

**МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
им. М. В. ЛОМОНОСОВА**

19-2002-9

На правах рукописи  
УДК 577.391

**КОМОВА**  
Ольга Викторовна

**ЗАКОНОМЕРНОСТИ SOS-ИНДУКЦИИ  
В КЛЕТКАХ БАКТЕРИЙ *ESCHERICHIA COLI*  
ПРИ ДЕЙСТВИИ УЛЬТРАФИОЛЕТОВОГО СВЕТА  
И ИОНИЗИРУЮЩИХ ИЗЛУЧЕНИЙ  
С РАЗНЫМИ ФИЗИЧЕСКИМИ ХАРАКТЕРИСТИКАМИ**

Специальность: 03.00.01 — радиобиология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва 2002

Работа выполнена в Отделении радиационных и радиобиологических исследований Объединенного института ядерных исследований, г.Дубна.

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор  
***Е.А.Красавин***

Официальные оппоненты: доктор биологических наук,  
***А.В.Глазунов***  
доктор биологических наук,  
профессор ***И.И.Пелевина***

Ведущее учреждение: Медицинский радиологический научный центр РАМН  
г.Обнинск Калужской обл.

Защита состоится “ \_\_\_\_ ” \_\_\_\_\_ 2002 г. в \_\_\_\_\_ часов на заседании  
Диссертационного совета Д.501.001.65 в Московском государственном  
университете им. М.В.Ломоносова по адресу: 119899, г.Москва, ГСП,  
Ленинские горы, МГУ, биологический факультет, Диссертационный совет  
Д.501.001.65.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке биологического факультета  
МГУ. Отзывы просим присылать по адресу: 119899, г. Москва, ГСП,  
Ленинские горы, МГУ, биологический факультет, Диссертационный совет  
Д.501.001.65.

Автореферат разослан “ \_\_\_\_ ” \_\_\_\_\_ 2002 г.

Ученый секретарь Диссертационного совета,  
доктор биологических наук, профессор

***О.Р. Кольс***

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Проблема генетического действия излучений с разными физическими характеристиками является одной из наиболее актуальных в современной радиобиологии. Это обусловлено необходимостью решения многих важных задач в области радиэкологии, радиационной безопасности космических полетов, лучевой терапии злокачественных опухолей и других сферах. Как известно, биологическая эффективность излучений определяется как их физическими характеристиками, так и биологическими факторами самой клетки, среди которых решающая роль принадлежит репарационным процессам, направленным на восстановление генетических структур. Из известных в настоящее время репарационных механизмов наименее исследованным, как у прокариот, так и у эукариот, остается индуцибельная репарация, хотя в экспериментах на бактериях *Escherichia coli* ее изучение ведется уже более тридцати лет. В этих клетках она получила название SOS-системы репарации и представлена более чем двадцатью генами, которые скоординированно дерепрессируются при возникновении в ДНК повреждений. Транскрипционная активизация этих генов приводит к синтезу белков, которые необходимы для спасения клетки при тяжелых повреждениях ее генетических структур. Индукция SOS-ответа в таких случаях позволяет решить две главные задачи: повысить эффективность эксцизионной репарации, с одной стороны, а с другой - повысить толерантность клетки к повреждениям, которые не могут быть эксцизированы. Последняя из этих задач в *Escherichia coli* решается путем снижения корректорских функций репликативной ДНК-полимеразы, что делает SOS-репарацию крайне мутагенной. Под ее контролем находится практически весь УФ-индуцированный и подавляющая часть  $\gamma$ -индуцированного мутагенеза у *Escherichia coli*. Поэтому ее изучение является важным звеном в понимании молекулярных событий, приводящих к индукции мутаций.

В результате исследований SOS-системы *Escherichia coli* удалось установить принципы ее регуляции, природу SOS-индуцирующего сигнала, а также значительную часть функций, контролируемых SOS-генами. При этом было выявлено существенное сходство некоторых из них с функциями индуцибельных белков в клетках млекопитающих и дрожжей. На основе принципов регуляции экспрессии SOS-генов для *E.coli* был разработан ряд методов количественной оценки SOS-индукции. Все это

делает данные клетки удобным объектом для изучения механизмов индуцибельных процессов при действии ДНК-повреждающих факторов различной природы.

Существующие методы измерения уровня SOS-индукции в бактериальных клетках, главным образом SOS-хромотест (Quillardet et al., 1982; Jenek et al., 1985; Nacamura et al., 1987; Nunoshiba and Nishioka, 1991), позволили накопить обширные данные, касающиеся генотоксичности химических соединений. Однако в научной литературе имеется лишь незначительное число работ, посвященных изучению эффективности индукции SOS-системы различными типами излучений и ее взаимодействию с другими репарационными механизмами клетки. Данные, представленные в них, весьма фрагментарны и противоречивы. Часто такие исследования ограничивались одной дозой облучения или одним временем пострadiaционного инкубирования клеток. Однако очевидно, что подробное исследование закономерностей SOS-индукции способно внести существенный вклад в понимание последовательности молекулярных событий, приводящих к ее запуску и активизации тех или иных функций. Использование для этой цели широкого спектра излучений с разными физическими характеристиками позволяет выявить роль количества и качества повреждений в индукции данной системы, а следовательно, и в индукции мутаций. Учитывая тесную взаимозависимость SOS-репарации, эксцизионной репарации и репликации ДНК, весьма информативным может оказаться исследование закономерностей SOS-ответа в клетках с мутациями в генах, ответственных за различные пути эксцизионной репарации и регуляцию клеточного цикла.

Существующие методы слишком трудоемки и не могут быть использованы для решения таких задач. Для этой цели нами был разработан эффективный и весьма экономичный метод – SOS *lux-mecm* (Ptitsyn et al., 1997), основанный на использовании рекомбинантных клеток *E.coli*, способных к SOS-индуцибельной биолюминесценции. Такую способность они приобретают после трансформации их специально сконструированной плазмидой pPLS-1, несущей люциферазный оперон светящихся бактерий *Photobacterium leiognathi* под контролем SOS-индуцибельного промотора *cda*-гена плазмиды Col D. Количественным показателем SOS - индукции в данном методе является световой выход, который может быть измерен на люминометре в течение нескольких секунд. Этот метод не требует разрушения клеток, поэтому позволяет исследовать эффективность SOS-ответа при действии различных ДНК-

повреждающих факторов в режиме реального времени. Он успешно может быть использован для изучения влияния на SOS-индукцию различных белков, контролирующих, в частности, другие пути репарации. Для этого не требуется создания новых штаммов с мутацией в соответствующем гене, поскольку репортерный компонент с биолюминесцентной системой находится на плазмиде, которая может быть трансформирована в любой из имеющихся мутантных штаммов.

Цель и основные задачи исследования. Целью настоящего исследования явилось изучение закономерностей SOS-индукции у бактерий *E.coli* с различным репарационным статусом при действии ультрафиолетового света,  $\gamma$ -излучения и ускоренных тяжелых ионов в широком диапазоне ЛПЭ с использованием метода SOS *lux*-тест.

Для достижения указанной цели были поставлены следующие задачи:

- 1) изучить возможности разработанного нами метода SOS *lux*-тест для количественной оценки SOS-ответа в клетках *Escherichia coli*;
- 2) исследовать кинетические и дозовые зависимости SOS-индукции в клетках *E.coli* при действии ультрафиолетового света,  $\gamma$ -излучения и ускоренных тяжелых ионов с ЛПЭ 5 – 200 кэВ/мкм;
- 3) изучить влияние фотореактивации и эксцизионной репарации на SOS-индукцию при облучении клеток *E.coli* ультрафиолетовым светом;
- 4) исследовать роль UmuC-белка, ответственного за регуляцию клеточного цикла, в индукции SOS-ответа при облучении клеток *E.coli* ультрафиолетовым светом и  $\gamma$ -лучами;
- 5) исследовать роль нерепарируемых эксцизионной репарацией  $\gamma$ -индуцированных повреждений ДНК, образующихся в присутствии аноксического радиосенсибилизатора ТАН.

Положения и результаты, выносимые на защиту.

К защите представляются:

1. Метод SOS *lux*-тест для количественной оценки SOS-индукции, основанный на биолюминесценции.

2. Результаты исследования кинетических и дозовых зависимостей SOS-индукции в клетках *E.coli* при действии ультрафиолетового света,  $\gamma$ -излучения и ускоренных тяжелых ионов.
3. Результаты исследования влияния конститутивных репарационных механизмов (эксцизионной репарации и фотореактивации) на SOS-индукцию при действии ультрафиолетового света.
4. Результаты исследования влияния UmuCD-зависимой регуляции клеточного цикла на SOS-индукцию при действии ультрафиолетового света и  $\gamma$ -излучения.

Научная новизна. В работе впервые:

- для исследования SOS-индукции в клетках *Escherichia coli* использован разработанный нами биолуминесцентный метод SOS *lux*-тест (патент №195 49 417, ФРГ);

- исследованы кинетические и дозовые зависимости SOS-индукции в клетках *E.coli* в широком диапазоне доз для ультрафиолетового света, и ионизирующих излучений с ЛПЭ 0.3 – 200 кэВ/мкм;

- исследована роль эксцизионной репарации и фотореактивации в индукции SOS-ответа в широком диапазоне доз ультрафиолетового света;

- исследована роль нерепарируемых эксцизионной репарацией  $\gamma$ -индуцированных повреждений ДНК в индукции SOS-ответа;

- исследована роль регуляции клеточного цикла в индукции SOS-ответа при действии ультрафиолетового света и  $\gamma$ -излучения.

Научно-практическая значимость работы. Полученные результаты показывают, что SOS *lux*-тест является чувствительным и высокоинформативным методом для исследования SOS-индукции в клетках бактерий *Escherichia coli* при действии излучений разного качества. Он также может быть использован для изучения генетического действия различных факторов физической и химической природы, т.к. пусковым механизмом SOS-ответа являются повреждения ДНК. Результаты данной диссертации были использованы при разработке в рамках проекта COPERNICUS (грант CIPA СТ-94 0122) прибора для регистрации в автоматическом режиме генетического действия солнечной радиации.

В экспериментах *in vivo* получены новые данные о закономерностях SOS-индукции при действии излучений разного качества, что позволяет расширить понимание механизмов, приводящих к запуску индуцибельных репарационных процессов.

Апробация работы. Результаты диссертационной работы были доложены на IV съезде по радиобиологическим исследованиям (Москва, 2001), "Рабочем совещании по исследованию механизмов радиационно-индуцированного мутагенеза и репарации ДНК", (Дубна, 1990), "Fourth workshop on heavy charged particles in biology and medicine" (Darmstadt, Germany, 1991), "Modern problems of radiobiology", (Dubna, Russia, 1996), "DNA-Repair Workshop, 4-th Workshop German section DNA Repair", (Hamburg, Germany, 1996), "Fifth European Workshop on biosensors for environmental monitoring and stability of biosensors" (Freising, Germany, 1997), "Fundamentals for the assessment of risks from environmental radiation" (Brno, Czech Republic, 1997), "SOS chromotest Workshop at the 7-th International Conference on Environmental Mutagens" (Toulouse, France, 1997), конгрессе "Biosensors 98" (Berlin, Germany, 1998), конгрессе "Internation ecological congress" (Voronezh, Russia, 1996), симпозиуме "Radiation Biology and its application in space research" (Brno, Czech Respublic, 1994)

Публикации. По теме диссертации опубликовано 10 работ и получен патент ФРГ.

Структура работы. Диссертация изложена на 106 страницах, состоит из введения, четырех глав (обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты исследований и обсуждение результатов), заключения, выводов и списка литературы. Работа содержит 2 таблицы и 27 рисунков. Список литературы включает 145 источников, из них 142 - на иностранном языке.

## **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.**

Бактериальные штаммы и плазмиды. В работе использованы следующие штаммы бактериальных клеток *E.coli* K-12: C600 (*thr-1, leu-6, thi-1, lacY, tonA21, supE44*); AB1157 (*thr-1, leu-6, proA2, his-4, thi-1, argE3, lacY1, galK2, ara-14, xyl-5, mtl-1, tsx-33, rpsL31, supE44*); AB1886 (как AB 1157, но *uvrA1*); GW2100 (как AB 1157, но

*umuC122::Tn5*); SK707 (*argH1, hisG4, ilvD188, metE46*); SK7772 (как SK 707, но *uvrDΔ291, met<sup>+</sup>*); PQ37 (*uvrA, galE, galY, PhoC, rfa, lacΔU169, sfiA::Mud(Aplac)cts*).

Все перечисленные штаммы бактерий были трансформированы плазмидой pPLS-1 (*luxCDABFE*).

**Условия облучения.** Для облучения ультрафиолетовым светом (254 нм) использовали бактерицидную лампу ДБ 30-1. Мощность дозы в точке облучения составляла 0.1 Дж/м<sup>2</sup>/с. Облучение суспензии клеток (2.5 мл) проводили в темноте при t 30<sup>0</sup>С на чашках Петри, непрерывно перемешивая.

Для фотореактивации использовали люминесцентную лампу ЛБ 40-1 (40 Вт). Облучение суспензии клеток (1.25 мл) видимым светом проводили при t 30<sup>0</sup>С на чашках Петри, которые помещали на расстоянии 10 см от лампы

Облучение  $\gamma$ -лучами <sup>137</sup>Cs осуществляли на установке "Свет". Мощность дозы составляла 25 Гр/мин. Облучение  $\gamma$ -лучами <sup>60</sup>Co проводили на терапевтической установке ROCUS. Мощность дозы составляла 0.1 Гр/мин. Облучение суспензии клеток (2 мл) проводили в стеклянных пузырьках.

Облучение тяжелыми ионами проводилось на изохронном двухметровом ускорителе многозарядных ионов У-200 Объединенного института ядерных исследований (Дубна). Для этого использовали установку "Геном" для облучения биологических объектов (Череватенко, 1989). Клетки в виде монослоя облучали на поверхности ядерных фильтров ( $\varnothing$  пор 0.3 мкм). В качестве подложки использовали минимальный агар.

**Питательные среды и буферы** приготавливались по стандартным прописям (Миллер, 1976).

**SOS lux-тест.** Ночную культуру клеток *E.coli* (pPLS-1), выращенную в L-среде с добавлением ампициллина (50 мкг/мл) разводили в соотношении 1:50 в свежей L-среде, подрачивали до оптической плотности OD<sub>600</sub> = 0.3 - 0.35 в термостатируемом шейкере при 37<sup>0</sup>С. Клетки осаждали центрифугированием, ресуспендировали в М9-буфере до исходного объема, на 3 минуты помещали на лед, после чего облучали ультрафиолетовым светом или  $\gamma$ -лучами. Для этого после центрифугирования ночной культуры к ней добавляли М9-буфер в количестве 1/20 первоначального объема. 20 мкл этой суспензии наносили на поверхность ядерных фильтров, которые были предварительно помещены на чашку с минимальным агаром, и облучали по три



фильтра на каждую дозу. 1 мл облученной ультрафиолетовым светом или  $\gamma$ -лучами суспензии, либо 3 фильтра с клетками, облученных одинаковой дозой тяжелых ионов, переносили в колбу с 25 мл L-среды и инкубировали в качалке при 30<sup>0</sup>С. Каждые 15-30 мин отбирали 0.5 мл культуры для измерения светового выхода. Световой выход (число импульсов) измеряли на люминометре (производство МИФИ) в течение 1 сек. Одновременно измеряли оптическую плотность OD<sub>600</sub> на спектрофотометре SPECOL-11. Фактор индукции определяли как отношение светового выхода (10<sup>3</sup> имп/с) к оптической плотности OD<sub>600</sub>.

Все манипуляции с клетками, включая измерение светового выхода, проводили в термостатируемом помещении с температурой 30<sup>0</sup>С. При работе с УФ-облученными клетками использовали желтый свет, чтобы предотвратить нежелательную фотореактивацию.

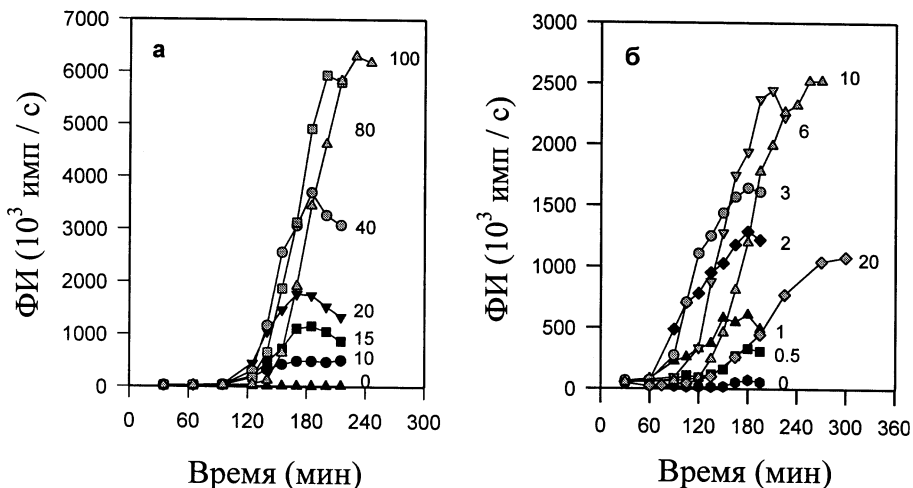
**SOS-хромотест.** При использовании данного метода применяли стандартную процедуру (Quillaredet et al., 1981). Фактор индукции определяли как отношение активности  $\beta$ -галактозидазы к активности щелочной фосфатазы.

**Статистическая обработка данных.** Для построения дозовых кривых использовали среднее максимальных значений фактора индукции из трех и более экспериментов. Ошибки рассчитывались как среднеквадратичное отклонение. Аппроксимация линейной функцией начального участка дозовой кривой осуществлялась по методу наименьших квадратов с использованием графической программы "SIGMA PLOT". При этом средние значения факторов индукции задавались с весом, обратно пропорциональным квадрату соответствующей среднеквадратичной погрешности.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

*Влияние эксцизионной репарации на SOS-индукцию.* Для исследования характера кинетических и дозовых зависимостей SOS-индукции в клетках с различным репарационным статусом были использованы две пары изогенных штаммов: AB1886 (*uvrA*), в котором блокирована начальная стадия эксцизионной репарации – узнавание фотопродуктов, и его родительский штамм AB1157 а также SK7772 (*uvrD*), в котором блокирована эксцизия фотопродуктов, и его родительский штамм SK707.

При исследовании кинетических зависимостей фактора индукции в клетках *E. coli* при действии ультрафиолетового света было установлено, что их характер зависит от



**Рис.1.** Зависимость фактора индукции от времени пострадиационного инкубирования для клеток AB1157 (WT) – а и AB1886 (*uvrA*) – б, облученных ультрафиолетовым светом. Цифры у кривых соответствуют дозе облучения, Дж/м<sup>2</sup>.

дозы облучения. Отличительной особенностью этих зависимостей в области больших доз ( $> 20$  Дж/м<sup>2</sup> в клетках дикого типа и  $\geq 3$  Дж/м<sup>2</sup> в *uvrA*-мутанте) является задержка, предшествующая интенсивному нарастанию фактора индукции. Изменения в характере кинетики SOS-ответа с ростом дозы означает, что процессы, приводящие к его индукции, различны в области больших и малых доз ультрафиолетового света. Известно, что при малых дозах SOS-сигнал, в качестве которого у *E. coli* выступает однострессовая ДНК, генерируется в процессе так называемого обхода поврежденных ДНК-полимеразой, в результате чего дочерняя нить содержит пробелы (Rupp and Howard-Flanders, 1968). С ростом дозы увеличивается число клеток, в которых репликативные вилки оказываются остановленными в поврежденных сайтах (Doudney, 1973). Измерение скорости синтеза ДНК в УФ-облученных клетках показало, что она резко падает через 20 минут инкубирования (при 37<sup>0</sup> С) при больших дозах, 20 Дж/м<sup>2</sup> для клеток дикого типа и 3 Дж/м<sup>2</sup> для *uvrA*-мутанта (Doudney, 1990). Это явление было названо автором индуцибельным ингибированием репликации ДНК. Восстановление синтеза ДНК после такого ингибирования начиналось после продолжительной задержки. При этом количество синтезированной ДНК уменьшалось с дозой, особенно существенно в клетках репарационного мутанта.

Таким образом, выявленные нами изменения в характере кинетических

зависимостей SOS-индукции (рис.1) с ростом дозы облучения в полной мере отражают

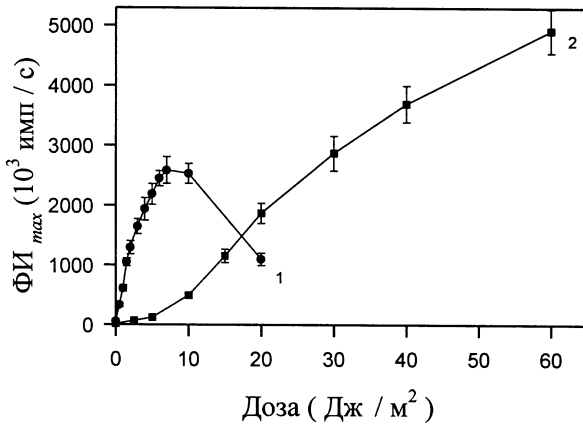


Рис.2. Зависимость максимальных значений фактора индукции от дозы ультрафиолетового света для клеток AB1886 (*uvrA*) – 1 и AB1157 (WT) – 2.

изменения в характере синтеза ДНК в УФ-облученных клетках. Следовательно, SOS-ответ, наблюдаемый нами после его задержки, есть результат восстановления ингибированной репликации. Снижение эффективности такого восстановления находит свое отражение в том, что максимальные значения фактора индукции

стремятся к насыщению при дозах 6-10 Дж/м<sup>2</sup> в *uvrA*-мутанте, и 100 Дж/м<sup>2</sup> в клетках дикого типа (рис.2). На примере мутантных клеток, облученных дозой 20 Дж/м<sup>2</sup>, видно, что дальнейшее увеличение дозы приводит к снижению SOS-ответа.

Сравнительный анализ дозовых зависимостей у клеток, дефектных по эксцизионной репарации, и изогенных клеток дикого типа (рис.2) показал, что отсутствие эксцизионной репарации приводит к возрастанию SOS-индукции, однако с разной эффективностью в области больших и малых доз ультрафиолетового света. При дозах < 5 Дж/м<sup>2</sup> максимальные значения фактора индукции увеличиваются ~ в 20 раз. Этот эффект снижается с последующим ростом дозы. Вместе с тем, при больших дозах блокирование эксцизионной репарации мутацией в

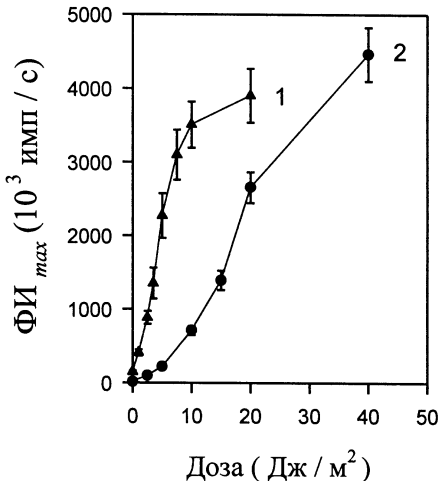


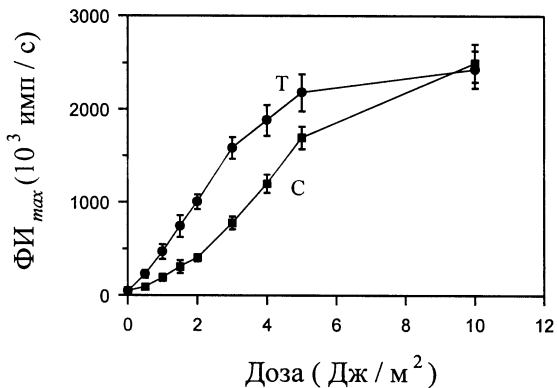
Рис.3. Зависимость максимальных значений фактора индукции от дозы ультрафиолетового света для клеток SK7772 (*uvrD*) – 1 и SK707 (WT) – 2.

гене *uvrA* приводит к обратному эффекту, что выражается в снижении способности клеток индуцировать SOS-ответ, в то время как в клетках дикого типа продолжается его эффективное нарастание.

Блокирование эксцизии УФ-индуцированных повреждений мутацией в гене *uvrD*, наличие которой никак не влияет на начальные стадии эксцизионной репарации, оказывает не столь значительное влияние на SOS-индукцию (рис.3). При дозах < 5 Дж/м<sup>2</sup> максимальные значения фактора индукции возрастают в этих клетках не более, чем в 9 раз по сравнению с соответствующими их значениями в родительском штамме. Этот эффект также более выражен на начальном участке дозовой кривой и снижается с ростом дозы.

В *uvrD*-мутанте доза 20 Дж/м<sup>2</sup> не приводит к снижению максимального значения фактора индукции, как это происходило в клетках с полным отсутствием эксцизионной репарации (*uvrA*<sup>-</sup>). На основании представленных данных можно заключить, что клетка способна частично компенсировать нарушение процесса эксцизии фотопродуктов, используя другие возможности для элиминации повреждений, из которых рекомбинационная репарация кажется наиболее вероятной, т.к. *uvrD*-мутантные клетки имеют гипер-*rec* фенотип (Arthur and Lloyd, 1980; Lloyd, 1983). Молекулярным субстратом для инициации рекомбинации могут быть разрывы ДНК, образуемые при инцизии, которая в этих клетках не нарушена. Высокая концентрация рекомбинационных ферментов, многие из которых у *E.coli* находятся под SOS-контролем, может быть обеспечена повышенным конститутивным уровнем SOS-индукции, который у *uvrD*-мутантных клеток был в 7-8 раз выше, чем у клеток дикого типа (~350·10<sup>3</sup> имп/с и 40·50·10<sup>3</sup> имп/с, соответственно).

Влияние фотореактивации на SOS-индукцию. Среди исследованных репарационных процессов фотореактивация пиримидиновых димеров оказалась наименее эффективной в элиминации SOS-индуцирующих повреждений (рис.4). Максимальные значения фактора индукции уменьшаются при воздействии видимого света в ~ 2.5 раза в диапазоне доз 0.5-2 Дж/м<sup>2</sup>, но этот эффект снижается с дальнейшим увеличением дозы и при 10 Дж/м<sup>2</sup> вообще отсутствует. Однако вывод о том, что в области больших доз ультрафиолетового света SOS-индукцию определяют нефотореактивируемые повреждения (6-4-фотопродукты), не является единственно возможным. Учитывая, что в области больших доз SOS-ответ индуцируется после восстановления репликации ДНК, можно предположить, что фотореактивация в этом случае увеличивает



**Рис.4.** Влияние видимого света на характер дозовых зависимостей для клеток AB1886 (*uvrA*), облученных ультрафиолетовым светом. По оси абсцисс – максимальные значения фактора индукции; по оси ординат – доза облучения. “С” и “Т” - пострадиационное выдерживание на свету и в темноте, соответственно.

кодируемый им, в комплексе с UmuD-белком осуществляет в *E.coli* check-point-контроль повреждений ДНК (Smith and Walker, 1986; Orregerman et al., 1999). Оба белка находятся под SOS-контролем. Согласно модели, предложенной в работе (Smith and Walker, 1986), они, по мере их накопления в процессе SOS-индукции, ингибируют репликацию ДНК, давая клетке возможность отрепарировать часть повреждений путем безошибочной эксцизионной репарации. В условиях нарастания SOS-сигнала UmuD-белок трансформируется в UmuD', после чего комплекс UmuCD' выполняет роль ДНК-полимеразы (*pol V*), способной осуществлять инсерцию основания ДНК напротив повреждения (Tang et al., 1999), так называемый "ошибочный синтез" ДНК.

Исследование показало, что наличие *umuC*-мутации в клетках приводит к сокращению lag-периода в индукции SOS-ответа примерно на 30 минут и к значительному возрастанию его уровня (рис.5). Различия максимальных значений фактора индукции у мутантных клеток и клеток дикого типа достигают 8.5 раз при дозе 5 Дж/м<sup>2</sup> и снижаются с последующим ростом дозы (рис.6). 30-минутная задержка SOS-ответа у родительского штамма показывает, что наличие в нем интактного UmuC-белка действительно приводит к ингибированию репликации ДНК. В работах (Sommer et al., 1998; Orregerman et al., 1999) было показано, что примерно столько времени необходимо, чтобы произошла активация UmuD в UmuD', которая устраняет такое ингибирование. Поскольку задержка проявляется в самом начале инкубирования и не

эффективность такого восстановления, элиминируя часть пиримидиновых димеров. Поэтому в присутствии видимого света большее число клеток участвует в индукции SOS-ответа.

Влияние регуляции клеточного цикла на SOS-индукцию. Для исследования влияния на SOS-индукцию процесса регуляции клеточного цикла был использован штамм с мутацией в гене *umuC*. Белок,

зависит от дозы облучения, можно утверждать, что конститутивного уровня данного белка (~20 молекул), достаточно, чтобы обеспечить клетке 30-минутный интервал времени для эксцизии повреждений ДНК еще до того, как в ней будет индуцирован SOS-ответ. Очевидно, что в клетках, облученных малыми дозами, за это время будет элиминирована более значительная часть повреждений, чем в клетках, облученных высокими дозами. Это, в частности, объясняет большую эффективность эксцизионной репарации в области доз  $< 5 \text{ Дж/м}^2$  (рис.2, 3). В клетках *umuC*-мутанта, где нет такой задержки, изменение наклона дозовой кривой, характерное для клеток дикого типа при  $5 \text{ Дж/м}^2$ , практически отсутствует. Тот факт, что после задержки скорость нарастания фактора индукции в клетках дикого типа была все еще ниже, чем

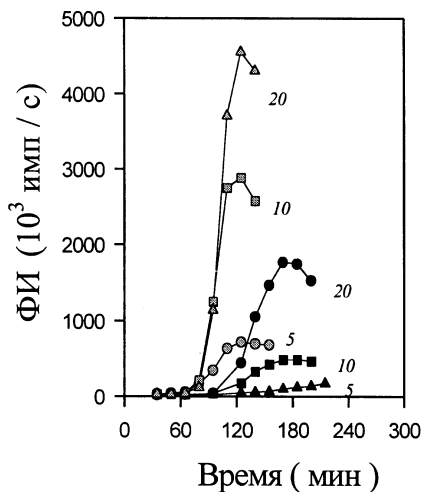


Рис.5. Зависимость фактора индукции от времени пострadiационного инкубирования для клеток GW2100 (*umuC*) (светлые символы) и AB1157 (WT) (темные символы), облученных ультрафиолетовым светом. Цифрами указана доза облучения, Дж/м<sup>2</sup>.

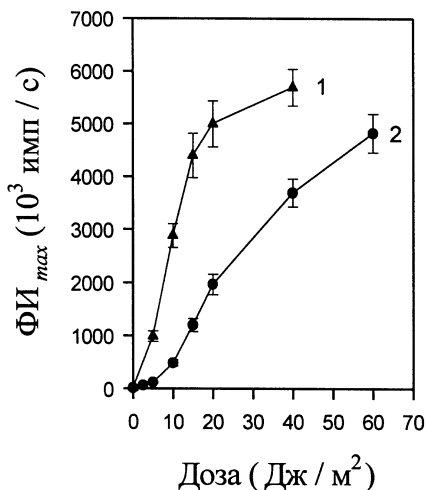
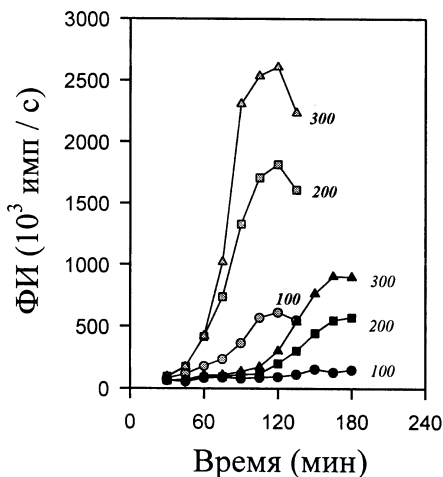


Рис.6. Зависимость максимальных значений фактора индукции от дозы ультрафиолетового света для клеток AB1157 (WT) – 1 и GW2100 (*umuC*) – 2.

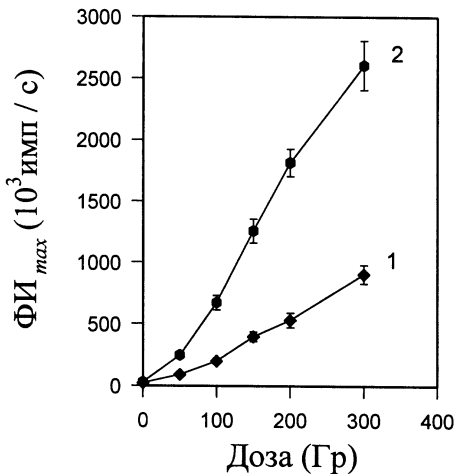
в мутантном штамме, может свидетельствовать о том, что по мере увеличения числа молекул UmuCD-белков в процессе SOS-индукции, они продолжают выполнять свою роль координаторов процессов репликации и репарации ДНК. Экспрессия эксцизионных генов, которые у *E.coli* также находятся под SOS-контролем, обеспечивает необходимое для этого количество эксцизионных ферментов. Альтернативным объяснением указанного факта может быть то, что процессы,

происходящие до начала репликации, определяют все дальнейшее развитие SOS-индукции.

Аналогичный эффект *umuC*-мутации на характер SOS-индукции наблюдался и при облучении клеток  $\gamma$ -лучами (рис.7, 8). В этом случае также имело место сокращение lag-периода в мутантных клетках на  $\sim 30$ -45 минут (рис.7) и снижение максимальных значений фактора индукции примерно в 3 раза во всем диапазоне исследованных доз (рис.8). Меньший эффект данной мутации в случае  $\gamma$ -излучения может быть следствием того, что  $\gamma$ -индуцированные двунитевые разрывы ДНК не требуют репликации, чтобы индуцировать SOS-сигнал (Kuzminov, 1995).



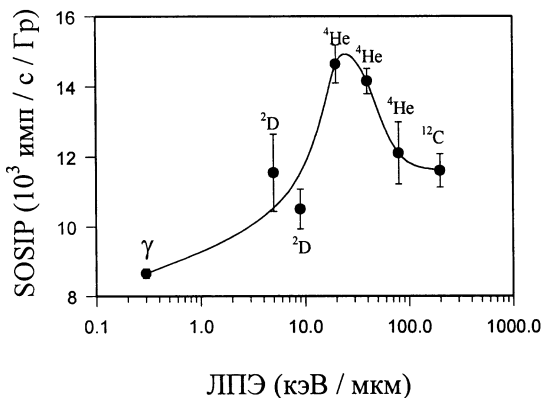
**Рис.7.** Зависимость фактора индукции от времени пострadiационного инкубирования для клеток AB1157 (WT) (светлые символы) и GW2100 (*umuC*) (темные символы), облученных  $\gamma$ -лучами. Цифры у кривых соответствуют дозе облучения, Гр.



**Рис.8.** Зависимость максимальных значений фактора индукции от дозы  $\gamma$ -излучения для клеток AB1157 (WT) – 1 и *umuC* – 2.

SOS-индукция при действии ускоренных тяжелых ионов. Характерной особенностью плотноионизирующих излучений является их способность продуцировать кластеры повреждений внутри области в несколько нанометров. Они получили название множественных или комплексных повреждений и представляют собой комбинацию двух и более нарушений структуры ДНК, продуцируемых внутри области 1-4 нм. Такие повреждения могут играть важную роль в различных биологических эффектах, вызванных плотноионизирующими излучениями (Ward, 1999).

Для исследования влияния линейной передачи энергии ионизирующих излучений на SOS-индукцию были использованы ускоренные тяжелые ионы дейтерия, гелия и углерода с ЛПЭ 5 -200 кэВ/мкм. В качестве показателя эффективности SOS-индукции



**Рис.9** Зависимость эффективности SOS-индукции (SOSIP) от ЛПЭ для клеток дикого типа C600.

максимального значения  $14,6 \pm 0,5$  имп/с/Гр для ионов гелия с ЛПЭ 20 кэВ/мкм, что в 1.7 раза превышает значение SOSIP для  $\gamma$ -лучей ( $8,6 \pm 0,2$  имп/с/Гр). Дальнейшее увеличение ЛПЭ приводит к снижению эффективности SOS-ответа. Последнее обстоятельство может быть обусловлено возрастанием доли кластеров с большим (“избыточным”) числом одиночных повреждений, что будет приводить к неэффективному выделению энергии.

Возрастание SOSIP на начальном участке кривой может быть следствием увеличения выхода двунитевых разрывов ДНК и комплексных повреждений. Кластеризация повреждений делает невозможной их эксцизионную репарацию (Harrison et al., 1998; David-Cordonnier et al., 2001). Оставаясь в ДНК, они будут препятствовать ее репликации и приводить тем самым к генерированию в клетке SOS-сигнала. Участие двунитевых разрывов в этом процессе может быть не столь эффективным. Увеличение плотности таких повреждений в ДНК с большей вероятностью вызывает ее обширную деградацию, нежели приводит к индукции SOS-ответа.

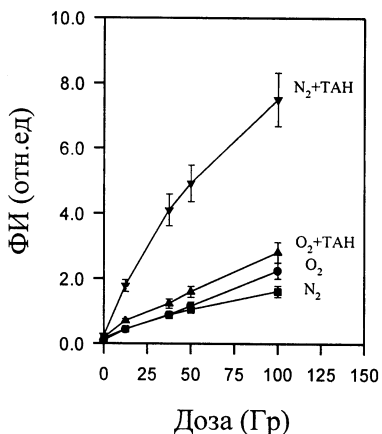
Использование аноксического радиосенсибилизатора ГАН (триацетонамин-N-оксил) позволяет смоделировать ситуацию в клетке, которая возникает при наличии в ее ДНК серьезных структурных нарушений, препятствующих продвижению

данными частицами был взят тангенс угла наклона дозовых зависимостей максимальных значений фактора индукции, который по аналогии с SOS-хромотестом назван SOSIP (sos induction potency). Зависимость его значений от линейной передачи энергии представлена на рис.9. С ростом ЛПЭ эффективность SOS-индукции возрастает и достигает своего



репликативной вилки, как это происходит в случае комплексных повреждений. Связываясь с  $\gamma$ -индуцированными радикалами оснований ДНК, преимущественно с тиминном, этот сенсibilизатор образует аддукты, которые не удаляются эксцизионной репарацией и препятствуют синтезу ДНК (Nakken and Brustad, 1974; Wold and Brustad, 1975; Scov et al., 1980; Berger and Cadet, 1985). Выход односторонних разрывов в присутствии ТАН практически не меняется (Scov et al., 1980). Таким образом, ТАН не увеличивает выход поврежденных оснований ДНК, а лишь переводит их в разряд нерепарируемых конститутивными ферментами, и они становятся субстратами SOS-репарации.

Для исследования влияния ТАН на SOS-индукцию мы использовали метод SOS-хромотеста. На рис.10 представлены зависимости фактора индукции, который в данном методе представляет собой отношение активности  $\beta$ -галактозидазы ( $\beta$ ) к активности щелочной фосфатазы (Р), от дозы  $\gamma$ -излучения. Значения фактора индукции для клеток, облученных в атмосфере азота в присутствии радиосенсibilизатора оказался более, чем в пять раз выше, чем в отсутствие ТАН в этих же условиях. Что



**Рис.10.** Зависимость фактора индукции от дозы  $\gamma$ -излучения для клеток RQ37, облученных в воздухе ( $O_2$ ), и в атмосфере азота ( $N_2$ ) без сенсibilизатора и в присутствии ТАН.

наиболее важно, он почти в четыре раза превышал значение фактора индукции в клетках, облучение которых осуществлялось в воздухе, где общий выход повреждений ДНК во много раз выше из-за присутствия кислорода (Breen and Murphy, 1995). При этом следует принять во внимание, что если бы ТАН в равной степени связывался со всеми  $\gamma$ -индуцированными радикалами оснований ДНК, эффект данного сенсibilизатора был бы значительно больше.

Из представленных данных следует, что индуцированные ионизирующими излучениями повреждения ДНК, которые не могут быть элиминированы эксцизионной репарацией и препятствуют репликации, являются высокоэффективными SOS-индуцирующими субстратами. Это дает основания предполагать, что комплексные повреждения ДНК,

число которых существенно увеличивается с ростом ЛПЭ излучений, могут быть ответственны за возрастание SOS-ответа при действии ускоренных тяжелых ионов.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В представленной работе впервые использован разработанный нами биолюминесцентный метод для количественной оценки SOS-индукции в клетках *Escherichia coli* - SOS *lux*-тест. Широкие возможности данного метода позволили нам провести комплексное исследование закономерностей SOS-индукции при действии ультрафиолетового света и ионизирующих излучений разного качества.

Проведенные исследования с использованием различных репарационных мутантов позволили установить, что отсутствие эксцизионной репарации и фотореактивации пиримидиновых димеров приводит к возрастанию SOS-индукции в области малых доз. Граница дозового диапазона, где наблюдался данный эффект, зависела от исследуемого репарационного механизма. Наибольшее возрастание SOS-ответа вызывало ингибирование начальной стадии эксцизионной репарации. Наименее эффективной в элиминации SOS-индуцирующих повреждений оказалась фотореактивация. Вместе с тем, при больших дозах блокирование указанных механизмов приводило к обратному эффекту, что выражалось в снижении способности клеток индуцировать SOS-ответ, в то время как в клетках дикого типа продолжалось его эффективное нарастание. Различное влияние репарационных процессов на SOS-индукцию в УФ-облученных клетках может быть обусловлены различиями как в количестве, так и в качестве повреждений в области больших и малых доз. Известно, что SOS-сигнал, в качестве которого у *E. coli* выступает одонитевая ДНК, генерируется в клетке только в процессе репликации ДНК. Основным источником одонитевой ДНК являются пробелы, оставляемые ДНК-полимеразой в дочерней нити напротив повреждения. Однако было показано, что с увеличением дозы все большее число репликативных вилок оказываются заблокированными в поврежденных сайтах (Doudney, 1973, 1990). В этом случае генерирование SOS-сигнала возможно только после того, как синтез ДНК будет восстановлен. Элиминация повреждений путем их эксцизии или фотореактивации будет способствовать такому восстановлению и, как следствие, возрастанию SOS-ответа. Тогда как в области малых доз, где репликация ДНК не прерывается, элиминация повреждений приведет к его снижению.

В работе впервые показано влияние на SOS-ответ регуляции клеточного цикла, осуществляемого с участием UmuC- и UmuD-белков как при УФ-, так и при  $\gamma$ -облучении, что позволило подтвердить модель (Smith, Walker, 1998), описывающую их роль в координировании процессов репарации и репликации ДНК.

Исследование SOS-индукции в клетках *E. coli* при действии  $\gamma$ -излучения и ускоренных тяжелых ионов в широком диапазоне ЛПЭ показало, что эффективность данного процесса зависит от линейной передачи энергии излучения. Она увеличивается в диапазоне ЛПЭ 0.3–20 кэВ/мкм и снижается с последующим увеличением линейной передачи энергии излучения. Использование аноксического радиосенсибилизатора ТАН позволило показать высокую SOS-индуцирующую способность неэксцизируемых и препятствующих синтезу ДНК повреждений при действии ионизирующих излучений. Это дает основания предполагать, что ответственными за возрастание SOS-ответа при увеличении ЛПЭ частиц могут являться комплексные повреждения ДНК.

Полученные в работе результаты согласуются с данными о характере таких фундаментальных клеточных процессов, как синтез ДНК в УФ-облученных клетках (Doudney, 1973, 1990; Verma et al., 1989; Kogoma, 1997; Michel, 2000) и мутагенез при действии ионизирующих излучений (Kozubek et al., 1994), которые у *E. coli* находятся под SOS-контролем. Таким образом, разработанный нами и использованный в работе метод SOS *lux*-тест, может быть рекомендован как чувствительный и эффективный метод количественной оценки SOS-индукции в клетках *Escherichia coli*.

## ВЫВОДЫ

1. Исследованы количественные и качественные закономерности SOS-индукции в клетках *E. coli* при действии ультрафиолетового света,  $\gamma$ -излучения и ускоренных тяжелых ионов с ЛПЭ 5 – 200 кэВ/мкм.

2. Установлено, что кинетика SOS-индукции различна в области больших и малых доз ультрафиолетового света. Для больших доз ( $\geq 3$  Дж/м<sup>2</sup> для клеток, дефектных по эксцизионной репарации, и  $> 20$  Дж/м<sup>2</sup> для клеток дикого типа) характерна задержка SOS-ответа, увеличивающаяся с дозой.

3. Блокирование эксцизионной репарации мутациями в генах, ответственных за различные ее стадии, приводит к возрастанию SOS-индукции при действии ультрафиолетового света, которое наиболее ярко выражено в области малых доз

(< 5 Дж/м<sup>2</sup>). При этих дозах максимальные значения фактора индукции в клетках, дефектных по узнаванию и по эксцизии фотопродуктов, были примерно в 20 и 9 раз выше, чем в клетках дикого типа, соответственно.

4. Фотореактивация пиримидиновых димеров приводит к снижению SOS-индукции, которое наиболее ярко выражено в области малых доз ( $\leq 2$  Дж/м<sup>2</sup>). При этих дозах максимальные значения фактора индукции после такой процедуры уменьшаются в ~2.5 раза. Фотореактивирующий эффект видимого света отсутствует при дозах  $\geq 10$  Дж/м<sup>2</sup>.

5. Нарушение регуляции клеточного цикла, контролируемой UmuCD-белками, приводит к задержке SOS-индукции как при УФ-, так и при  $\gamma$ -облучении, и снижению ее уровня до 8.5 и 3 раз, соответственно.

6. SOS-ответ при действии ионизирующих излучений зависит от линейной передачи энергии. С увеличением ЛПЭ от 0.3 кэВ/мкм до 200 кэВ/мкм эффективность SOS-индукции возрастает в 1.7 раза. Дальнейшее увеличение ЛПЭ приводит к ее снижению.

7. При  $\gamma$ -облучении клеток в присутствии аноксического сенсibilизатора ТАН, образующего крупные аддукты с  $\gamma$ -индуцированными радикалами ДНК, наблюдается более чем пятикратное возрастание SOS-ответа. Это свидетельствует о том, что повреждения, которые не являются субстратами эксцизионной репарации и препятствуют синтезу ДНК, являются эффективными SOS-индуцирующими повреждениями при действии ионизирующих излучений.

8. Оценка чувствительности метода SOS *lux*-тест показала, что доза, при которой наблюдается двухкратное увеличение фактора индукции при облучении клеток дикого типа ультрафиолетовым светом и  $\gamma$ -лучами, по сравнению с контрольным уровнем, составляет 0.5 Дж/м<sup>2</sup> и 5 Гр, соответственно. Для клеток, дефектных по эксцизионной репарации УФ-индуцированных повреждений, эта доза составляет 0.1 Дж/м<sup>2</sup>. Это позволяет заключить, что SOS *lux*-тест не уступает по чувствительности классическим методам измерения SOS-индукции. При этом он существенно превосходит их по простоте и информативности.

Комова О.В., Красавин Е.А. Закономерности SOS-ответа в клетках *E. coli* при действии плотноионизирующих излучений. Труды IV съезда по радиационным исследованиям. Москва, 2001, т. III, с.722.

Комова О.В., Кандиано Е.С. и Красавин Е.А. Эффект *umuC*-мутации на индукцию SOS-ответа в клетках *E.Coli* при действии УФ- и  $\gamma$ -излучения. Радиационная биология. Радиоэкология, 2000, т.40, № 4, стр. 378-81

Комова О.В., Кандиано Е.С. и Малавиа Г. Закономерности SOS-ответа в клетках *E.coli* K-12 (*uvrA*), облученных различными дозами ультрафиолетового света. Радиационная биология. Радиоэкология, 2000, т.40, № 1, стр. 10-14.

Комова О.В., Козубек С., Красавин Е.А. Индукция SOS-системы в клетках *E.coli* при  $\gamma$ -облучении в присутствии аноксического сенсibilизатора TAN. Труды Рабочего совещания по исследованию механизма радиационно-индуцированного мутагенеза и репарации ДНК. Дубна, 1990, Д19-90-457, стр.49-58.

Ptitsyn L.R., Horneck G., Комова О.В., Kozubek S., Krasavin E.A., Bonev M. and Rettberg P. A biosensor for environmental genotoxin screening based on an SOS*lux* assay in recombinant *Escherichia coli* cells. Appl.Environ.Microbiol., 1997, v.63, p.4377-4384.

Horneck G., Ptitsyn L.R., Rettberg P., Комова О., Kozubek S., Krasavin E.A. Recombinant *Escherichia coli* cells as biodeceptor system for genotoxins. In: Biosensors for Environmental Diagnostics. B.Hock, D.Barcelo, K.Cammann, P.-D.Hansen, A.P.F.Turner (Eds). B.G.Teubner, Stuttgart – Leipzig, 1998, p.215-232.

Комова О.В., Krasavin E.A., Kozubek S., Ptitsyn L.R., Egorov P.E. and Yufang W. SOS-response in *uvrD* and *umuC* mutants of *E.coli* cells after UV and  $\gamma$ -irradiation. In: Radiation Biology and its application in space research. S.Kozubek and G.Horneck (Eds). Kiramo, 1995, p.121-125.

Kozubek S., Krasavin E.A., Horneck G., Amirtaev K.G., Tokarova B., Basha S.G., Комова О.В., Ogievetskaja M.M. and Soska J. A radiobiological model on cellular damage induced by ionizing radiation and its repair in bacteria. In: Extended abstracts of Fourth workshop on heavy charged particles in biology and medicine. G.Kraft (Ed), Gesellschaft für Schwerionenforschung mbH, Darmstadt, 1991, p.A9.

Ptitsyn L.R., Комова О.В. and Krasavin E.A. Bioluminescent assay for chemical mutagens and different kind of radiation based on the SOS-response function of *E.coli* cells.

In: "International ecological congress. Section: Science and the Environmental". Proceedings and abstracts. M.Y.Korenman (Ed), ARIOS-Kansas, 1996, p.128-130.

Komova O.V., Candiano E.A., Krasavin E.A., Bonev M. and Horneck G. The nature of the SOS-inducing lesions caused by UV light in E.coli cells deficient in UmuC gene product. In: Fundamentals for the assessment of risks from environmental radiation. K.Baumstark-Khan, S.Kozubek and G.Horneck, (Eds), NATO Science Series, 1998, v.55, p. 167-172.

Rettberg P., Horneck G., Krasavin E.A., Komova O.V., Pticyn L.R., Kozubeck S. Verfahren zur luminometrischen Bestimmung der mutagenen und/oder karzinogenen Potenz einer zu untersuchenden Probe oder eines zu untersuchenden Faktors (Agents). Patents № 195 49 417, Bundesrepublik Deutschland, 1998. (Патент).

Получено 22 января 2002 года.

Макет Н. А. Киселевой

Подписано в печать 23.01.2002  
Формат 60 × 90/16. Офсетная печать. Уч.-изд. л. 1,25  
Тираж 100. Заказ 53071

Издательский отдел Объединенного института ядерных исследований  
Дубна Московской области