

ОБЪЕДИНЕННЫЙ  
ИНСТИТУТ  
ЯДЕРНЫХ  
ИССЛЕДОВАНИЙ  
ДУБНА

Т 51

P19-88-203

Б.Токарова, К.Г.Амиртаев, Е.А.Красавин,  
С.Козубек

**ВЛИЯНИЕ ПРЕРАДИАЦИОННЫХ  
УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ  
НА ИНДУКЦИЮ МУТАЦИЙ  
У БАКТЕРИЙ *Escherichia coli*  
ПРИ  $\gamma$ -ОБЛУЧЕНИИ**

Направлено в журнал "Радиобиология"

**1988**

Известно, что чувствительность бактерий *E. coli* к  $\gamma$ -облучению широко варьирует в зависимости от условий предрадиационного культивирования <sup>1,2/</sup>. В настоящее время выяснено, что эти различия связаны с разной эффективностью работы медленного, зависящего от среды роста, типа репарации <sup>3/</sup>. Медленная репарация, как известно, полностью определяется активностью генов *rec A* и *lex A* <sup>4/</sup>. Поскольку радиационно-индуцированный мутагенез в свою очередь связан с экспрессией индуцибельной *rec A*-*lex A*-системы <sup>5/</sup>, можно ожидать влияния условий предрадиационного культивирования и на частоту мутирования клеток при  $\gamma$ -облучении. Для проверки этого предположения и была выполнена настоящая работа.

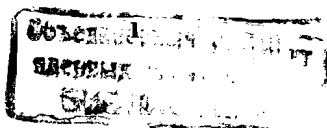
#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали два штамма бактерий *E. coli* K-12 : АВ II57 и *hfr* H . Применяли следующие питательные среды: среду, приготовленную на основе аминокептида - АМП-среда (аминокептид, производства завода медпрепаратов Ленинградского мясокомбината, разбавленный на 2/3 0,15 М раствором NaCl ); мясопептонный бульон (МШБ) и мясопептонный агар (МПА) производства ИЭМ им. Н.Ф.Гамалеи АМН СССР, Москва; среду УКР (1% пептона, 1% дрожжевого экстракта, 1% NaCl ); среду М9 (М9-буфер: 19,7 мл  $MnCl_2$ ; 43,7 мл  $Na_2HPO_4$ ; 23,2 мл  $KH_2PO_4$ ; 1 мл  $MgSO_4$ ; 0,1 мл  $CaCl_2$ ; 9 мл NaCl с добавлением 0,08% глюкозы, 5 мкг/мл тилина и 0,0001% тиамина, и необходимых аминокислот для штамма АВ II57).

Культуру клеток выращивали на разных питательных средах до стационарной фазы роста ( $1-3 \cdot 10^8$  клеток/мл), затем осаждали центрифугированием в течение 10 мин (8000g) и ресуспендировали в М9-буфере.

Облучение приготовленных образцов проводили в стеклянных пробирках при температуре 0°C на установке с  $\gamma$ -источником  $^{137}Cs$  . Мощность дозы облучения составляла 22 Гр/мин.

При изучении мутагенного влияния  $\gamma$ -излучения на клетки применяли методику выявления прямых  $lac^+ \rightarrow lac^-$  мутаций, описанную нами ранее <sup>6/</sup>. Для этого после соответствующего разведения в М9-буфере облученные клетки высевали методом "бутербродного посева" на среду МПА, в который до автоклавирования добавляли 50 мл 2,3,5-трифенилтетразолия, а после автоклавирования 50 мл 20% лак-



Тоя на I и среда. Эксперимент по мутационному действию  $\gamma$ -облучения проводили на клетках штамма Hfr K-12H. Выживаемость облученных клеток определяли путем подсчета колоний после 18-часовой инкубации на среде M1A при 37°C. Полученные результаты подвергли статистической обработке на ЭВМ (уточненный вариант Розенрока). Ошибки относительных величин определяли из наибольшей ошибки любой из составляемых величин, полученных в параллельных экспериментах. Частоту мутирования ( $M^m$ ) нормировали на количество выживающих клеток ( $N$ ). Экспериментально ошибку измерения вычисляли как квадратный корень из количества подсчитанных мутантов.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 1 приведены кривые выживания  $\gamma$ -облученных клеток АВ 1157 и Hfr H при культивировании в предрадикационный период на разных питательных средах. Из представленных материалов видно, что радиочувствительность использованных штаммов сильно варьирует в зависимости от условий предрадикационного культивирования. В наибольшей степени различия в радиочувствительности выявляются у штамма АВ1157

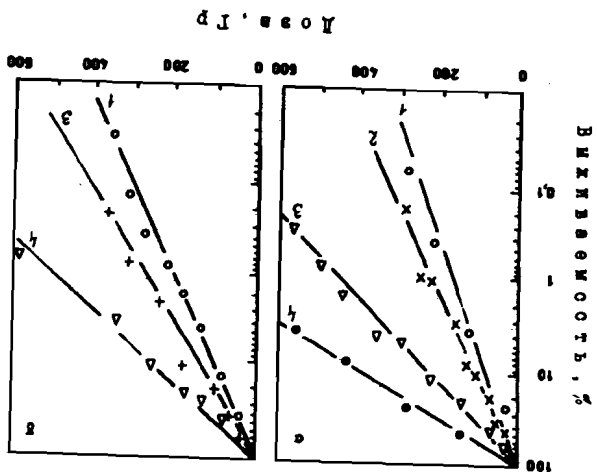


Рис. 1. Кривые выживания  $\gamma$ -облученных клеток E. coli АВ1157 (а) и Hfr H (б), выращенных в предрадикационный период на разных питательных средах. I - среда EM9; 2 - среда YEP; 3 - среда M1B; 4 - среда AMI. По оси ординат - выживаемость, %; по оси абсцисс - доза облучения, Гр.

Таблица. Значение радиочувствительности и параметра K  $\gamma$ -облученных клеток E. coli, культивируемых в предрадикационный период на разных питательных средах

Среда	AB 1157		Hfr H	
	$D_{0.1}^{-1} \cdot 10^{-2}$ Гр <sup>-1</sup>	ФИИ	$D_{0.1}^{-1} \cdot 10^{-2}$ Гр <sup>-1</sup>	ФИИ
AMI	0,63±0,07	4,68±0,16	0,91±0,06	2,34±0,17
M1B	-	-	1,72±0,08	1,24±0,19
YEP	2,09±0,13	1,41±0,32	-	-
EM9	2,95±0,19	-	2,13±0,11	-

$$K = \frac{16 (M^m/N)}{16 D}$$

$$\text{ФИИ} = \frac{D_{0.1}^{-1} \text{ среда EM9}}{D_{0.1}^{-1} \text{ другие среды}}$$

Более чувствительны к облучению клетки, выращенные на среде EM9, менее - на среде АМІ. Промежуточное положение в радиочувствительности занимают клетки, культивировавшиеся до облучения на среде УЭР. Величины средних летальных доз ( $D_0$ ) при выращивании клеток на среде EM9 и АМІ-среде соответственно составляют  $33,9 \pm 8,2$  Гр и  $158,7 \pm 17,4$  Гр, то есть различаются примерно в 5 раз (табл.). Сходную картину можно наблюдать и для штамма Hfr H. В этом случае также наименее радиочувствительными являются клетки, выращенные на среде АМІ. Величина  $D_0$  для них равна  $109 \pm 6,5$  Гр. Клетки, культивировавшиеся на среде МПБ, оказываются более радиочувствительными ( $D_0 = 58 \pm 2,7$  Гр). Наиболее чувствительными к  $\gamma$ -облучению являются клетки, выращенные на среде EM9 ( $D_0 = 46,8 \pm 2,4$  Гр). Величины фактора изменения дозы (ФИД) для клеток, выращенных на средах АМІ и МПБ, составляют, соответственно,  $2,34 \pm 0,17$  и  $1,24 \pm 0,19$ .

На рис.2 представлена зависимость частоты мутирования клеток Hfr H, выращенных на разных питательных средах, от дозы  $\gamma$ -облучения. Как видно из приведенных материалов, при культивировании клеток в предрадиационный период в среде МПБ выявляется зависимость  $\lg N_m/N = f(\lg D)$  близкая к квадратичной. Величина параметра K, как видно из таблицы, составляет 2,14. В экспериментах с клетками, выращенными на среде АМІ, наблюдается иной тип зависимости мутагенеза от дозы облучения. Из рис.2 видно, что кривая  $\lg N_m/N = f(\lg D)$  в диапазоне доз до 400 Гр близка к линейной, и величина K составляет 1,1. При дозах, превышающих 400 Гр, наблюдается некоторое отклонение кривой мутагенеза от линейной в сторону степенной зависимости. Аналогичные этим результаты получены и в опытах с культурой клеток, выращенной на среде EM9.

Таким образом, из представленных материалов следует, что условия предрадиационного культивирования влияют не только на радиочувствительность бактерий, но и на характер зависимости мутабельности клеток от дозы  $\gamma$ -облучения. В этой связи четко проявляются два обстоятельства. Во-первых, в условиях богатой среды роста культура приобретает большую радиорезистентность. Во-вторых, изменяется характер дозовой кривой мутагенеза: из степенной, близкой к квадратичной, зависимости, наблюдаемой для более радиочувствительной культуры, кривая мутагенеза в диапазоне доз до 400 Гр трансформируется в зависимость, близкую к линейной. Такая трансформация происходит за счет возрастания частоты мутирования радиорезистентной культуры в области малых доз облучения. При дозах, превышающих 400 Гр, вновь отмечается тенденция к квадратичной зависимости мутагенеза от дозы облучения.

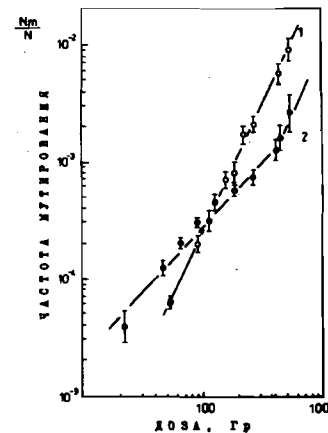


Рис.2. Зависимость частоты мутирования клеток *E. coli* Hfr H, выращенных в предрадиационный период на разных питательных средах при  $\gamma$ -облучении. 1 - среда МПБ; 2 - среда АМІ. По оси ординат - частота мутирования; по оси абсцисс - доза облучения, Гр.

Известно, что в основе механизмов, определяющих различия в радиочувствительности клеток, культивируемых на разных питательных средах, лежат процессы, направленные на репарацию радиационных повреждений ДНК. Летальными для клеток дикого типа повреждениями являются двунитевые разрывы (ДР) ДНК, которые при  $\gamma$ -облучении имеют преимущественно энзиматическую природу<sup>3,7/</sup>. Выход энзиматических ДР (ЭДР) ДНК определяется медленным *rec A-lex A* зависимым типом репарации и обусловлен эффективностью экспрессии генов, контролирующих синтез *Rec A* белка. Установлено, что *Rec A* белок, связываясь с одностранными разрывами (ОР) ДНК, препятствует обширной деградации нитей экзонуклеазой  $\nu$ , предотвращая возможное перекрытие брешей в комплементарных участках ДНК<sup>3/</sup>. Поскольку в условиях богатой среды роста, по сравнению с бедной, экспрессия генов, контролирующих синтез *Rec A* белка, более выражена<sup>8/</sup>, то и выход ЭДР ДНК понижен. Вследствие этого резистентность клеток к  $\gamma$ -облучению выше. С учетом вышеизложенного обстоятельства возрастание частоты мутирования в области малых доз облучения у радиорезистентных культур можно объяснить повышенной экспрессией генов, участвующих в реализации мутагенной ветви индуцибельной SOS-системы клеток. Как известно, ключевую роль в ней играют гены *rec A* и *lex A*<sup>4/</sup>. Действительно, у суперрезистентного *Gam<sup>r</sup>444*-мутанта (изогенного с диким типом АВ II57), у которого в основе повышенной резистентности к  $\gamma$ -облучению лежат процессы, связанные с более эффективной экспрессией *rec A-lex A*-системы<sup>9/</sup>, также наблюдается линейная зависимость  $\lg N_m/N = f(\lg D)$ , учитываемая по выходу прямых и обратных мутаций<sup>10/</sup>. В отличие от *Gam<sup>r</sup>444*-мутанта, у клеток дикого типа с нормальным выражением *rec A-lex A*

зависимых функций выявляется квадратичный характер мутагенеза при  $\gamma$ -облучении<sup>/10/</sup>. Повышенная частота мутирования на начальном участке зависимости  $n_{\text{м}}/n(D)$  отмечена и у мутанта *tif-1* при  $\gamma$ -облучении в случае предварительной индукции SOS-системы тепловой обработкой<sup>/11/</sup>. Учитывая изложенное выше, можно полагать, что более высокая мутабельность при малых дозах облучения клеток, выращенных в предрадикационный период в богатых средах по сравнению с бедными, обусловлена "предуготовленностью" *rec A-lex A*-зависимой SOS-репарации к ответу на радиационное воздействие. Об этом же свидетельствуют данные по индукции  $\gamma$ -облучением профага  $\lambda$  у клеток *E. coli*, выращиваемых до облучения в богатых и бедных средах<sup>/12/</sup>. Зависимость индуцибельности (I) профага от дозы облучения у клеток, культивировавшихся в АМП-среде, в 2 раза выше, чем в среде ЕМ9.

Анализ данных, представленных на рис.2, а также результаты, полученные на суперрезистентном мутанте *Gam<sup>r</sup>444*<sup>/10/</sup>, свидетельствуют о меньшей частоте мутирования в области больших доз облучения у радиорезистентных клеток. Это обстоятельство может указывать на менее эффективную работу в определенном диапазоне доз облучения мутагенной ветви SOS-системы у резистентных к облучению клеток по сравнению с чувствительными. В связи с этим следует обратить внимание на результаты исследований индукции профага  $\lambda$  у клеток *E. coli*, выращенных в разных предрадикационных условиях<sup>/12/</sup>. Показано, что максимум зависимости I(D) у клеток, выращенных в АМП-среде, реализуется при дозе около 600 Гр, а в бедной ЕМ9-среде - при ~400 Гр, и высота максимума в первом случае существенно выше. Подобный характер кривых указывает на более эффективную экспрессию *rec A-lex A*-системы в условиях богатой среды и одинаково выраженную тенденцию к снижению индуцибельных SOS-функций с ростом дозы облучения. Характер этих кривых, по-видимому, может объясняться следующим. Поскольку *Rec A*-белок способен кооперативно связываться с ОР ДНК, а также приобретать в определенных условиях протеолитическую конформацию, приводящую к дерепрессии ряда индуцибельных оперонов, можно предположить, что "приоритеты" осуществления указанных функций различны при разных дозах облучения. Если на индуцируемый излучением мутационный процесс влияют две или более различных каталитических активностей *Rec A*-белка, то в зависимости от относительного превалирования отдельных его функций над другими можно ожидать либо относительное возрастание, либо снижение частоты мутирования. В условиях богатой среды роста культуры при малых дозах облучения, а следовательно, при малом количестве в среднем на геном повреждений ДНК, значи-

тельная часть конститутивного *Rec A*-белка, по-видимому, может осуществлять протеазную активность, а значит, и реализовывать дерепрессию индуцибельных оперонов, участвующих в SOS-ответе. Нельзя исключить того обстоятельства, что при больших дозах облучения *Rec A*-белок прежде всего осуществляет кооперативное связывание с ОР ДНК. Это, возможно, будет приводить к снижению экспрессии некоторых индуцибельных генов, участвующих в репарационном мутагенезе (в полной мере это может относиться к гену *umu C*), а следовательно, и уменьшению частоты мутирования. При дальнейшем возрастании дозы облучения, как отмечалось выше, наблюдается тенденция к трансформации линейной зависимости в квадратичную, которая свойственна для культуры, выращенной в МПБ-среде.

Таким образом, полученные нами материалы свидетельствуют о влиянии условий предрадикационного культивирования на характер зависимости частоты мутирования клеток от дозы  $\gamma$ -облучения. Это влияние, по всей видимости, обусловлено различиями в эффективности SOS-реакций клеток, выращиваемых на разных питательных средах. В заключение заметим, что в работе<sup>/13/</sup>, где изучался индуцируемый  $\gamma$ -излучением мутагенез у клеток *E. coli* при разных скоростях роста культуры (а следовательно, и при различном среднем числе эквивалентов генома на клетку), различия в частоте мутирования медленно и быстро растущих культур не было выявлено. Поскольку в работе не приведены данные о радиочувствительности клеток, сопоставить эти данные с результатами наших исследований не представляется возможным.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Кестяников В.Д. Восстановление и радиорезистентность клеток. Л. Наука, 1968.
2. Мясник М.Н. Генетический контроль радиочувствительности. М.Атомиздат, 1973.
3. Krasin F., Hutchinson F. J. Mol. Biol. 1977, v.116, N.1, p. 81-98.
4. Кестяников В.Д. Репарация ДНК и ее биологическое значение. Л.Наука, 1979.
5. Witkin E. Bacteriol. Rev. 1976, v.40, N.4, p. 869-907.
6. Токарова Б., Амиртаев К.Г., Красавин Е.А., Козубек С. ОИЯИ, 19-87-813, Дубна, 1987.
7. Козубек С., Красавин Е.А., Радиобиология, 1984, т.24, №4, с. 462-467.

8. Krasin F., Hutchinson F. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1981, v.78, N.6, p. 3450-3451.
9. Бреслер С.Е., Вербенко В.Н., Калинин В.Л. Генетика, 1984, т.20, №5, с.746.
10. Бреслер С.Е., Вербенко В.Н., Калинин В.Л. Генетика, 1985, т.21, №3, с. 384-390.
11. Bridges B.A. Mol. Gen. Genet. 1977, v.151, N.1, p. 115.
12. Бонев М.Н. ОИЯИ, 19-88-81, Дубна, 1988.
13. Bridges B.A., Mottershead R.P. Mut. Res. 1971, v.13, p. 1-8.

Рукопись поступила в издательский отдел  
28 марта 1988 года.

Токарова Б. и др. P19-88-203  
Влияние предрадиационных условий культивирования  
на индукцию мутаций у бактерий *Escherichia coli*  
при  $\gamma$ -облучении

Изучено влияние предрадиационных условий культивирования на выживаемость и частоту мутирования бактерий *E.coli* AB 1157 и Hfr H при  $\gamma$ -облучении. Показано, что радиочувствительность клеток и мутагенез варьируют в зависимости от среды роста. Эти различия связываются с разной эффективностью экспрессии генов, контролирующих индуцибельную SOS-реакцию клеток.

Работа выполнена в Лаборатории ядерных проблем ОИЯИ.

Препринт Объединенного института ядерных исследований. Дубна 1988

Перевод авторов

Tokarova B. et al. P19-88-203  
Influence of Pre-Radiation Cultivation  
Conditions on Induction of Mutation  
in  $\gamma$ -Irradiated Bacteriae *Escherichia Coli*

Influence of pre-radiation cultivation conditions on survival and mutation frequency of  $\gamma$ -irradiated bacteriae *E.coli* AB 1157 and Hfr H has been studied. The radiation sensitivity of cells and mutagenesis are shown to depend on the cultivation medium. The variations are considered to be due to different expression efficiency of genes controlling the inductive SOS reaction of the cells.

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

Preprint of the Joint Institute for Nuclear Research. Dubna 1988