

СООбщения Объединенного Института Ядерных Исследований Дубна

0-368

P19-87-814

М.М.Огиевецкая, С.Козубек, Е.А.Красавин, В.Драшил*, И.Сошка*

ИССЛЕДОВАНИЕ ИНДУКЦИИ SOS-ОТВЕТА У ESCHERICHIA COLI ПРИ *p*-ОБЛУЧЕНИИ МЕТОДОМ ХРОМОТЕСТА

*Институт биофизики ЧСАН, Брно, ЧССР

BBETEHNE

SOS-ответ клеток прокариот при действии ДНК-повреждающих агентов представляет собой сложный многоэтапный процесс и проявляется в изменении ряда важных свойств клеток: увеличении репаративного синтеза ДНК, повышении мутабильности, ингибировании клеточного деления, индукции профага и некоторых других [1].

Предложенный Киллардетом и соавторами [2] количественный метод выявления SOS-реакции клеток при действии ЛНК-повреждающих агентов - SOS-хромотест привлекает своей простотой и высокой чувствительностью. Он основан на одновременном колориметрическом анализе в среде уровней в-галактозидазы и шелочной фосфатазы. У клеток Escherichia coli (штамм PQ 37), сконструированных путём слияния оперонов sul A (sfi A)::lacZ, SOS-ответ контролируется именно этим способом. При измерении эффективности мутагенного влияния разных ЛНК-тропных агентов методом SOS - хромотеста представляется важным иметь информацию об особенностях кинетики индуцированного синтеза в-галактозидазы. Изучение кинетики SOSответа клеток, индуцированного %-облучением, и явилось целью настоящей работы.

МЕТОДИКА

Штамм. Во всех экспериментах был использован бактериальный штамм E.coli PQ. 37, генотип которого описан в работе [2].

Определение выживаемости клеток. Выживаемость определяли по стандартной методике, подсчитывая количество клеток, образующих

© Объединенный институт ядерных исследований Дубна, 1987

Belle, and inicturyt BL Dates Chegobause **SKELINIOTEKA**

макроколонии. Для эксперимента брали либо ночную культуру (для определения радиочувствительности клеток), либо клетки после 2часового подращивания (для определения формы кривой выживания). Облучение проводили в М9-буфере. Клетки высеивали на полный питательный агар (производство Института микробиологии

им. Н.Ф. Гамалеи МЗ СССР).

Определение в-галактозидазы. Ночную культуру, разведенную в 20 раз свежей ЦА-средой (L-среда с добавлением 20 мкг/мл ампицилина), инкубировали 2 ч при 37°С с аэририванием, после чего суспензию разводили до концентрации 10 клеток/мл, раэливали по пробиркам и облучали разными дозами 8-излучения. Облученные образцы клеток аэрировали при 37°С в течение разных промежутков времени, пробы отбирали для одновременного измерения активности 8-галактозицазы и шелочной фосфатазы. Для измерения В-галактозидазы пробы клеток лизировали в Z-буфере 10 минут при комнатной температуре, побавляли ортонитрофенил 8-D галактозид (ОНФГ) производства SIGMA (США), оставляли 40 мин при комнатной температуре и останавливали реакцию добавлением 1M Na₂CO₃. Цветную реакцию измеряли при 420 нм на спектрофотометре SPECOL (Zeiss, ГДР), сопоставляя с контрольным образцом, которым служила проба клеток до облучения и до инкубирования. Пробу хранили на льцу.

Определение щелочной фосфатазы. Отобранную пробу КЛӨТОК лизировали в Т-буфере 10 мин при комнатной Temmeparype, добавляли паранитрофенилфосфат (ПНПП) производства SIGMA и оставляли на 40 мин. Реакцию останавливали досавлением 1М НС1 и через 5 мин добавляли 1М-раствор триса для восстановления окраски. Реакцию измеряли при 420 нм на спектрофотометре.

Определение селка. Белок определяли методом Лоури [3]. Вычисление фактора инпукции. Обозначим экстинкции для в-галактозидазы при дозе D,9(D), в контроле 9(O),и для фосфатазы P(D), в контроле p(0). Тогда фактор индукции (IF) определяется как

IF=9(D)/9(0)*P(0)/P(D).

Производная зависимости (F(D) для нулевой дозы называется SOSIP. Определение параметров разных уравнений проведено методом минимизации суммы квадратов отклонений теоретических и экспериментальных величин.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Кривая роста клеток Е. со1 і РО 37

Интактные клетки РФ 37 выращивали в L-среде. Время генерации (Т.) клеток РО 37 в данных условиях составляло 46 мин (рис. 1). Рост культуры изучали в интервале 0-180 мин при 37°С в условиях аэрации. На рис. 1 видно, что кривая роста представляет собой экспоненту

$$N = N_0 \Theta^{(1)}, \qquad (1)$$

где N и N° - количества клеток во время t и O соответственно, β ° : : 1n(2/T_e). На основе полулогарифмического графика определили в°, которое составляет 0.0152 мин-1.

2. Кривая выживания клеток Е. сол 1 РО. 37

Кривую выживания определяли отдельно пля ночной культуры и суспензии после подращивания при аэрировании в течение 2 ч. Для НОЧНОЙ КУЛЬТУРЫ КРИВАЯ ВЫЖИВАНИЯ НОСИТ ЭКСПОНЕНЦИАЛЬНЫЙ ХАРАКТЕР при дозах до 630 Гр. Радиочувствительность клеток (D_{0}^{-1}) , ОПРЕДЕЛЯЕМАЯ ПО НАКЛОНУ КРИВОЙ ВЫЖИВАНИЯ В ПОЛУЛОГАРИФМИЧЕСКОМ масштабе (рис.2), составляет 0.0087 Гр⁻¹ (т.е.D.=115 Гр). Для клеток с подращиванием выживания криван сигмоилна и характеризуется экстраполяционным числом (D), равным 3.0 При этом наклон кривой выживания, характеризующий радиочувствительность, Ке меняется. Таким образом, выживаемость клеток (5) после

(2)

3.Рост клеток после облучения

ЧИСЛО ЖИЗНЕСПОСОбНЫХ КЛЕТОК ПОСЛЕ Облучения определяли в разные сроки культивирования в аэрированных условиях на основании их способности к колониеобразованию. Число клеток при дозе D во время t нормировали на число клеток при D.O Гр, t -O мин. Данные по пяти экспериментам представлены в таблице 1. Из Графического представления данных (рис.1-3) видно, что задержки РОСТА КЛЕТОК В ИССЛЕДОВАННОМ ПИАПАЗОНЕ ПОЗ НЕ НАСЛЮПАЛОСЬ. Однако наклон кривых роста уменьшается с увеличением дозы облучения (рис.3). Это явление может быть связано с ПОВЫШЕНИЕМ Эффективности процесса репарации в облучённых клетках при

9



Рис.1. Зависимость количества клеток в культуре (N) от времени инкубации t. Разные кривые соответствуют разным дозам облучения: к=0 Гр, +=35 Гр, Δ=70 Гр, Ф=140 Гр, v=280 Гр.

PMC.2. Кривая BUTTHBAHMA клеток РО 37 при облучении ночной культуры (a) и после попрашивания (6) S -BLINUBACMOCTL. D 1103a облучения, Гр.



Рис.3. Зависимость количества, клеток в культуре, нормированного на первоначальное количество (при t=0 мин) N/N₀, от времени инкубации (t) в полулогарифмическом масштабе. Дозы облучения - как на рис.1. аэрации, которое компенсирует задержку роста клеток при малых дозах. Зависимость величины β:1/Т, от дозы облучения приведена на рис.4, и её можно описать функцией

$$\beta = \beta_0 * \exp(-0.0023 * D),$$
 (3)

где в° =0.0152 мин⁻¹ и в - наклон кривой роста при дозе D.

Если подставить значения β и S в уравнение (1) вместо N_o, то получим значения N(D,t) для разных доз в разные интервалы времени:

$$S(D,t)=(1-(1-e^{-D/D_0})^{+} e^{-D/D_0})^{+} e^{-D/D_0} (\beta_0 \cdot e^{-D/D_0})^{+} (4)$$

Іля вышеприведенных параметров мы получили данные, хорошо соответствующие экспериментальным результатам.

4. Синтез щелочной фосфатазы в интактных клетках РО. 37

На рис.5 представлены экспериментальные данные по активности фосфатазы в суспензии клеток РО 37 в процессе инкубации при 37°С и аэрации. Из рисунка видно, что активность щ. фосфатазы (р) резко возрастает с временем инкубации клеток. Это возрастание может быть описано уравнением

$$p(1) = p_0 \times [exp(\beta_0, 1) - 1],$$
 (5)

где р. :0.068. Это уравнение отражает представление о постоянной конститутивной скорости синтеза щ. фосфатазы в клетках. Из рис.5 видно, что экспериментальные точки хорошо согласуются с кривой, полученной на основании уравнения (5). Возрастание количества белка и щ. фосфатазы идёт строго параллельно.

5. Активность щ. фосфатазы в облучённых клетках

Полученные экспериментальные данные по активности ш. фосфатазы после δ -облучения разными дозами в разное время инкубации в условиях аэрации при 37°С представлены на рис.6. Величина p(D,t)/p(0, t) для малых доз облучения в некоторых случаях выходит за пределы рисунка и поэтому не приведена. Хорошо видно, что эта величина значительно уменьшается с дозой облучения и в процессе инкубирования клеток имеет тенденцию к падению.

Связь роста клеток и активности щ. фосфатазы может быть Хорошо описана с помощью уравнения

4

5





Рис.5. Зависимость экстинкции для щ. фосфатазы р(0,t) - левая шкала (●) или количества белка правая шкала (▽) от времени инкубации интактных клеток Р0.37.



Рис.6. Зависимость величины p(D,t)/p(0,t) от дозы облучения для разных значений t: •:30 мин, Δ:60 мин, D:120 мин. Аналогичная величина для белка: •:120 мин, *:180 мин.

$$S/B_{0} * (\exp(B,t)-1) + (1-S) * t$$

$$9(D,t) = \frac{1}{B_{0} * (\exp(B_{0},t)-1)}$$
(6)

где β:β(D) определяется ур.(3) и S - ур. (2), β.:0.0152 час⁻¹. Первое слагаемое в уравнении (6) определяет активность щ. фосфатазы неповреждённых клеток клеточной суспензии после облучения, а второе слагаемое - активность в повреждённых клетках той же суспензии. Такое уравнение возможно, если допустить, что скорость синтеза щ. фосфатазы в клетках постоянна. Кривые, полученные по уравнению (6), довольно хорошо соответствуют экспериментальным данным. По этой причине принять представление о постоянной скорости синтеза щ. фосфатазы в клетках предпочтительнее, чем альтернативное - о конститутивном уровне этого фермента.

6. Синтез в-галактозидазы в интактных клетках РО. 37

На рис.7 представлены экспериментальные данные по активности В-галактозидазы в суспензии клеток в процессе инкубации при 37°С и при аэрировании. Увеличение активности β-галактозидазы со временем инкубации происходит аналогично увеличению щ. фосфатазы, поэтому может быть описано уравнением (5). Соответствие теоретической кривой с экспериментом означает, что происходит спонтанная индукция SOS-системы, которая даёт постоянный вклад в общий уровень β-галактозидазы. Это важное обстоятельство будет рассмотрено ниже.

7. Зависимость активности β-галактозидазы от дозы облучения и времени инкубации

Полученные экспериментальные данные по активности β -галактозидазы 9(D,t) в клетках, облучённых разными дозами D и инкубированных в течение разного времени t в условиях аэрации, представлены на рис.8. Из экспериментальных данных видно, что активность β -галактозидазы с увеличением дозы облучения возрастает и примерно при дозе 100 Гр выходит на плато.

. Подученные данные могут иметь альтернативную интерпретацию: либо эффективность индукции SOS-системы возрастает, либо растёт число клеток, в которых индуцировалась SOS-система. Очевидно, что, поскольку весьма трудно провести анализ эффективности индукции SOS-системы в отдельной клетке, хотя первое допущение возможно, в наших дальнейших рассуждениях мы будем рассматривать второе допущение и покажем, что экспериментальные данные хорошо описываются с помощью полученного уравнения.

6

7

.







Рис.9. Зависимость фактора индукции (1F) от дозы (D) облучения и времени инкубации ©:30 мин, Δ:60 мин, D:120 мин, к:180 мин (представлены данные, нормированные на фосфатазу и на белок). Пусть выход повреждений, индуцирующих SOS-систему, будет αD . Тогда вероятность того, что в клетке нет ни одного повреждения, будет $\exp(-\alpha D)$ и доля клеток с повреждениями составляет 1-exp(- αD). Зависимость активности β -галактозидазы от дозы и времени g(D,t) увеличивается с дозой пропорционально 1-exp(- αD) и при определённой дозе выходит на плато.

Репарационный процесс в клетке носит случайный характер. Поэтому следует ожидать, что число клеток, синтезирующих β -галактозидазу, будет уменьшаться по экспоненте: exp(-3,t). Суммарный выход фермента за время инкубации будет пропорционален 1-exp(-3t) (интегралу из exp(-3t)). Таким образом, зависимость g(D,t) приобретает следующий вид:

$$g(D,t) = a \times (1-e^{-\alpha \cdot D}) \times (1-e^{-\delta \cdot t}),$$
 (7)

где « - выход повреждений, запускающих SOS, и ? - вероятность их репарации в единицу времени.

Теоретическая зависимость совпадает с точками, полученными в эксперименте, при следующих значениях параметров a:1.783.10 , α : = 0.013 Гр⁻¹ и 8 = 0.0050 мин⁻¹.

На основании изложенного можно определить дозу, при которой в среднем на клетку возникает одно повреждение, индуцирующее SOSсистему в клетке. Эта доза составляет D_o = 77 Гр. По полученным экспериментальным данным выключение SOS-системы происходит в среднем спустя 200 мин.

8.0 пределение фактора индукции

Киллардетом [1] было показано, что способность разных агентов индуцировать SOS-систему определяется относительной величиной (9(D,t).p(0,t)/9(0,t).p(D,t)) при t=2 часа. Эта величина является мерой индукции SOS-системы у Е. соli, и её назвали фактором индукции (IF). Из полученных экспериментальных данных были рассчитаны значения [F при разных] и t, они представлены на рис.9. Значения Г также можно получить на основании уравнений (6) и (7), см. рис.9, гле приведены также теоретические кривые. Совпадение теоретических и экспериментальных величин (F наблюдается при средних и высоких дозах облучения при разных значениях t. В то те время экспериментальная величина [F при малых значениях D и t отличается от теоретической и её наклон несколько меньше.

Следует обратить внимание на то, что активность каждого из

ферментов - фосфатазы и В-галактозидазы - в эксперименте флуктуирует в большей степени, чем величина 1F, полученная в виде их соотношения. Они представляют собой статистически независимые величины.

9.Индуцибельность SOS-системы (SOS!P)

Индуцибельность SOS - системы может быть охарактеризована наклоном кривой (F(D) для разных t. На рисунке 10 представлены значения SOSIP, полученные экспериментально, а также на основе уравнений (6) и (7). При сравнении этих величин обращает на себя внимание тот факт, что чем больше время инкубации клеток (t: :120-180 мин), тем лучше соответствие. Однако при малом времени инкубации наблюдается расхождение. Можно предположить, что это расхождение связано с тем, что дозы облучения 35 и 70 Гр стимулируют синтез фосфатазы и белка. В развитых представлениях это обстоятельство трудно учесть.

ОБСУЖЛЕНИЕ И ВЫВОДЫ

На основании полученных данных можно прийти к выводу о том, что рост клеток РО 37 в LA-среде носит экспоненциальный характер с временем удвоения Т.:46 мин. Чувствительность этих клеток к & облучению не зависит от дополнительного их подращивания в свежей среде и составляет величину D.:115 Гр. После дополнительного подращивания на кривой выживания появляется плечо с экстраполяционным числом, равным 3.

• Из наших экспериментальных данных следует, что синтез как ΦΟC ΦΑΤΑЗЫ, ΤΑΚ И Ο ΜΕΓΟ ΘΕΛΚΑ И Β Ο Ο ΛΥΥΘΗΝΙΧ И Β ИНТАКТНЫХ КЛЕТКАХ ПРОИСХОДИТ ПРИбЛИЗИТЕЛЬНО С ПОСТОЯННОЙ СКОРОСТЬЮ И, следовательно, можно допустить, что их количества примерно коррелируют с числом клеток. Что касается в-галактозицазы, то активность этого фермента в облучённых и интактных клетках резко различается. В облучённых клетках активность в-галактозидазы резко растёт с дозой облучения, в то время как в интактных клетках активность в-галактозицазы также проявляется на незначительном уровне и этот уровень растёт со REPAREMENTER инкубирования суспензии. Последнее обстоятельство свидетельствует в пользу предположения о случайном запуске SOS-CИCTEMЫ, Вероятность которого в единицу времени имеет постоянную величину, если рассчитывать на одну клетку.

«Активность В-галактозидазы резко возрастает при облучении клеток и зависит от дозы облучения и, следовательно, зависит от



Рис.10. Значения SOSIP в зависимости от времени инкубации t. Штриховой линией представлена теоретическая кривая SOSIP(t).



Рис.11. Зависимость фактора индукции IF от дозы (D) и времени (t). Выход на плато в зависимости от дозы меняется с временем t.

10

числа повреждений в клетке, выход которых составляет 0.013 Гр на клетку. Таким образом, при 8-облучении образуются повреждения, являющиеся субстратом для запуска SOS-системы. После репарации этих повреждений SOS-система выключается. Процесс репарации носит случайный характер. Среднее время выключения составляло в наших экспериментах примерно 200 мин.

Величина фактора индукции сложным образом зависит от дозы и от времени инкубации (рис.11): с увеличением времени инкубирования она уменьшается, вместе с тем при малых дозах это уменьшение носит более резкий характер.

Следует обратить внимание на тот факт, что при малом времени инкубирования величина IF более выражена. Можно предположить, что такое отклонение при малом времени инкубации происходит в результате того обстоятельства, что активность фосфатазы зависит только от концентрации клеток, в то время как активность β-галактозидазы зависит в основном от числа повреждений ДНК клеток.

При дальнейшим инкубировании концентрация клеток возрастает, увеличивается и активность фосфатазы, в то же время число повреждений в клетках сохраняется прежним или уменьшается в результате репарации. Следовательно, величина [F зависит лишь от времени инкубирования. Это обстоятельство особенно следует иметь в виду при изучении воздействия на клетки мутагенных веществ, которые оказывают ингибирующее влияние на рост клеток.

Аналогичная картина обнаруживается и при рассмотрении величин отношений g(D)/g(0), которые используются при вычислении IF. 9(0) зависит только от концентрации клеток, в то время как 9(D) зависит в основном от числа повреждений. Поэтому нормировка 9(D)/9(0) нам представляется не вполне приемлемой при больших временах инкубирования клеток, значительно превышающих Т., Корректнее было бы производить нормировку на величину $G:g(t_o).t/t_o$, rue $t_o < T_o$. В наших условиях $T_o:46$ мин, и нам представляется целесообразным использовать 1.:30мин. Таким образом, при инкубировании клеток в течение 2-х ч G составляет 0.026, а в течение 3-х ч - 0.040. Такая нормировка для 3 часового инкубирования увеличивает значение JF в 4 раза, что в лучшей степени отражает индукцию SOS-системы.

ЛИТЕРАТУРА

[1] Quillardet P., Huisman O., D Ari B., Hofnung M., SOS chromotest a direct assay of induction of an SOS function in Escherichia coli K 12 to measure genotoxicity. Proc. Natl. Acad. Sci.USA 79, 1982, pp.5971-5975.

[2] Козубек С., Красавин Е.А., Линь Н., Сошка И., Драшил В., Амиртаев К.Г., Токарова Б., Бонев М. Индукция SOS-системы у клеток E.coli при действии ускоренных тяжелых ионов. P19-87-215, Дубна, 1987.

[3] Lowry O.H., Rozenbrough N.I., Farr A.L., Randall R.G., Determination of the protein in cells J.Biol. 193, 1951, pp.265--275.

> Рукопись поступила в издательский отдел 13 ноября 1987 года.

НЕТ ЛИ ПРОБЕЛОВ В ВАШЕЙ БИБЛИОТЕКЕ?

Вы можете получить по почте перечисленные ниже книги, если они не были заказаны ранее.

| Д7-83-644 | Труды Международной школы-семинара по физике тяжелых ионов. Алушта, 1983. | 6 р.55 к. |
|---------------------|--|----------------|
| Д2,13-83-689 | Труды рабочего совещания по проблемам излучения и детектирования гравитационных волн. Дубна, 1983. | 2 р.00 к. |
| Д13-84-63 | Труды XI Международного симпозиума по ядерной электронике, Братислава, Чехословакия, 1983. | 4 р.50 к. |
| Д2-84-366 | Труды 7 Международного совепания по проблемам квантовой теории поля. Алушта, 1984. | 4 р.30 к. |
| Д1,2-84-599 | Труды VII Международного семинара по проб- лемам физики высоких энергий. Дубна, 1984. | - 5 р.50 к. |
| Д10,11-34-818 | Труды V Международного совещания по проб- лемам математического моделирования, про- граммированию и математическим методам решения физических задач. Дубна, 1983. | 3 р.50 к. |
| Д17-84-850 | Труды III Международного симпозиума по избранным проблемам статистической механики. Дубна,1984./2 тома/ | 7 р.75 к. |
| Д11-85-791 | Труды Международного совещания по аналити- ческим вычислениям на ЭВМ и их применению в теоретической физике. Дубна, 1985. | - 4 р.00 к. |
| Д 13-85- 793 | Труды XII Международного симпозиума по ядерной электронике. Дубна, 1985.• | 4 р.80 к. |
| Д4-85-851 | Труды Международной школы по структуре ядра. Алушта, 1985. | 3 р.75 к. |
| 13,4,17-86-747 | Труды V Международной школы по нейтронной физике. Алушта, 1986. | 4 р.50 к. |
| - | Труды IX Всесоюзного совещания по ускори- телям заряженных частиц. Дубна, 1984. /2 тома/ | 13 р.50 к. |
| Д1,2-86-668 | Труды VIII Международного семинара по проблемам физики высоких энергий. Дубна,1986. /2 тома/ | 7 р.35 к. |
| Д9-87-105 | Труды X Всесоюзного совещания по ускори- телям заряженных частиц. Дубна, 1986. /2 тома/ | 13 р.45 к. |
| Д7-87-68 | Труды Международной школы-семинара по физике тяжелых ионов.Дубна, 1986 | 7 р.10 к. |
| Д2-87-123 | Труды Совещания "Ренормгруппа-86". Лубна, 1986 | 4 р.45 к. |

Заказы на упомянутые книги могут быть направлены по адресу: 101000 Москва, Главпочтамт, п/я 79. Издательский отдел Объединенного института ядерных исследований.

Огиевецкая М.М. и др. Исследование индукции SOS-ответа v Escherichia Coli при у-облучении методом хромотеста

Изучена кинетика SOS-ответа клеток E.coli, индуцированного у-облучением, методом SOS-хромотеста. Получены данные по активности β-галактозидазы и щелочной фосфатазы в разные сроки инкубации клеток РО 37 при разных дозах у-облучения. Делается вывод о том, что вычисление фактора индукции по методу Киллардета является не вполне приемлемым для оценки SOS-индукции.

Работа выполнена в Лаборатории ядерных проблем ОИЯИ.

Сообщение Объединенного института ядерных исследования. Дубна 1987

P19-87-814

The Investigation of SOS-Response of Escherichia Coli after y-Irradiation

by Means of Chromotest

Ogievetskaja M.M. et al.

The kinetics of SOS-response has been investigated in y-irradiated E.coli cells by means of SOS-chromotest. The data on enzymatic activities of B-galactosidase and alkaline phosphatase after incubating the tester strain PQ 37 for various time intervals have been obtained for different doses of y-radiation. The conclusion has been drawn that the induction factor determined according to the method of Quillardet is not always good quantity for the estimation of SOS-response.

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

Communication of the Joint Institute for Nuclear Research, Dubna 1987

P19-87-814