

**ОБЪЕДИНЕННЫЙ
ИНСТИТУТ
ЯДЕРНЫХ
ИССЛЕДОВАНИЙ
ДУБНА**

P19-87-215

С.Козубек, Е.А.Красавин, Н.Линь, И.Сошка*,
В.Драшил*, К.Г.Амиртаев, Б.Токарова, М.Бонев

**ИНДУКЦИЯ SOS-СИСТЕМЫ У КЛЕТОК E.COLI
ПРИ ДЕЙСТВИИ УСКОРЕННЫХ ТЯЖЕЛЫХ ИОНОВ**

Направлено в журнал "Генетика"

*Институт биофизики, Брно, ЧССР

1987

Мутагенное действие ионизирующих излучений на бактериальные клетки в сильной степени зависит от активности генов *hes A* и *lex A*, продукты которых контролируют индуцибельную SOS-репарацию /1,2/. Поэтому при выяснении механизмов мутагенного действия ионизирующих излучений с разными физическими характеристиками важно знать особенности проявления SOS-реакций клеток при действии излучений, различающихся по величине линейной передачи энергии /ЛПЭ или L/ в широком диапазоне. Известно, что с возрастанием ЛПЭ в ДНК клеток увеличивается выход повреждений, не репарируемых либо трудно репарируемых клетками /3,4/. К ним, в частности, относятся прямые двунитевые разрывы /ПДР/ ДНК и повреждения, не восстанавливаемые в процессе эксцизионной *pol A*-зависимой репарации и быстрой репарации одностебельных разрывов /ОР/ ДНК. Последние, по-видимому, восстанавливаются преимущественно с участием *hes A* - *lex A*-зависимой репарации, осуществляемой длинными фрагментами /3,4/. Если такие повреждения участвуют в формировании сигнала, запускающего SOS-реакцию, то с ростом ЛПЭ можно ожидать усиления степени индукции SOS-системы. С другой стороны, если SOS-сигналом служат только продукты деградации ДНК /5/, то с увеличением ЛПЭ эффективность SOS-ответа должна снижаться, поскольку частота образования протяженных брешей в ДНК облученных клеток в этом случае меньше, чем при γ -облучении /3,4/. Для проверки этих предположений и была принята настоящая работа.

Экспериментальным подходом к изучению индукции SOS-системы клеток при действии излучений с разной ЛПЭ в настоящей работе явилось использование нового эффективного метода исследования SOS-системы - SOS-хромотеста /6/. С его помощью по активности β -галактозидазы, вырабатываемой *lac Z*-локусом, встроенным в ген *sul A* и находящимся под негативным контролем продукта гена *lex A*, можно судить об интенсивности SOS-ответа.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Бактерии. В работе использованы клетки *E. coli*, K12 штамм PQ 37 (F^- thr, leu, his-4, pur D, thi, gal E, gal K, gal T, lac Δ U169, srl 300 :: Tn 10, pro B, rps L, uvr A, rfa, trp :: Muc⁺, sfi A :: Mud (Ap, lac) cts, полученные от М.Гоффунга /6,7/. Этот

штамм был сконструирован стандартными методами генной инженерии путем слияния участков $su1 A :: lac Z^{/9/}$. В клетках PQ 37 $lac Z$ локус находится под контролем $su1 A$ - промотора. Таким образом, синтез β -галактозидазы, кодируемый $lac Z$ -локусом, зависит от SOS-индукции, при которой снимается $lex A$ -репрессор с промотора $su1 A$. У клеток данного штамма имеется делеция по нормальному $lac Z$ -локусу. Помимо этого он имеет дефект по $uvr A$ -зависимой ветви эксцизионной репарации и синтезу липополисахарида (rfa).

Среда. Клетки выращивали в L-среде ^{10/} с добавлением ампициллина в концентрации 20 мг/мл. Z-буфер готовили по методике Миллера ^{9/} и T-буфер по методике Киллардета ^{16/}. Растворы ОНФГ и ПНПП в концентрации 4 мг/мл каждый готовили соответственно на основе фосфатного и T-буфера.

Методика постановки эксперимента. Из замороженной суспензии клеток ставили ночную культуру в L-среде с ампициллином /LA-среда/. После разведения 1:20 культуру, в течение 2 ч 15 мин подращивали в термостатируемой водяной бане на шейкере при температуре 37°C до оптической плотности $OD_{600} = 0,6$. После облучения клетки вновь инкубировали в термостатируемой водяной бане на шейкере в течение 2 ч при 37°C. После этого проводили лизис клеток в течение 10 мин при температуре 30°C в T- или Z-буфере путем добавления 10-процентного раствора додецил-сульфата натрия. В лизированные образцы добавляли растворы ОНФГ и ПНПП в следующем соотношении: 0,9 мл лизата - 0,2 мл раствора ОНФГ или ПНПП. Через 30-40 мин реакцию в T-буфере останавливали путем добавления 0,4 мл 2N HCl и через 5 мин добавляли 0,4 мл 2M Tris. Реакцию в Z-буфере останавливали добавлением 0,65 мл 1M раствора Na_2CO_3 . Измерение результатов реакции проводили на спектрофотометре "Specol 11" /производство фирмы Carl-Zeis, ГДР/ при длине волны 420 нм. В качестве стандарта использовали образцы с необлученными клетками, обработанными по идентичной методике, и без 2-часовой инкубации перед лизисом. Контрольные клетки не облучали, но подвергали 2-часовой инкубации перед лизисом, как и облученные образцы.

Источники излучений и техника облучения. Типы излучений, использованные в экспериментах, и их физические характеристики представлены в таблице. Источником γ -излучения являлись установки с ^{60}Co и ^{137}Cs и мощностью дозы облучения, соответственно равной 3 и 35 Гр/мин. Облучение проводили либо в суспензии, либо на поверхности агара. В экспериментах с тяжелыми ионами облучение проводили только на поверхности мясопептонного агара /производство Института микробиологии им. Н.Ф.Гамалеи МЗ СССР/. Для этого 0,01 мл суспензии, содержащей $1,5-2 \cdot 10^7$ клеток, наносили на поверхность агара, подсушивали и подвергали облучению тяжелыми ионами. Облучение ускоренными

Таблица

Физические характеристики использованных пучков

Вид излучения	L, кэВ/мкм	E, МэВ/нукл.
γ-лучи	0,3	-
${}^4_2\text{He}$	22	8,0
	40	3,9
	60	2,2
${}^9_4\text{Be}$	117	6,5
	200	3,2
${}^{12}_6\text{C}$	210	7,5
	330	4,0

многозарядными ионами проводили на ускорителе У-200 Лаборатории ядерных реакций ОИЯИ на специальной установке с комплексом электронно-физической аппаратуры ¹⁸. Мощность дозы облучения составляла 20 Гр/мин. Во время подготовки и в течение облучения температуру образцов поддерживали на уровне около 0°C. После облучения клетки смывали с поверхности агара в 1 мл среды.

Определение выживаемости клеток проводили методом макроколоний путем посева на чашки Петри с мясопептонным агаром после соответствующего разведения облученных образцов в М9-буфере. Инкубацию чашек осуществляли при температуре 37°C в течение 24 ч.

Обработка результатов. Активность β-галактозидазы (β) нормировали на активность фосфатазы (ρ), которая отражает состояние белкового синтеза в клетках, поскольку штамм PQ37 является конститутивным по синтезу фосфатазы. Соотношение $R = \beta/\rho$ для дозы облучения D (R_D) нормировали на значение R_0 для необлученных клеток. Соотношение R_D/R_0 называется фактором индукции (IF) ¹⁶. Начальный участок кривой IF(D) является линейным, и его наклон называют SOSIP (SOS - induction potency). Для обработки результатов использовали стандартные методы статистического анализа. Расчет флуктуаций энергии тяжелых ионов по чувствительным микрообъемам клеток проводили на ЭВМ. Зависимость IF от специфической энергии z, поглощенной клеткой, связана с измеряемой зависимостью IF(D) формулой

$$IF(D) = \int IF(z) \cdot f(z, D) \cdot dz, \quad /1/$$

где IF(D) - измеряемая зависимость, f(z, D) - плотность вероятности выделения специфической энергии z при дозе D.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для всех типов использованных в экспериментах излучений в изученном диапазоне доз наблюдается возрастающая зависимость $\beta(D)$ с выходом на плато и ниспадающая зависимость $\rho(D)$. Примеры такого рода кривых для γ -излучения, ионов гелия ($L = 60$ кэВ/мкм) и ионов углерода ($L = 330$ кэВ/мкм) приведены на рис. 1. Дозовые зависимости фактора индукции при действии использованных излучений на клетки показаны на рис. 2. Видно,

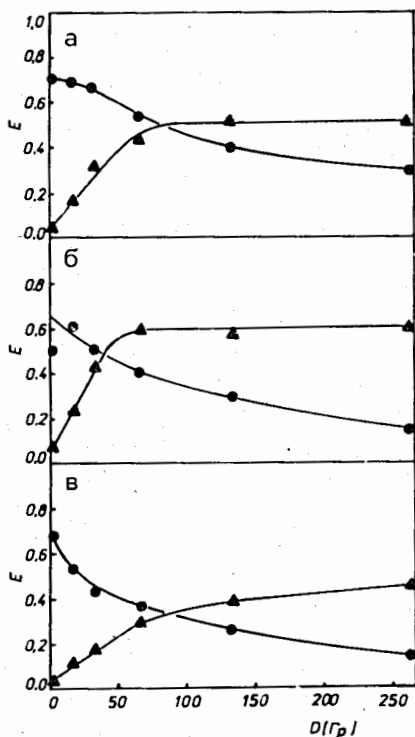
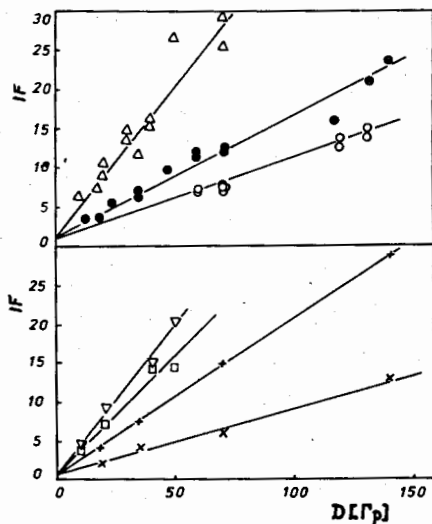


Рис. 2. Зависимость фактора индукции от дозы $IF(D)$: Δ - ионы гелия, 20 кэВ/мкм, 40 кэВ/мкм и 60 кэВ/мкм; \bullet - γ -лучи, облучение на агаре; \circ - γ -лучи, облучение в суспензии; ∇ - ионы бериллия, 117 кэВ/мкм; \square - ионы бериллия, 200 кэВ/мкм; $+$ - ионы углерода, 210 кэВ/мкм, \times - ионы углерода, 330 кэВ/мкм.

что с увеличением ЛПЭ зависимость $IF(D)$ становится более крутой и при $L \geq 50$ кэВ/мкм наблюдается уменьшение ее наклона. Зависимость $SOSIP(L)$ приведена на рис. 3. Экспериментальные точки, обозначенные разными символами, отражают разные условия облучения клеток: в суспензии (\circ) и на поверхности агара (\bullet). Из представленных

Рис. 1. Зависимость экстинкции (E) от дозы (D) для β -галактозидазы (Δ) и фосфатазы (\bullet): а/ γ -лучи; б/ ионы гелия, 60 кэВ/мкм; в/ ионы углерода, 330 кэВ/мкм.



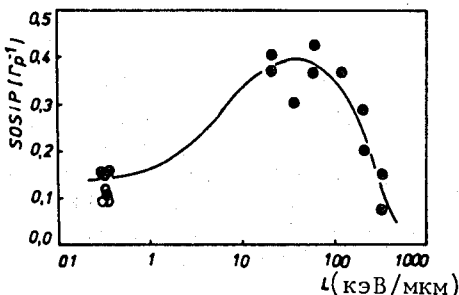
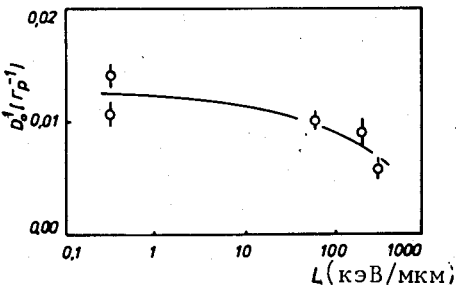


Рис. 3. Зависимость SOSIP от ЛПЭ излучений: ● - облучение на поверхности агара; ○ - облучение в суспензии.

материалов следует, что при облучении клеток на поверхности агара величина SOSIP в 1,6 раза больше, чем при облучении в суспензии. С возрастанием L значения SOSIP увеличиваются и достигают при $L \approx 50$ кЭВ/мкм максимальной величины, равной 0,4. Эта величина в 2,5 раза больше, чем полученная при γ -облучении клеток на поверхности агара. При дальнейшем возрастании L ($L > 50$ кЭВ/мкм) значения SOSIP уменьшаются и при $L=300$ кЭВ/мкм составляют величину, которая меньше наблюдаемой при γ -облучении клеток в суспензии.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что с увеличением ЛПЭ до некоторых определенных значений величины SOSIP клеток возрастает. С учетом этого возникает вопрос, связано ли данное возрастание с увеличением выхода повреждений, участвующих в формировании SOS-сигнала, или же отражает другие процессы. Так, если предположить, что синтез фосфатазы при пострadiационной инкубации клеток протекает во всех клетках, но размножается только их выживающая фракция (s), то зависимость $p(D)$ будет иметь ниспадающий вид с наклоном, соответствующим чувствительности клеток к облучению. Следовательно, изменение радиочувствительности клеток может влиять на величину SOSIP. Из материалов, представленных на рис. 3, видно, что зависимость SOSIP(L) описывается кривой с максимумом. Аналогичной кривой описывается и зависимость радиочувствительности (D_0^{-1}) бактерий *E.coli* K12 дикого типа от L при культивировании клеток в прерадиационный период в условиях богатой ростовой среды [11]. Однако, как это видно из рис. 4, для клеток



РQ 37, выращиваемых до облучения в L -среде, наблюдается зависимость $D_0^{-1}(L)$ ниспадающего типа. Характер этой зависимости дает основание полагать, что возрастание значений SOSIP с увеличением L невозможно объяснить изменением радиочувствительности

Рис. 4. Радиочувствительность клеток PQ 37 в зависимости от ЛПЭ.

клеток. Следовательно, частицы с большой величиной L должны индуцировать в генетическом аппарате клеток либо большее количество повреждений, запускающих SOS-систему, либо вызывать образование качественно иных повреждений по сравнению с редкоизирующими излучениями.

Другим фактором, модифицирующим зависимость $SOSIP(L)$, являются флуктуации энергии частиц по чувствительным микрообъемам клеток. Например, при действии на клетки ускоренных ионов углерода та часть клеток, через которые прошли тяжелые частицы, получает дозу, составляющую несколько сот Грей, другая часть оказывается необлученной. Следовательно, зависимость $IF(D)$ надо отнести к дозе, получаемой самой клеткой, а не к средней дозе, получаемой всей популяцией. Зависимость $IF(D)$ с достаточной точностью можно описать функцией

$$IF(D) = 1 - e^{-a \cdot D}, \quad /2/$$

где a - параметр и D - доза облучения. Пользуясь /1/, можно рассчитать трансформацию зависимости $IF(D)$ с увеличением L излучений. Результаты расчетов представлены на рис. 5. Видно,

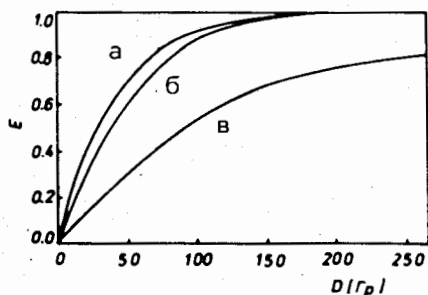


Рис. 5. Трансформация функции $1 - e^{-0,01 \cdot D}$ с увеличением ЛПЭ. Зависимость показана для γ -лучей /а/, для 60 кэВ/мкм /б/ и 330 кэВ/мкм /в/.

что начальный наклон этой зависимости падает с возрастанием L . Величина изменения угла наклона зависимости $IF(D)$ определяется размером чувствительного

объема /чем меньше объем, тем больше падение наклона/. Для чувствительных объемов, сравнимых с размером нуклеоида бактериальных клеток /диаметр нуклеоида составляет 0,5-0,7 мкм/, наблюдается незначительное уменьшение наклона с возрастанием L до значений $L \approx 50$ кэВ/мкм, а затем его резкое снижение при дальнейшем увеличении L . Указанное обстоятельство объясняет уменьшение значений $SOSIP$ при $L \geq 50$ кэВ/мкм. Следует заметить, что в диапазоне значений $L < 50$ кэВ/мкм возрастание величины $SOSIP$ было бы еще более резко выраженным при условии отсутствия флуктуаций энергии частиц по чувствительным микрообъемам клеток.

Таким образом, на основании вышеизложенного можно прийти к выводу о том, что с возрастанием ЛПЭ излучений интенсивность

SOS-ответа клеток увеличивается. Можно полагать, что это связано с индукцией в генетическом аппарате клеток большего количества повреждений, не восстанавливаемых pol A -зависимой репарацией, восстановление которых происходит лишь в процессе медленной hes A-lex A -зависимой репарации. К таким повреждениям, по-видимому, могут относиться некоторые типы одонитевых разрывов ДНК со сложной структурой концевых групп ^{12, 13/}, разного рода "сочетанные" повреждения, требующие для своего образования двух и более актов передачи энергии /разрыв главной цепи валентности - повреждение основания, повреждение сахара - повреждение основания и т.д./, повреждения, приводящие к образованию энзиматических двунитевых разрывов ДНК и т.п. Одонитевые разрывы ДНК, возникающие от OH^{\cdot} -радикалов, не являются эффективным индуктором, запускающим SOS-систему. Так, например, при действии на клетки перекиси водорода или УФА-излучения SOS-ответ выражен существенно слабее, чем при γ -облучении /собственные наблюдения/. Это коррелирует с интенсивностью энзиматической деградации ДНК, которая при действии на клетки перекиси водорода практически не наблюдается или слабо выражена при УФА-облучении клеток. Вместе с тем подобная корреляция скорее всего отражает только тот факт, что деградация ДНК и запуск SOS-системы, по-видимому, могут являться следствием одной и той же причины. Об этом, например, говорит то обстоятельство, что пиримидиновые димеры в клетках PQ 37, являющихся cht A -мутантом, не приводят к деградации ДНК, но тем не менее эффективно индуцируют SOS-ответ ^{14/}.

ВЫВОДЫ

1. Зависимость SOSIP от ЛПЭ излучений описывается кривой с максимумом. Величина SOSIP возрастает с увеличением ЛПЭ до ≈ 50 кэВ/мкм, а затем снижается. Максимальное значение SOSIP по сравнению с γ -излучением составляет 2,5.

2. С увеличением ЛПЭ излучений возрастает также выход повреждений, репарация которых осуществляется hes A-lex A -зависимой репарацией. В результате этого значение SOSIP возрастает. Снижение величины SOSIP для больших ЛПЭ можно объяснить на основе флуктуаций энергии по чувствительным микрообъемам клеток.

Авторы благодарны М.Гофнунгу за предоставление бактериально-го штамма PQ 37.

ЛИТЕРАТУРА

1. Radman M. - In: Molecular Mechanisms for the Repair of DNA. Eds. P.C.Hanawalt, R.B.Setlow. New York: Plenum Press, 1975, p.197.
2. Witkin E.M. - Bacteriol.Rev., 1976, 40, p.869.
3. Kozubek S., Krasavin E.A. - Neoplasma, 1984, 31, p.675.
4. Kozubek S., Krasavin E.A. - Neoplasma, 1984, 31, p.684.
5. Gudas L.J., Pardee A.B. - Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 1975, 72, p.2330.
6. Quillardet P. et al. - Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 1982, 79, p.5971.
7. Soska J. Труды конференции "Прогресс в биофизике". Брно, 1983.
8. Череватенко А.П. - В кн.: Материалы 5 Всесоюзного совещания по микродозиметрии. Усть-Нарва. Изд-во МИФИ, М., 1986.
9. Huisman O., D'Ari R. - Nature (London), 1981, 290, p.797.
10. Miller J.M. - Cold Spring Harbor, New York, 1972.
11. Амиртаев К.Г. и др. - Радиобиология, 1985, т.25, с.20.
12. Bridges B.A., Mottershead R.P. - Heredity, 1972, 29, p.203.
13. Жестяников В.Д. Репарация ДНК и ее биологическое значение. Л.: Наука, 1979.
14. Quillardet P., Hofnung M. - J.Bacteriol., 1984, 157, p.35.

Рукопись поступила в издательский отдел
3 апреля 1987 года.

Козубек С. и др.

P19-87-215

Индукция SOS-системы у клеток *E.coli*
при действии ускоренных тяжелых ионов

Получены данные по индукции SOS-системы *E.coli* PQ 37 после воздействия излучениями разного качества. Степень индукции измеряется методом хромотеста. Наблюдается увеличение фактора индукции с увеличением линейной передачи энергии /ЛПЭ/ до 50 кэВ/мкм. Для ЛПЭ ≥ 50 кэВ/мкм способность излучений индуцировать SOS-систему уменьшается.

Работа выполнена в Лаборатории ядерных проблем ОИЯИ.

Препринт Объединенного института ядерных исследований. Дубна 1987

Перевод М.И.Потапова

Kozubek S. et al.

P19-87-215

Escherichia coli PQ-37 Induction of SOS-
System by Accelerated Heavy Ions

Data on induction of the SOS-system of *E.coli* PQ 37 by radiation of various quality are obtained. The degree of induction is measured by chromotest. The induction factor is observed to increase as LET grows to 50 keV/ μ m. The radiation capability of inducing the SOS-system decreases for LET ≥ 50 keV/ μ m.

The investigation has been performed at the Laboratory of Nuclear Problems, JINR.

Preprint of the Joint Institute for Nuclear Research. Dubna 1987