

А. С. САЕНКО, Б. И. СЫНЗЫНЫС, Г. Б. СМЕРНОВ

**НАРУШЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ ВЫСОКОПОЛИМЕРНОЙ ДНК
В КЛЕТКАХ ДВОЙНОГО МУТАНТА *ESCHERICHIA COLI*
polA⁻ — *uvrE*⁻**

(Представлено академиком В. Д. Тимаковым 23 VII 1973)

В последние годы получены сведения о том, что бактериальные ферменты, участвующие в восстановлении ДНК от повреждений, вызванных действием различных физических и химических агентов, являются необходимыми и для поддержания жизнеспособности интактных клеток. Наиболее убедительными в этом отношении являются исследования, в которых показано, что клетки *E. coli*, имеющие одновременно мутации в двух генах, ответственных за некоторые этапы темновой репарации ДНК, нежизнеспособны. Такие данные получены в отношении двойных мутантов *E. coli polA*⁻ *recA*⁻, *polA*⁻ *recB*⁻ (^{1, 2}). Совсем недавно появились сведения, что нежизнеспособными являются также клетки двойного мутанта *E. coli polA*⁻ *uvrB*⁻ (³). Молекулярные механизмы, приводящие клетки перечисленных двойных мутантов к гибели, до настоящего времени остаются неизвестными.

В наших предыдущих исследованиях (⁴) было показано, что клетки мутанта *E. coli polA*⁻, не имеющие активной ДНК-полимеразы I (полимеразы Корнберга), утрачивают жизнеспособность при введении в их геном мутантного *uvrE* (*uvr502*) гена. Клетки штамма с мутацией в *uvrE* гене характеризуются высокой чувствительностью к у.-ф. облучению (⁵), что, по всей вероятности, связано с дефектом в системе репарационной репликации (⁶) и повышенным уровнем спонтанного и индуцированного мутагенеза (⁷). Для выяснения возможных причин нежизнеспособности *polA*⁻ *uvrE*⁻ клеток был сконструирован мутант *E. coli polA12 uvrE*⁻, обладающий температурочувствительной ДНК-полимеразой I, которая неактивна при температуре $t \geq 42^\circ$. Клетки этого мутанта гибнут при инкубации на питательных средах при 42° , но сохраняют жизнеспособность и размножаются при 30° (⁴). Проведенные исследования показали, что клетки этого условнолетального штамма при 45° синтезируют белок, ДНК и наращивают клеточную массу в той же мере, что и одиночные *uvrE*⁻ или *polA*⁻ штаммы. ДНК, синтезированная в *polA12 uvrE*⁻ клетках при 30° , в течение 2 час. последующей инкубации клеток при 45° не распадается и в ней не появляются однотяжевые разрывы. Таким образом, изучение валового синтеза макромолекул (по включению предшественников в кислотонерастворимую фракцию) и структуры родительской ДНК не выявило различий в этих параметрах в клетках двойного и одиночных мутантов. Поэтому гибель *polA12 uvrE*⁻ клеток при 42° , вероятно, связана с нарушением каких-то других процессов. Полученные ранее сведения дали основание предположить, что в процессе образования высокополимерной ДНК из синтезированных при репликации однотяжевых фрагментов принимает участие и ДНК-полимераза I, и продукт *uvrE* гена (⁴). Поэтому вполне вероятно, что в клетках двойного мутанта в непермиссивных условиях нарушается процесс воссоединения вновь синтезированных фрагментов ДНК. Проверке этого предположения и посвящена настоящая работа.

Эксперименты проводили на клетках изогенных штаммов *E. coli* K12: K60 *pol*⁺ *uvr*⁺, K59 *pol*⁺ *uvrE*⁻, K67 *polA12uvr*⁺ и K68 *polA12uvrE*⁻, подроб-

ная характеристика которых была приведена ранее (4). Бактерии выращивали при 30° на 0,1 M трис-HCl буфере, pH 7,0, содержащем 0,2% глюкозы, 1% триптона (Difco) и 20 мкг/мл тимидина. Культуры в логарифмической фазе роста ($\sim 5 \cdot 10^7$ кл/мл) переносили в водяную баню с $t=45^\circ$ и через 5 мин. инкубации добавляли H^3 -тимидин до конечной активности 100 мС на 1 мл суспензии (уд. активность 4,1 С/ммоль). Через 10 мин. для

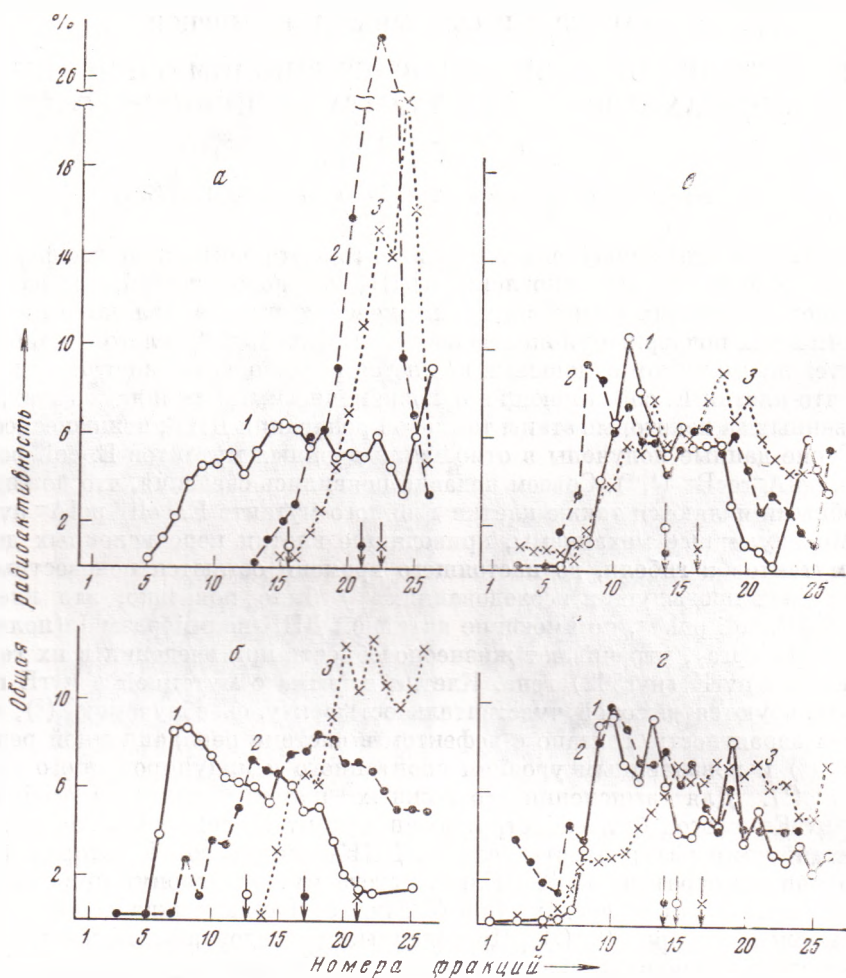


Рис. 1. Седиментограммы ДНК в щелочном 5–20% растворе сахарозы: а – ДНК, синтезированная в период инкубации бактерий с H^3 -тимидином при 45°; б, в, г – та же ДНК, но соответственно 20, 40 и 80 мин. дополнительной инкубации клеток при 45° после разведения меченого предшественника. 1 – ДНК клеток *E. coli* $polA^+ uvr^+$, 2 – ДНК клеток *E. coli* $polA12 uvr^+$, 3 – ДНК клеток *E. coli* $polA12 uvrE^-$. Стрелками указано положение первого момента седиментационного распределения ДНК. Седиментограммы ДНК клеток *E. coli* $polA^+ uvrE^-$ не приведены, поскольку они не отличаются от седиментограмм ДНК клеток дикого типа

прекращения дальнейшего включения H^3 -тимидина во вновь синтезируемую ДНК в культуры добавляли подогретый до 45° 1% раствор немеченого тимидина до конечной концентрации 500 мкг/мл и суспензии продолжали инкубировать при 45° в течение еще 80 мин. В различные сроки после разведения меченого предшественника отбирали пробы и определяли м.в. H^3 -ДНК (т. е. ДНК, синтезированной в течение 10-минутной инкубации с неразбавленным H^3 -тимидином) с помощью ультрацентрифугирования в щелочных градиентах сахарозы по методу Мак Граса и Вильямса (8).

Подробности методики определения м.в. ДНК описаны нами ранее (⁹). Седиментационное распределение меченой ДНК характеризовали путем подсчета первого момента седиментограмм (¹⁰).

Как следует из полученных результатов (рис. 1), образование высокополимерной ДНК в клетках *E. coli* *polA12* и *polA12* *uvrE*⁻ резко подавлено. Среднечисленный м.в. ДНК, синтезированной во время 10 мин. инкубации с неразбавленным Н³-тимидином в клетках, несущих *polA12* мутацию, гораздо ниже среднечисленного м.в. вновь синтезированной ДНК в клетках дикого типа и *uvrE*⁻ мутанта (рис. 1а). Однако, если при дальнейшей инкубации м.в. Н³-ДНК в клетках *polA12* мутанта довольно быстро увеличивается и через 40 мин. инкубации при 45° практически не отличим от мол. веса ДНК клеток дикого типа, то увеличение мол. веса ДНК в клетках двойного мутанта происходит с гораздо более низкой скоростью (рис. 1б, в). Даже за 80 мин. инкубации после «импульсного» промечивания среднечисленный м.в. Н³-ДНК в *polA12* *uvrE*⁻ клетках не достигает такового Н³-ДНК в клетках других штаммов (рис. 1г). Интересно отметить, что синтезированная при 45° ДНК в клетках двойного мутанта почти не содержит класса очень высокополимерных молекул (седиментирующих в наших условиях в 7–12 фракцию градиента), в то время как в ДНК остальных штаммов такие высокополимерные молекулы составляют значительную часть популяции молекул ДНК. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о резком нарушении процесса образования высокомолекулярной ДНК в мутантных *polA*⁻ *uvrE*⁻ клетках. В свою очередь это говорит о том, что процесс интеграции фрагментов ДНК при ее репликации в бактериальных клетках находится под генетическим контролем и требует функционирования ДНК-полимеразы I и (или) продукта гена *uvrE*. Вполне вероятно, что неполноценное воссоединение низкомолекулярных фрагментов ДНК является причиной нежизнеспособности клеток *E. coli* *polA12* *uvrE*⁻. Один из возможных механизмов гибели клеток двойного мутанта при 45°, являющийся результатом неполноценного образования высокополимерной ДНК, состоит в следующем. В ходе первого деления дочерним клеткам будут передаваться хромосомы, содержащие односторонние разрывы в дочерних телях ДНК, которые остаются вследствие незавершенности интеграции фрагментов. Последующее функционирование ДНК (репликация, транскрипция) может привести к образованию в ней двусторонних разрывов, которые, как принято считать, являются летальными событиями для клеток *E. coli*.

Научно-исследовательский институт
медицинской радиологии
Академии медицинских наук СССР
Обнинск Калужской обл

Поступило
19 VII 1973

Институт эпидемиологии и микробиологии
им. Н. Ф. Гамалеи
Академии медицинских наук
Москва

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ J. D. Gross, J. Grunstein, E. M. Witkin, J. Molec. Biol., 58, 631 (1971).
² M. Monk, J. Kinross, J. Bacteriol., 109, 971 (1972). ³ H. Shizuya, D. Dykhuizen, J. Bacteriol., 112, 676 (1972). ⁴ G. B. Smirnov, E. V. Filkova et al., Mol. Gen. Genet., 121, 139 (1973). ⁵ P. van de Putte, C. A. Sluis et al., Mutation Res., 2, 97 (1965). ⁶ B. I. Sinzins, G. B. Smirnov, A. S. Saenko, Biochem. Biophys. Res. Commun., 53, 309 (1973). ⁷ Г. Б. Смирнов, А. Г. Скавронская, Генетика, 4, 105 (1968). ⁸ R. A. McGrath, R. W. Williams, Nature, 212, 534 (1966). ⁹ А. С. Саенко, Б. И. Сыныныс, Г. Б. Смирнов, Мол. биол., 6, 655 (1972). ¹⁰ H. S. Kaplan, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 55, 1442 (1966).