Комова, Е.С.Кандиано, Е.А.Красавин

ВЛИЯНИЕ *umuC*-МУТАЦИИ НА ИНДУКЦИЮ  
SOS-ОТВЕТА В КЛЕТКАХ *E.coli*  
ПРИ ОБЛУЧЕНИИ УЛЬТРАФИОЛЕТОМ  
И  $\gamma$ -ЛУЧАМИ

Направлено в журнал «Радиационная биология. Радиоэкология»

1999

Влияние *umuC*-мутации на индукцию SOS-ответа в клетках *E.coli* при облучении ультрафиолетом и  $\gamma$ -лучами

Проведен сравнительный анализ кинетических зависимостей SOS-ответа в клетках *E.coli* дикого типа и *umuC*-мутанте при облучении ультрафиолетом и  $\gamma$ -лучами. Показано, что наличие в клетке нормального UmuC-белка приводит к задержке SOS-индукции и снижению ее уровня в 3–5,5 раз как при УФ-, так и  $\gamma$ -излучениях. Такое снижение SOS-индукции в клетках дикого типа, облученных УФ, обусловлено более эффективной элиминацией фотоповреждений ДНК эксцизионной системой репарации. UmuCD-зависимое ингибирование репликации рассматривается как возможный механизм, обеспечивающий дополнительное время для безошибочной репарации.

Работа выполнена в Отделении радиационных и радиобиологических исследований ОИЯИ.

Препринт Объединенного института ядерных исследований. Дубна, 1999

#### Перевод авторов

Komova O.V., Candiano E.S., Krasavin E.A.

P19-99-272

Effect of an *umuC* Mutation on the SOS-Response in *E.coli* Cells Exposed to UV-light and  $\gamma$ -Radiation

Kinetics dependences of the SOS-induction in *E.coli* cells of wild type and deficient in *umuC* gene exposed to UV and  $\gamma$ -rays were analysed. In the presence of UmuC protein SOS-induction was 3–5.5 times lower and delayed for about 30 minutes after both UV and  $\gamma$ -rays. It was shown that decrease of the SOS-induction in wild type cells irradiated by UV was due to more effective elimination of the photolesions from DNA by excision repair system. UmuCD-dependent inhibition of DNA replication was discussed as a possible mechanism allowing additional time for error-free repair.

The investigation has been performed at the Division of Radiation and Radiobiological Research, JINR.

Продукты генов *recA*, *umuC* и *umuD* играют ключевую роль в УФ- и  $\gamma$ -индуцированном мутагенезе в клетках *E.coli*. Все они принадлежат к SOS-регулону и экспрессируются в ответ на действие ДНК-повреждающих факторов. RecA-белок, помимо своей прямой функции в мутагенезе, которая до настоящего времени точно не установлена, осуществляет регуляцию всей SOS-системы. Приобретая в поврежденной клетке копротеазную активность (RecA\*), он расщепляет LexA-белок, являющийся репрессором SOS-генов, в том числе и самого *recA*. Кроме того, RecA-копротеаза необходима для расщепления UmuD-белка на два фрагмента, лишь один из которых, UmuD', активен в мутагенезе [1].

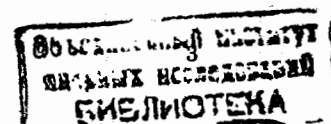
Роль UmuCD-белков, составляющих единый оперон, неизвестна. Предполагается, что UmuCD' в комплексе с RecA, Ssb и, возможно, рядом не установленных пока других белков, наделяют полимеразу III способностью вести так называемый синтез "через повреждение", предотвращая гибель клетки в результате остановки репликации, который сопровождается значительным выходом ошибок [2]. Мутации в генах, кодирующих эти белки, практически полностью элиминируют УФ-мутабельность [3-4] и от 30 до 70% (по разным локусам) мутаций, индуцированных  $\gamma$ -излучением [5].

Открытие явления UmuCD-зависимой холодовой чувствительности роста у клеток *E.coli* позволило установить наличие у UmuCD-белков еще одной функции, не связанной с их участием в мутагенезе [6]. Холодовая чувствительность проявляется в неспособности *lex(Def)*-штаммов, конститутивно экспрессирующих на высоком уровне UmuCD-белки из многокопийной плазмиды, расти при 30° С. При этом они сохраняют нормальную скорость роста при 42° С. При 30° С такие клетки филаментируют, что впоследствии может приводить к их гибели. Кроме того, скорость синтеза ДНК в них снижена вдвое по сравнению с клетками, имеющими лишь одну копию *umuCD*-генов в хромосоме *E.coli*. При 42° С эти скорости практически не отличаются друг от друга, т.е. высокая температура способна супрессировать холодовую чувствительность роста. Впоследствии было установлено, что холодовая чувствительность роста и филаментация представляют

собой два независимых процесса, хотя для обоих требуется экспрессия UmuCD-белков на высоком уровне [7]. Поэтому холодовая чувствительность обусловлена, вероятнее всего, ингибированием синтеза ДНК.

Как было отмечено выше, функция UmuCD-белков, проявляющаяся в холодовой чувствительности роста, отличается от их традиционной роли в мутагенезе. Она не требует RecA-белка и активации UmuD-белка. Замена UmuD на UmuD' на многокопийной плазмиде приводит к снижению холодовой чувствительности, хотя увеличивает мутагенез [7]. Накопленные к настоящему времени данные, приведенные выше, свидетельствуют о том, что эти белки каким-то образом вовлекаются в регуляцию клеточного цикла. Возможно, они необходимы для координации продвижения по клеточному циклу и репликации ДНК с репарационными процессами в SOS-индуцированных клетках. Было высказано предположение, что индукция SOS-системы в ответ на действие ДНК-повреждающих факторов, обеспечивает высокий уровень синтеза UmuC- и интактного UmuD-белков, которые вовлекаются в ингибирование репликации ДНК, что позволяет эксцизионной репарации элиминировать подавляющую часть повреждений. В случае тяжелых повреждений, которые не могут быть отрепарированы конститутивными системами репарации, интенсивный SOS-сигнал продолжает генерироваться достаточно долго, что позволяет RecA\*-копротеазе осуществить расщепление UmuD-белка. Образующийся в результате UmuD' является одним из главных компонентов полимеразного комплекса, способного вести синтез "через повреждение". Таким образом, происходит снятие ингибирования и продолжение репликативного цикла. Такое предположение основано на том, что скорость расщепления UmuD копротеазой RecA\* существенно ниже, чем скорость расщепления LexA [7].

В свете вышеизложенного представляется важным установить, как мутация в *umuC*-гене влияет на характер SOS-ответа в УФ- и  $\gamma$ -облученных клетках. Чтобы выяснить это, мы сравнили уровень экспрессии *cda*-гена из плазмиды ColD при УФ- и  $\gamma$ -облучении в клетках дикого типа и в клетках с мутацией *umuC122:Tn5*. Для этой цели был применен SOS-*lux*-тест [8]. В данном методе используются клетки *E.coli*, трансформированные



плазмидой pPLS 1, которая несет люциферазный оперон светящихся бактерий *Photobacterium leiognathi* под контролем строгого SOS-индуцибельного промотора *cda*-гена, отвечающего за синтез колицина в плазмиде ColD. Уровень экспрессии этого гена определяется по выходу света, являющегося продуктом люциферазной реакции.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА

В данной работе использовались следующие штаммы *E. coli* K-12: AB1157 (WT<sup>-</sup>), GW2100 (как AB1157, но *umuC122::Tn5*), ТК610 (как AB1157, но *arg<sup>+</sup>, wvrA6, ilv325, umuC36*).

Ночную культуру, выращенную в L-среде с добавлением ампицилина (50 мкг/мл), разводили в соотношении 1:50 в свежей L-среде, подращивали до оптической плотности  $OD_{560}=0.35$  в термостатируемом шейкере при 37<sup>0</sup> С. Клетки осаждали центрифугированием и ресуспендировали в буфере М9. 2,5 мл суспензии помещали в чашку Петри (диаметр 90 мм) и облучали. 1 мл облученной суспензии добавляли в колбу с 25 мл L-среды и инкубировали в шейкере при 30<sup>0</sup> С. Каждые 15 минут отбирали 0,5 мл культуры для измерения светового выхода. Световой выход (имп/с) измеряли на люцинометре при 30<sup>0</sup> С в течение 1 секунды. Одновременно измеряли оптическую плотность  $OD_{560}$ , на которую нормировались значения светового выхода. В экспериментах с УФ все манипуляции проводились при желтом свете, чтобы предотвратить нежелательную фотореактивацию.

В качестве источника УФ-света (254 нм) использовали бактерицидную лампу ДБ 30-1. Мощность дозы составляла 0,1 Дж/м<sup>2</sup>/с.

Облучение  $\gamma$ -лучами <sup>137</sup>Cs осуществляли на установке "Свет". Мощность дозы составляла 25 Гр/мин.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование кинетики SOS-ответа в клетках дикого типа и мутантных по *umuC*-гену выявило ряд существенных различий. Как видно из рис. 1, у клеток дикого типа скорость нарастания SOS-индукции значительно ниже, чем в мутантных клетках.

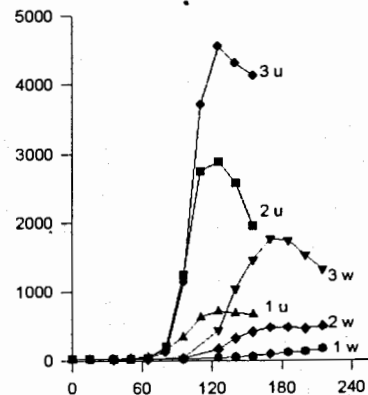


Рис.1. Кинетические кривые SOS-индукции при облучении ультрафиолетом. Доза облучения составляла: 1w, 1u - 5 Дж/м<sup>2</sup>; 2w, 2u - 10 Дж/м<sup>2</sup>; 3w, 3u - 20 Дж/м<sup>2</sup>. Кривые с символом "w" относятся к клеткам AB1157 (WT); кривые с символом "u" относятся к клеткам GW2100 (*umuC*).

По оси абсцисс - время инкубирования в минутах; по оси ординат - отношение светового выхода в тысячах импульсов в секунду к соответствующей оптической плотности культуры при  $\lambda=560$  нм

Кинетическая кривая для них характеризуется более протяженным lag-периодом (95 и 60 мин соответственно). Все эти различия наблюдаются уже на раннем этапе SOS-ответа и могут быть следствием функциональной активности UmuCD-комплекса, но не UmuCD', поскольку скорость расщепления UmuD-белка RecA\*-копротеазой существенно ниже, чем скорость расщепления LexA-репрессора. Первый из этих процессов имеет место, когда SOS-ответ в клетке индуцирован до значительного уровня. Если исходить из вышеизложенной гипотезы об участии UmuCD-комплекса в регуляции клеточного цикла, то наблюдаемые различия в индукции SOS-ответа у клеток дикого типа и *umuC*-мутанта могут быть объяснены ингибированием репликации в клетках, экспрессирующих UmuCD-белки в ответ

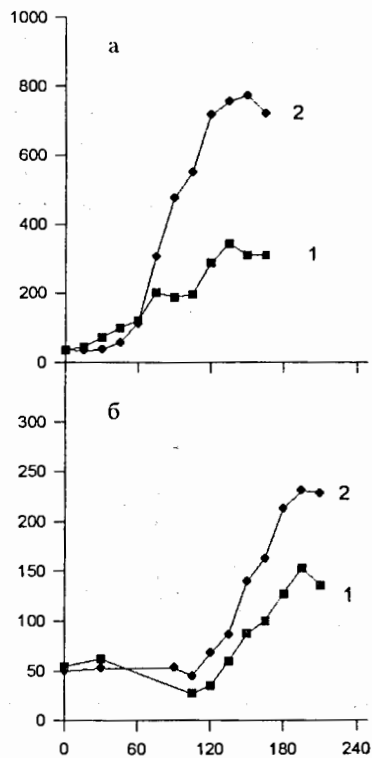


Рис.2. Кинетические кривые SOS-индукции при облучении дозой 5 Дж/м<sup>2</sup> ультрафиолета.

а - для клеток GW2100 (*umuC*); б - для клеток AB 1157(WT).

1 - культивирование сразу после облучения; 2 - культивирование после 30-минутного выдерживания в буфере.

По оси абсцисс - время инкубирования в минутах; по оси ординат - отношение светового выхода в тысячах импульсов в секунду к соответствующей оптической плотности культуры при  $\lambda=560$  нм

на действие УФ-света. Это объяснение вполне обосновано, если также принять во внимание, что SOS-сигнал в УФ-облученных клетках генерируется в процессе репликации ДНК [9].

Такое ингибирование носит, по-видимому, временный характер, т. к. после 30-минутной задержки SOS-ответ нормально индуцируется в клетках дикого типа, хотя уровень его существенно снижен по сравнению с клетками, имеющими дефект в гене *umuC*. Максимальные значения светового выхода

различаются у этих штаммов при использованных дозах в 4-5,5 раз. Возможно, в облученной клетке некий индуцибельный белковый фактор, не принадлежащий к SOS-регулону, должен быть синтезирован, чтобы супрессировать *UmuCD*-зависимое ингибирование репликации ДНК.

Тот факт, что уровень SOS-индукции значительно снижен в клетках дикого типа, позволяет предположить, что значительная часть повреждений в течение lag-периода устраняется эксцизионной репарацией. Чтобы проверить это, мы сравнили SOS-ответ в клетках, инкубация которых начиналась немедленно после облучения, и в клетках, которые выдерживались после облучения в течение 30 минут в буфере, прежде чем позволить им расти в богатой питательной среде. В условиях буфера SOS-ответ не может быть индуцирован, в то время как эксцизионная репарация протекает нормально. Как видно из рис. 2, такая процедура приводит к снижению SOS-ответа примерно в 2,5 раза в *umuC* - клетках и лишь в 1,5 раза в клетках дикого типа. Чтобы убедиться, что снижение индукции после выдерживания в буфере обусловлено эксцизией фотопродуктов, мы проделали аналогичную процедуру с клетками ТК610, имеющими помимо *umuC*, мутацию в гене *uvrA*, т.е. дефектными по эксцизионной репарации. Как видно из рис. 3, выдерживание таких клеток в буфере после облучения УФ-светом, не приводило к сколь-нибудь заметному снижению SOS-ответа. Таким образом, задержка SOS-индукции путем выдерживания облученных клеток в непитательной среде действительно способствует элиминации фотоповреждений из ДНК эксцизионными ферментами. Задержка SOS-индукции в клетках дикого типа, вызванная *UmuCD*-зависимым ингибированием репликации, может, по-видимому, обеспечивать еще более эффективное удаление фотопродуктов путем эксцизии (кривая 1 на рис. 2б и кривая 2 на рис. 2а), вероятно, вследствие того, что клетки в процессе задержки находятся в богатой питательной среде.

Это подтверждает то, что *UmuCD*-зависимое ингибирование репликации дает возможность клеткам элиминировать значительную часть фотоповреждений с участием конститутивных репаративных ферментов.

Поскольку выдерживание в буфере после облучения лишь незначительно снижает SOS-ответ в клетках дикого типа (рис.2б), можно заключить, что этот ответ обусловлен главным образом повреждениями, которые не могут быть устранены эксцизионной репарацией. Наблюдаемое нарастание SOS-

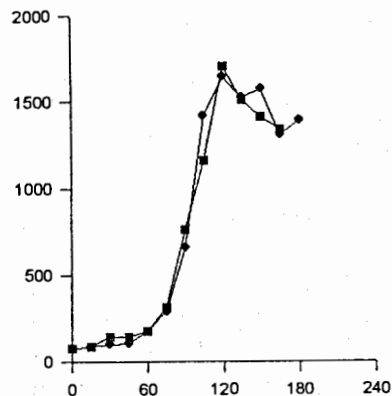


Рис.3. Кинетические кривые SOS-индукции для клеток TK610 (*umuC*, *uvrA*), облученных дозой 1 Дж/м<sup>2</sup> ультрафиолета. 1 - культивирование сразу после облучения; 2 - культивирование после 30 - минутного выдерживания в буфере. По оси абсцисс - время инкубирования в минутах; по оси ординат - отношение светового выхода в тысячах импульсов в секунду к соответствующей оптической плотности культуры при  $\lambda=560$  нм

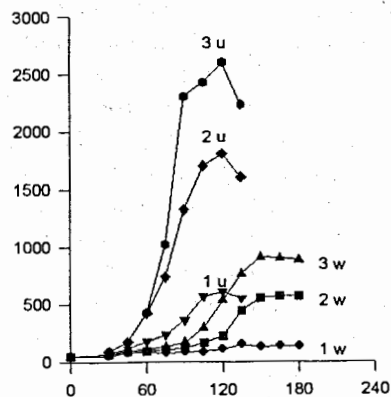


Рис.4. Кинетические кривые SOS-индукции при облучении  $\gamma$ -лучами. Доза облучения составляла: 1w, 1u - 100 Гр; 2w, 2u - 200 Гр; 3w, 3u - 300 Гр. Кривые с символом "w" относятся к клеткам AB1157 (WT); кривые с символом "u" относятся к клеткам GW2100 (*umuC*). По оси абсцисс - время инкубирования в минутах; по оси ординат - отношение светового выхода в тысячах импульсов в секунду к соответствующей оптической плотности культуры при  $\lambda=560$  нм

индукции в этих клетках способно в конечном итоге привести к расщеплению UmuD-белка, что позволит полимеразному комплексу вести синтез ДНК "через повреждение". Такой способ синтеза является, по-видимому, единственно возможным в случае тяжелых УФ-повреждений, таких, например, как перекрывающиеся повреждения. Так, было показано, что при определенных условиях, восстановление репликации ДНК в УФ-облученных клетках возможно лишь при участии UmuCD-белков [10].

Аналогичная картина наблюдается и для клеток, облученных  $\gamma$ -лучами (рис. 4). Lag-период в клетках дикого типа также увеличивается на 30 мин, а максимумы SOS-индукции снижены в 3-4 раза по сравнению с мутантными клетками.

Изложенные данные позволяют заключить, что UmuCD-зависимое ингибирование репликации ДНК способно приводить к задержке SOS-индукции, что позволяет эксцизионной репарации элиминировать значительную часть повреждений безошибочным образом до того, как происходит восстановление синтеза ДНК в клетке. Это свойство UmuC-белка проявляется как в УФ-, так и в  $\gamma$ -облученных клетках. Такой защитный механизм может оказаться достаточно универсальным для широкого класса ДНК-повреждающих агентов, требующих репликации ДНК для индукции SOS-ответа.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bradley T.S., Walker G.C. // *Genetics*. 1998. V. 148. P. 1599-1610.
  2. Echols H., Goodman M.F. // *Mutat. Res.* 1990. V. 236. P. 301-311.
  3. Bagg A., Kenyon C.J., Walker G.C. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1981. V. 78. P. 5749-5753.
  4. Woodgate R. // *Mutat. Res.* 1992. V. 281. P. 221-225.
  5. Sargentini N.J., Smith K.C. // *Mutat. Res.* 1989. V. 211. P. 193-203.
  6. Marsh L., Walker G.C. // *J. Bacteriol.* 1985. V. 162. P. 155-161.
  7. Opperman T., Murli S., Walker G.C. // *J. Bacteriol.* V. 178. P. 4400-4411.
  8. Ptitsyn L.R., Horneck G., Komova O.V. et.al. // *Appl. Environ. Microbiol.* 1997. V. 63. P. 4377-4384.
  9. Sassanfar M., Roberts J.W. // *J. Mol. Biol.* 1990. V. 212. P. 79-96.
  10. Witkin E.M., Roegner-Maniscalco V., Sweasy J.B., McCall J.O. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1987. V. 84. P. 6805-6809.
-