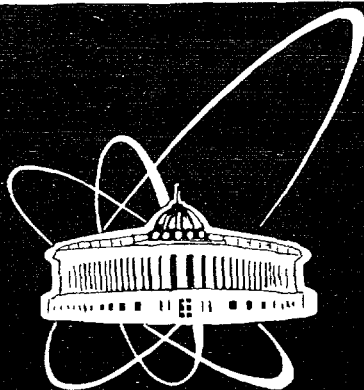




XJ0000057



ОБЪЕДИНЕННЫЙ
ИНСТИТУТ
ЯДЕРНЫХ
ИССЛЕДОВАНИЙ

Дубна

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 γ -ЛУЧАМИ

Направлено в журнал «Радиационная биология. Радиоэкология»

3 1 - 1 6

1999

Продукты генов *recA*, *umuC* и *umuD* играют ключевую роль в УФ- и γ -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 γ -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 30⁰ С. При этом они сохраняют нормальную скорость роста при 42⁰ С. При 30⁰ 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 42⁰ 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 холодной 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 холодной 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 γ -облученных клетках. Чтобы выяснить это, мы сравнили уровень экспрессии *cda*-гена из плазмиды ColD при УФ- и γ -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), GW2100 (как AB1157, но *umuC122::Tn5*), TK610 (как AB1157, но *arg⁺*, *uvrA6*, *ilv325*, *umuC36*).

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 $OD_{560}=0.35$ в термостатируемом шейкере при 37° 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° С. Каждые 15 минут отбирали 0,5 мл культуры для измерения светового выхода. Световой выход (имп/с) измеряли на люминометре при 30° 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/м²/с.

Облучение γ -лучами ¹³⁷Cs 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.

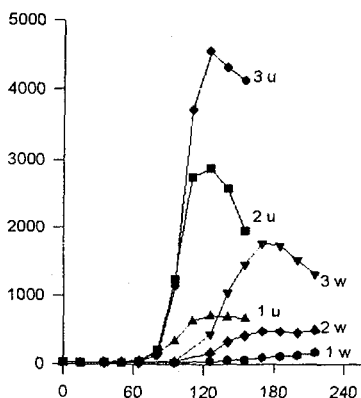


Рис. 1. Кинетические кривые SOS-индукции при облучении ультрафиолетом. Доза облучения составляла:

1w, 1u - 5 Дж/м²; 2w, 2u - 10 Дж/м²; 3w, 3u - 20 Дж/м². 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

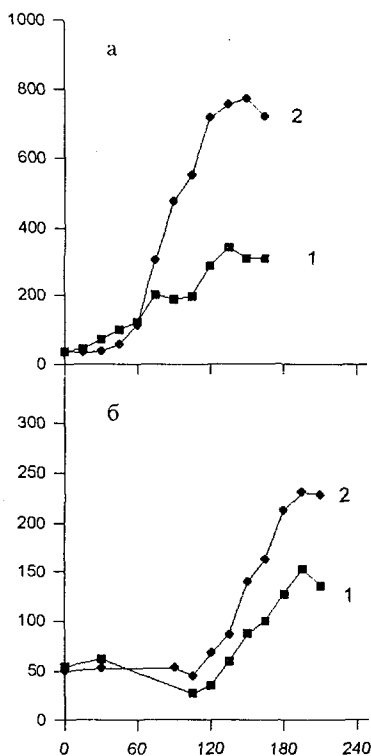


Рис.2. Кинетические кривые SOS-индукции при облучении дозой 5 Дж/м² ультрафиолета.

а - для клеток GW2100 (*umiC*); 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 *umiC*. 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-

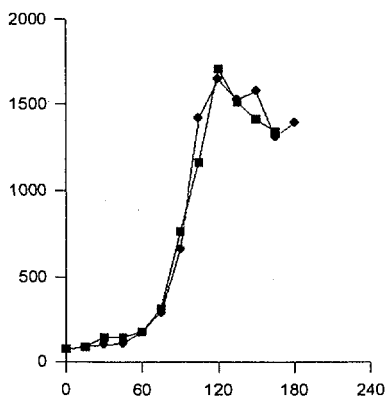


Рис.3. Кинетические кривые SOS-индукции для клеток ТК610 (*umuC*, *uvrA*), облученных дозой 1 Дж/м² ультрафиолета.

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

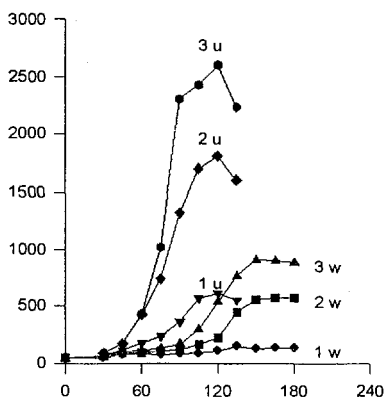


Рис.4. Кинетические кривые SOS-индукции при облучении γ -лучами.

Доза облучения составляла:

1w, 1u - 100 Гр; 2w, 2u - 200 Гр; 3w, 3u - 300 Гр.

Кривые с символом "w" относятся к клеткам АВ1157 (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 γ -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 γ -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.

Рукопись поступила в издательский отдел
15 октября 1999 года.

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

P19-99-272

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

Проведен сравнительный анализ кинетических зависимостей SOS-ответа в клетках *E.coli* дикого типа и *umuC*-мутанте при облучении ультрафиолетом и γ -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 γ -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 γ -Radiation

Kinetics dependences of the SOS-induction in *E.coli* cells of wild type and deficient in *umuC* gene exposed to UV and γ -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 γ -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.

Preprint of the Joint Institute for Nuclear Research. Dubna, 1999

Редактор Е.Ю.Шаталова. Макет Н.А.Киселевой

Подписано в печать 24.11.99
Формат 60 × 90/16. Офсетная печать. Уч.-изд. листов 0,73
Тираж 260. Заказ 51712. Цена 88 к.

Издательский отдел Объединенного института ядерных исследований
Дубна Московской области