

ОБЪЕДИНЕННЫЙ
ИНСТИТУТ
ЯДЕРНЫХ
ИССЛЕДОВАНИЙ

Дубна

99-40

P19-99-40

О.В.Комова, Е.С.Кандиано, Г.Малавиа

**ЗАКОНОМЕРНОСТИ SOS-ОТВЕТА,
ИНДУЦИРОВАННОГО РАЗЛИЧНЫМИ ДОЗАМИ
УЛЬТРАФИОЛЕТА В КЛЕТКАХ *E. COLI* K-12 (*uvr A*)**

Направлено в журнал «Радиационная биология. Радиоэкология»

1999

Закономерности SOS-ответа, индуцированного различными дозами ультрафиолета в клетках *E. coli* K-12 (*uvrA*)

Исследованы кинетические и дозовые зависимости SOS-индукции в клетках *E. coli* (*uvrA*), облученных ультрафиолетом. Когда доза не превышала 2 Дж/м^2 , скорость SOS-индукции увеличивалась с дозой. Максимальный уровень SOS-ответа был пропорционален дозе. Пиримидиновые димеры были необходимы для индукции. В диапазоне доз $2-10 \text{ Дж/м}^2$ скорость SOS-индукции уменьшалась с дозой. Зависимость максимального ответа от дозы имела нелинейный характер. Пиримидиновые димеры не требовались для индукции. Анализируется роль молекулярных событий, лежащих в основе данного процесса при низких и высоких УФ-дозах.

Работа выполнена в Отделении радиационных и радиобиологических исследований ОИЯИ.

Препринт Объединенного института ядерных исследований. Дубна, 1999

Перевод авторов

Komova O.V., Candiano E.S., Malavya G.

P19-99-40

Kinetic and Dose Dependences of the SOS-Induction in *E. coli* K-12 (*uvrA*) Cells Exposed to the Different UV Doses

The kinetic and dose dependences of the SOS-induction in *E. coli* (*uvrA*) cells exposed to UV light were investigated. Below 2 J/m^2 the rate of the SOS-induction increased with dose. The maximal level of the SOS-response was proportional to the UV dose. Pyrimidine dimers were necessary for the induction. In the dose range $2-10 \text{ J/m}^2$ the rate of the SOS-induction decreased with dose. The dose-response curve was non-linear. Pyrimidine dimers were not required for the induction. The nature of the molecular events leading to the SOS-induction at low and doses was discussed.

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

Жизнеспособность клеток *Escherichia coli* при действии ДНК-повреждающих факторов в значительной степени зависит от целого ряда функций, находящихся под контролем индуцибельной системы репарации, получившей название SOS-системы. *In vitro* и *in vivo* было показано, что сигналом для запуска SOS-системы являются однонитевые участки ДНК [1, 2]. В УФ-облученных клетках одним из механизмов образования таких участков может быть т.н. прерывистый синтез ДНК, когда репликативный комплекс сохраняет способность синтезировать ДНК, несмотря на наличие в ней фотопродуктов, оставляя при этом пробелы (гепы) в дочерней нити напротив повреждения [3]. Их протяженность составляет примерно 1000 пар нуклеотидов, хотя в ряде случаев может достигать 40 тысяч [4, 5]. Такой механизм присущ, по-видимому, клеткам, облученным низкими УФ-дозами, т.к. увеличение дозы приводит к остановке репликативных вилков в части клеточной популяции так, что при дозе 10 Дж/м² во всех клетках с нормальным репарационным генотипом репликация оказывается блокированной [6]. До настоящего времени не выяснено, что именно приводит к остановке репликации. Не установлен также и механизм образования однонитевой ДНК при остановке репликации в области больших доз. Ряд данных позволяет предположить, что в этом процессе могут быть задействованы рекомбинационные процессы при поврежденном сайте с участием RecBCD ферментативного комплекса, в частности, его геликазной активности [7].

Последующая индукция и регуляция SOS-ответа зависит от продуктов генов *recA* и *lexA*. RecA белок способен образовывать нуклеопротеиновые филаменты, связываясь с однонитевой ДНК и приобретая при этом копротеазную активность [8]. Активированный RecA (RecA*) облегчает расщепление LexA белка, являющегося репрессором генов SOS-регулона в хромосоме *E. coli* и ряда генов, ответственных за синтез колицинов в колициновых плаزمиде [9, 10]. В неповрежденной клетке этот белок-репрессор образует связь с некой консервативной последовательностью в промоторной области SOS-генов, получившей название SOS-бокса, и предотвращает их транскрипцию [11]. Расщепление LexA в SOS-индуцированных клетках приводит к увеличению экспрессии этих генов, в том числе *umuC* и *umuD*, которым принадлежит ключевая роль в мутагенезе. Причем в этом процессе активен лишь UmuD белок, лишенный 24 аминокислотных остатков (UmuD'), который образуется в результате расщепления его на два фрагмента копротеазой RecA* [12-14]. Предполагается, что UmuC, UmuD' в комплексе с RecA, Ssb и, возможно, рядом неустановленных пока других белков, наделяют полимеразу III способностью вести т.н. синтез "через повреждение", предотвращая гибель клетки в результате остановки репликации [15]. В процессе такого синтеза некомплементарное основание часто оказывается подставленным напротив повреждения. Поэтому SOS-репарация получила название ошибочной, или мутагенной репарации.

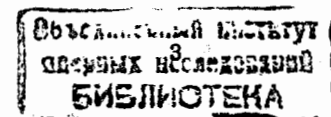
Существует целый ряд бактериальных тест-систем, позволяющих измерять уровень SOS-ответа в клетках, основанных на свойстве генов, находящихся под SOS-контролем, экспрессироваться в ответ на действие ДНК-повреждающих факторов. В ряде таких тест-систем структурный ген β -галактозидазы (репортерный компонент) помещен под промотор одного из таких генов (рецепторный компонент) и уровень SOS-ответа определяется по активности β -галактозидазы [16-18].

В SOS-*lux*-тесте [19] в качестве репортерного компонента использован люциферазный оперон светящихся бактерий *Photobacterium leiognathi*, (*luxCDABFE*), клонированный на плазмиде pBR322 и помещенный под контроль SOS-индуцибельного промотора *cda* гена, кодирующего синтез колицина в плазмиде ColD (рецепторный компонент). Полученная в результате такого слияния плазмиды rPLS-1 несет все гены, необходимые для синтеза продуктов, обеспечивающих протекание люциферазной реакции и регулируемых, как часть SOS-системы. Клетки *E. coli*, трансформированные такой плазмидой, приобретают способность испускать видимый свет в ответ на повреждение их ДНК, обусловленное действием различных ДНК-тропных агентов и радиации. Световой выход (биолюминесценция) может быть легко измерен с помощью люминометра.

Бактериальные тест-системы для измерения SOS-индукции нашли широкое применение в исследовании генотоксичности химических соединений. В то же время в литературе имеется весьма ограниченное число работ, посвященных исследованию дозовых зависимостей и кинетики SOS-ответа при действии излучений, которые, тем не менее, позволяют выявить ряд важных закономерностей в индукции SOS-системы, касающихся природы SOS-индуцирующих повреждений. Используя SOS-*lux*-тест, мы показали, что различные молекулярные события лежат в основе индукции SOS-системы в области высоких и низких доз УФ. Сделанные нами предположения о природе таких событий подтверждаются рядом данных, касающихся мутагенного действия ультрафиолета и синтеза ДНК в УФ-облученных клетках.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА

В данной работе использовался штамм *E. coli* K-12 AB1886 (*uvrA*). Ночную культуру, выращенную в L-среде с добавлением ампициллина (50 мкг/мл), разводили в соотношении 1:50 в свежей L-среде, подрачивали до оптической плотности OD₅₆₀=0.35 в термостатируемом шейкере при 37° С. Клетки осаждали центрифугированием и ресуспендировали в M9 буфере. 2.5 мл суспензии помещали в чашку Петри (диаметр 90 мм) и облучали УФ-светом. 1 мл облученной суспензии добавляли в колбу с 25



мл L-среды и инкубировали в шейкере при 30° С. Каждые 15 минут отбирали 0.5 мл культуры для измерения светового выхода. Световой выход (имп/сек) измеряли на люминометре при 30° С в течение 1 секунды. Одновременно измеряли оптическую плотность OD₅₆₀, на которую нормировались значения светового выхода. 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/м²/с.

При изучении фотореактивации использовали люминесцентную лампу ЛБ 40-1 (40 Вт). Чашку Петри с 1.25 мл облученной суспензии помещали на расстоянии 10 см от лампы и освещали видимым светом в течение 30 минут при 30°С.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рисунке 1 представлены кинетические зависимости нормированного на оптическую плотность светового выхода клеток AB1886 (*uvrA*⁻), облученных различными дозами УФ. Когда доза не превышала 2 Дж/м², световая эмиссия нарастала в процессе инкубирования тем интенсивнее, чем выше была доза облучения, и достигала максимального значения через 200 минут (рис.1а). Последующее увеличение дозы приводило к некоторому отставанию SOS-ответа, так что в некотором интервале времени инкубирования имела место обратная зависимость SOS-индукции от дозы (рис.1б). Такой эффект описан для клеток дикого типа, облученных дозами УФ 5 и 20 Дж/м² [1]. В указанной работе SOS-индукция определялась по активности β-галактозидазы, ген которой помещался под промотор *recA*. Параллельно измерялось количество LexA белка. Уровень активности β-галактозидазы оказался выше при облучении дозой 5 Дж/м², чем 20 Дж/м². Поскольку количество LexA отличалось при этом незначительно, авторы предположили, что это может быть связано с чувствительностью клеточных процессов таких, как синтез белка и РНК к высоким дозам радиации. На *uvrA*-мутантных клетках мы наблюдали этот эффект при значительно меньших дозах, которые не могут оказывать сколь-нибудь существенного влияния на указанные клеточные процессы. Следовательно, он обусловлен различием в характере повреждений ДНК при разных УФ-дозах.

Как уже было сказано, в области малых доз фотоповреждения не препятствуют завершению раундов репликации. В этом случае SOS-ответ обусловлен наличием пробелов в дочерней нити. Наблюдаемое изменение кинетики SOS-индукции при дозах, превышающих 2 Дж/м², может быть следствием появления существенной доли клеток, в которых репликация оказывается блокированной, и вышеуказанный механизм не

оказывается блокированной, и вышеуказанный механизм не функционирует. В таких клетках SOS-ответ также может быть индуцирован, но уже как результат некой последовательности

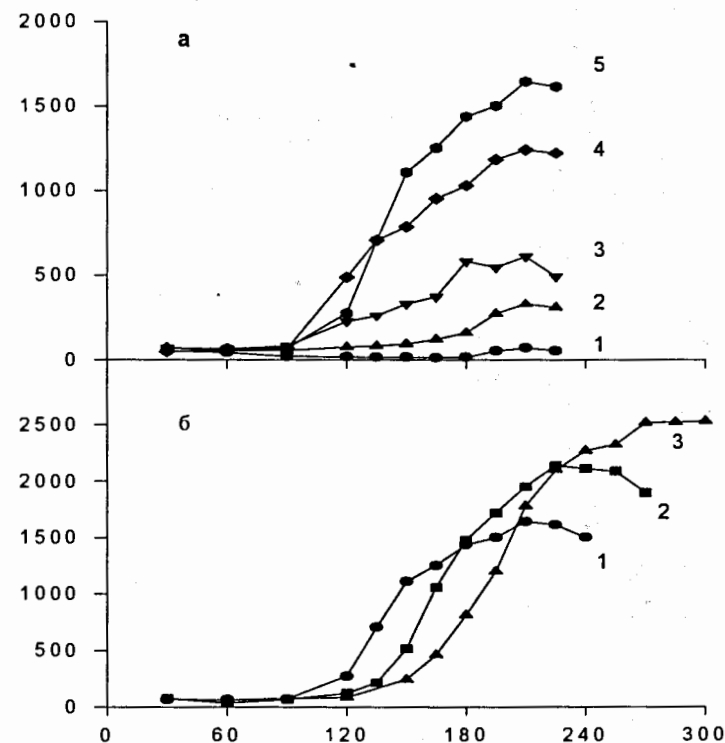


Рис.1. Кинетические зависимости SOS-индукции.

Доза облучения составляла:

а: 1- контроль; 2 - 0.5 Дж/м²; 3 - 1 Дж/м²; 4 - 2 Дж/м²; 5 - 3 Дж/м².

б: 1 - 3 Дж/м²; 2 - 5 Дж/м²; 3 - 10 Дж/м².

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

событий при поврежденном сайте. Это было продемонстрировано на *ts*-мутантах по элонгации репликации путем перенесения на непермиссивную температуру [1, 20] и путем введения терминирующих репликацию (*Ter*) сайтов в хромосому *E.coli* [7]. Как показывают результаты исследования кинетики инактивации репрессора фага λ , который у *E.coli* находится под SOS-контролем, процесс запуска SOS-системы при остановке репликации (температурный шифт у *ts*-мутантов, тиминное голодание) является наиболее медленным среди широкого класса SOS-индуцирующих воздействий, таких как малые дозы УФ, агенты, вызывающие разрывы ДНК, алкилирующие агенты [20]. Этим, вероятно, можно объяснить отставание SOS-ответа при дозах, превышающих 2 Дж/м².

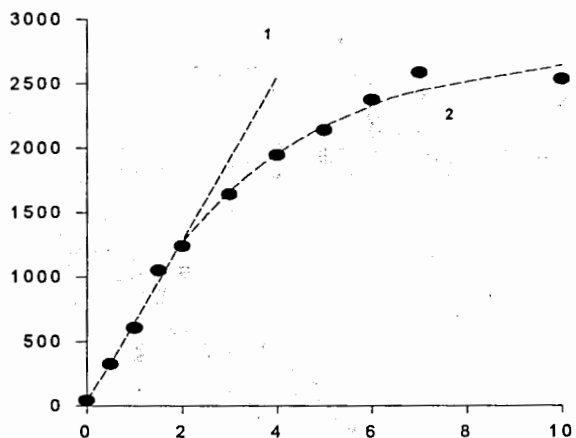


Рис.2. Зависимость SOS-индукции от дозы ультрафиолетового света. ● - экспериментальные точки; 1 - аппроксимация функцией $f = a \cdot D + b$ в диапазоне доз 0 - 2 Дж/м²; 2 - аппроксимация функцией $f = k \cdot (1 - e^{-aD})$ в диапазоне доз 2 - 10 Дж/м².

По оси абсцисс - доза в Дж/м²; по оси ординат - отношение максимального значения светового выхода в тысячах импульсов в секунду к соответствующей оптической плотности культуры при $\lambda=560$

возрастанию SOS-ответа с выходом на плато, когда репликация оказывается блокированной во всех клетках (рис.2). Начальный участок дозовой кривой на данном рисунке является линейной функцией дозы, что вполне соответствует представлениям о том, что пробелы в дочерней нити ДНК, оставляемые полимеразным комплексом напротив повреждения, могут служить сигналом для запуска SOS-системы. В области доз, превышающих 2 Дж/м², зависимость эффекта от дозы может быть описана функцией $f(D) = k \cdot (1 - e^{-aD})$. Такая зависимость в полной мере соответствует нашему предположению о том, что за индукцию SOS-ответа в этом диапазоне доз ответственны события, приводящие к остановке репликации. Известно, что отношение количества ДНК, которая может быть синтезирована в хлорамфениколе в УФ-облученной суспензии клеток к соответствующему количеству ДНК, синтезированной в необлученных клетках, уменьшается экспоненциально с дозой, т.е. как e^{-aD} [6]. Добавление хлорамфеникола к экспоненциально растущей суспензии клеток, как известно, блокирует инициацию новых раундов репликации, но не влияет на завершение уже существующих. Т.о., в УФ-облученных клетках количество синтезированной ДНК в присутствии хлорамфеникола целиком определяется долей клеток, в которых существующие в момент облучения репликативные вилки не были заблокированы, несмотря на наличие фотоповреждений.

Неизвестно, что приводит к остановке репликации при больших дозах УФ. Это могут быть фотопродукты, отличные от пиримидиновых димеров, выход которых возрастает с дозой, или пиримидиновые димеры, расположенные в непосредственной близости друг от друга, например, когда расстояние между ними не превышает протяженности гена (~1000 пар нуклеотидов). Расчеты показывают, что такое событие может иметь место уже при дозе ~1.7 Дж/м² [21].

Чтобы выяснить роль пиримидиновых димеров в индукции SOS-ответа, клетки, облученные УФ, подвергали воздействию видимым светом, который, как известно, способствует элиминации этих повреждений из ДНК при участии фотолиазы (фотореактивация). В области малых доз такое воздействие приводило примерно к двухкратному снижению SOS-индукции (рис.3). Начиная с дозы 2 Дж/м², фотореактивирующий эффект снижался и переставал выявляться, когда доза достигала 6 Дж/м². Аналогичный эффект наблюдался в опытах по измерению количества ДНК, синтезированной в УФ-облученных клетках. Было показано, что фотореактивируемость повреждений, приводящих к остановке репликации, снижается с дозой. Когда доза достигала 9.6 Дж/м² (были использованы клетки дикого типа), фотореактивирующий эффект не выявлялся [6]. Главными претендентами на роль таких повреждений являются 6-4 фотопродукты, которые не элиминируются фотолизой. Выход этих продуктов на геном у *E.coli* в 3-5 раз ниже, чем

пиримидиновых димеров [22]. Не исключено также, что пиримидиновые димеры (или их кластеры) могут приводить к остановке репликации и последующей индукции SOS-системы при больших дозах, но их фотореактивация по каким-то причинам затруднена. Возможно, остановленный полимеразный комплекс затрудняет доступ фотолиазы к пиримидиновым димерам.

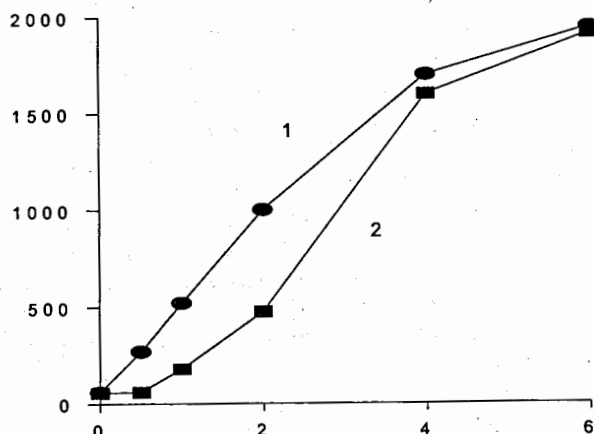


Рис.3. Влияние видимого света на SOS-индукцию в УФ-облученных клетках. 1 - облучение; 2 - облучение + фотореактивация.

По оси абсцисс - доза в Дж/м²; по оси ординат - отношение максимального значения светового выхода в тысячах импульсов в секунду к соответствующей оптической плотности культуры при $\lambda=560$

Ранее было установлено, что предмутационные повреждения, индуцированные ультрафиолетом (предположительно, сайты остановки репликации), не фотореактивируются, а снижение выхода мутаций под действием видимого света обусловлено элиминацией пиримидиновых димеров, которые необходимы для индукции SOS-системы и активации UmuD белка [23-25]. Как видно из наших данных по фотореактивации, SOS-ответ может быть индуцирован до значительного уровня в результате остановки репликации без участия пиримидиновых димеров, расположенных где-либо на хромосоме. Возможно, UmuCD' белки

участвуют не только в мутационном процессе, связанном с блокированием репликативных вилок. Так, было показано, что *umuC* ген необходим для пострепликативной репарации незначительной части пробелов в дочерней нити, которая также может сопровождаться инсерцией некомплементарного основания [21]. В области малых доз вклад в мутагенез данного процесса может быть весьма существенным у *uvrA*-мутанта, дефектного по эксцизионной репарации, которая способна элиминировать значительную часть фотоповреждений ДНК в клетках с нормальным репарационным генотипом, предотвращая тем самым образование дочерних генов. Возможно, этим обусловлено и различие в спектре УФ-индуцированных мутаций в *uvrA*-клетках и клетках дикого типа [26, 27].

Таким образом, дочерние гены могут рассматриваться в качестве SOS-индуцирующего сигнала лишь в ограниченном диапазоне УФ-доз. Для *uvrA*-мутанта этот диапазон ограничен дозой ~ 2 Дж/м², после которой SOS-сигнал вследствие остановки репликации играет решающую роль в SOS-индукции. Такая интерпретация полученных данных позволяет объяснить как обратную дозовую зависимость в области высоких доз, так и наличие плато на кривой доза-эффект. Как показали эксперименты с фотореактивацией, SOS-сигнал при низких дозах в значительной степени обусловлен пиримидиновыми димерами. При дозах, превышающих 6 Дж/м², SOS-ответ может быть индуцирован до значительного уровня без их участия, хотя не исключено, что пиримидиновые димеры необходимы для индукции SOS-системы при этих дозах, но их фотореактивация по каким-то причинам неэффективна.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sassanfar M., Roberts J.W. // J. Mol. Biol. 1990. V. 212. P. 79-96.
2. Higashitani N., Higashitani A., Roth A., Horiuchi K. // J. Bacteriol. 1992. V. 174. P. 1612-1618.
3. Rupp W.D., Howard-Flanders P. // J. Mol. Biol. 1968. V. 31. P. 291-304.
4. Lyer V.N., Rupp W.D. // Biochim. Biophys. Acta. 1971. V. 228. P. 117-126.
5. Smith K.C., Wang T.V., Sharma R.C. // Photochem. Photobiol. 1987. V 1. P 1-11
6. Doudney C.O. // Mutat. Res. 1973. V. 17. P. 1-12.
7. Horiuchi T., Fujimura Y., Nishitani H., Kobayashi T., Hidaka M. // J. Bacteriol. 1994. V. 176. P. 4656-4663.
8. Friedberg E.C., Walker G.C., Siede W. DNA Repair and Mutagenesis. Washington DC.: American Society for Microbiology Press, 1995. 698 p.

- Bacteriol. 1994. V. 176. P. 4656-4663.
8. *Friedberg E.C., Walker G.C., Siede W.* DNA Repair and Mutagenesis. Washington DC.:American Society for Microbiology Press, 1995. 698 p.
 9. *Little J.W.* // J.Bacteriol. 1993. V. 175. P. 4943-4950.
 10. *Frey J., Ghersa P., Palacios P.G., Belet. V.* // J. Bacteriol. 1986. V. 166. P. 15-19.
 11. *Little J.W., Mount D.W., Yanisch-Perron C.R.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1981. V. 78. P. 4199-4203:
 12. *Burckhardt S.E., Woodgate R., Scheuermann R.H., Echols H.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1988. V. 85. P. 1811-1815.
 13. *Shinagawa H., Iwasaki H., Kato T., Nakata A.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1988. V. 85. P. 1806-1810.
 14. *Nohmi N., Battista J.R., Dodson L.A., Walker G.C.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1988. V. 85. P. 1816-1820.
 15. *Echols H., Goodman M.F.* // Mutat. Res. 1990. V. 236. P. 301-311.
 16. *Elespuru R.K., White R.J.* // Cancer Res. 1983. V. 43. P. 2819-2830.
 17. *Quillardet P., Huisman O., D'ari R., Hofnung M.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1982. V. 79. P. 5971-5975.
 18. *Oda Y., Nakamura S., Oki I., Kato T., Shinagawa H.* // Mutat. Res. 1985, V. 147. P. 219-229.
 19. *Nunoshiba T., Nishioka H.* // Mutat. Res. 1991. V. 254. P. 71-77.
 20. *Ptitsyn L.R., Horneck G., Komova O. et al.* // Appl. Environ. Microbiol. 1997. V. 63. № 11. P. 4377-4384.
 21. *Smith C.L., Oishi M.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1978. V. 75. P. 1657-1661.
 22. *Wang T.V., Smith R.C.* // Mutat. Res. 1985. V. 145. P. 107-112.
 23. *Sage E.* // Photochem. Photobiol. 1993. V. 57. P.163-174.
 24. *Wood R.D.* // J. Mol. Biol. V. 184. P. 577-585.
 25. *Ruiz-Rubio V., Woodgate R., Bridges B.A. et all.* // J. Bacteriol. 1986. V. 166. P. 1141-1143.
 26. *Bates H., Bridges B.A.* // Biochem. 1991. V. 73. P. 485-489.
 27. *Shinoura Y., Ise T., Kato T., Glickman B.W.* // Mutat. Res. 1983. V.111. P. 51-59.
 28. *Schaaper R.M., Dunn R.L., Glickman B.W.* // J. Mol. Biol. 1987. V. 198. P. 187-202.