

М. П. СВЕТЛОВА, Н. В. ТОМИЛИН, В. Д. ЖЕСТЯНИКОВ

ПОСТРЕПЛИКАТИВНАЯ РЕПАРАЦИЯ ДНК
В КЛЕТКАХ У.-Ф.-ЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ ШТАММОВ
ESCHERICHIA COLI B

(Представлено академиком Е. М. Крепом 12 II 1974)

Штамм *E. coli* $V_{s-1}\gamma R$, полученный из радиочувствительного мутанта *E. coli* V_{s-1} в условиях непрерывного γ -облучения, отличается высокой устойчивостью к редкоионизирующим излучениям и в меньшей мере — к у.-ф. свету (1). Фактор, определяющий устойчивость к у.-ф. облучению клеток $V_{s-1}\gamma R$ неизвестен. Ранее было показано, что клетки *E. coli* $V_{s-1}\gamma R$, как и

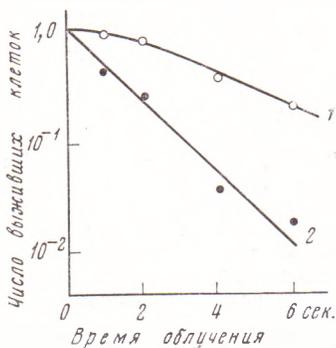


Рис. 1. Выживаемость штаммов $V_{s-1}\gamma Rth\bar{u}$ (1) и $V_{s-1}th\bar{u}$ (2) при действии у.-ф. облучения. Мощность дозы 1,8 эрг/мм²·сек

V_{s-1} , не способны восстанавливать у.-ф.-облученный фаг T_1 (1) и выщеплять из ДНК димеры пиримидиновых оснований (2, 3), т. е. сохраняют мутантный ген *uvrB*. В клетках *E. coli*, помимо репарационного пути выщепления — замещения, контролируемого генами *uvr*, происходит репарация односторонних пробелов ДНК, возникающих напротив димеров в дочерних нитях при репликации (4, 5). Возможно, что частичное восстановление у.-ф.-резистентности в *E. coli* $V_{s-1}\gamma R$ связано с повышением эффективности пострепликативной репарации пробелов, неполноценной в V_{s-1} (5). В настоящей работе приводятся данные о том, что действительно в клетках *E. coli* $V_{s-1}\gamma R$ пострепликативная репарация протекает более эффективно, чем в V_{s-1} .

Работа проведена на штаммах $V_{s-1}th\bar{u}$ и $V_{s-1}\gamma Rth\bar{u}$. Штамм $V_{s-1}th\bar{u}$ любезно предоставлен

доктором Д. Фрейфельдером (США), а штамм $V_{s-1}\gamma Rth\bar{u}$ получен из штамма $V_{s-1}\gamma R$ С. В. Каменевой. Бактерии, выращенные на косом питательном агаре в течение 18 час., вносили в ростовую среду М9 с глюкозой (4 мг/мл), казаминовыми кислотами (2 мг/мл) и тимидином (10 мкг/мл). Клетки выращивали при 37° с аэрацией в течение 2,5–3 час. Клеточную суспензию в М9 облучали в чашке Петри при встряхивании под лампой БУВ-60 (мощность дозы 1,8 эрг/мм²·сек). Мощность дозы была измерена химической дозиметрией с лейкоцианидом малахитового зеленого (6). Облученные бактерии метились Н³-тимидином (50 мкС на 1 мл среды) в течение 10 мин. и после отмывания метки инкубировались 70–140 мин. в ростовой среде, содержащей уменьшенное количество тимидина (4 мкг/мл). Показателем репарации служило увеличение молекулярного веса ДНК, который оценивался с помощью метода ультрацентрифугирования в щелочном изокинетическом градиенте сахарозы (7) с начальной концентрацией сахарозы 5% в 0,9 М NaCl — 0,1 М NaOH — 0,01 М ЭДТА. Клеточную суспензию (10⁶ клеток в 0,1 мл М9) наносили на вершину 4,7 мл градиента, куда предварительно наслаивали 0,1 мл 0,5% саркозила на 0,5 N NaOH, выдерживали 20 мин. и центрифугировали 85 мин в центрифуге «Spinko-L2» при 33 000 об/мин и 20° в роторе SW-50L. Градиенты раскапывали через

равные временные интервалы на бумажные фильтры (17 фракций), которые после высушивания отмывались 5% трихлоруксусной кислотой и спиртом. Расчет молекулярного веса фракций производился по Штудьеру (8), среднечисленный молекулярный вес ДНК определяли по Чарльсби (9). Выживаемость бактерий исследовали, пользуясь общепринятой методикой (1).

Дозные кривые выживаемости клеток *E. coli* V_{s-1} и $V_{s-1}\gamma R$ приведены на рис. 1. Согласно данным, полученным ранее (1), бестиминовые варианты

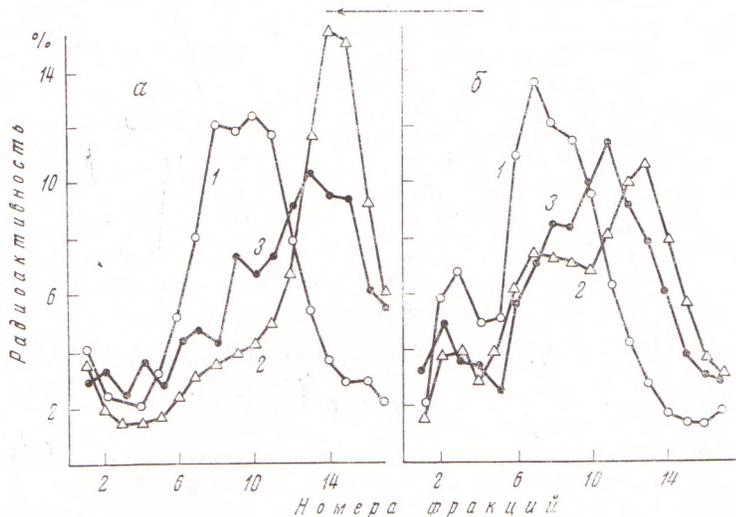


Рис. 2. Седиментация ДНК штамма V_{s-1} в щелочном градиенте сахарозы. Стрелкой указано направление седиментации. 1 — контрольная ДНК; 2 — ДНК, облученная в дозе 60 эрг/мм² (а) и 20 эрг/мм² (б); 3 — ДНК, инкубированная 70 мин. при 37° после облучения

этих штаммов имеют аналогичные различия в у.-ф.-чувствительности: фактор изменения дозы на уровне ЛД₅₀ равен 3. На рис. 2 и 3 показаны профили седиментации ДНК у.-ф.-облученных клеток *E. coli* V_{s-1} и $V_{s-1}\gamma R$. Видно, что в у.-ф.-облученных клетках ДНК имеет меньший молекулярный вес, чем в контроле. Облучение в дозе 1 эрг/мм² при длине волны 2537 Å приводит к образованию 6 пиримидиновых димеров в геноме из 10⁷ нуклеотидов (4), что соответствует среднему расстоянию между димерами 27,5·10⁶ дальтон после 20 эрг/мм² и 9,2·10⁶ дальтон после 60 эрг/мм². В табл. 1 приведены усредненные данные M_n , полученные из 4–5 опытов. Сразу после облучения в дозе 60 эрг/мм² средний размер фрагментов в обоих штаммах (6,8 и 8,6·10⁶ дальтон) хорошо соответствует среднему расстоянию между димерами. После у.-ф. облучения в дозе 20 эрг/мм² (рис. 2 и 3б) выявляется отчетливая бимодальность распределения импульсно меченой ДНК в сахарозном градиенте, намечавшаяся и после 60 эрг/мм² (рис. 2 и 3а): значительная часть Н³-метки седиментирует как в необлученном, контрольном варианте, причем второй пик более низкомолекулярной ДНК имеет $M_n=25,8\cdot 10^6$ дальтон (штамм V_{s-1}) и $M_n=23,8\cdot 10^6$ дальтон (штамм $V_{s-1}\gamma R$) — усредненные данные, что согласуется со средним расстоянием между димерами при этой дозе (в табл. 1 приведены завышенные данные по всему распределению). Бимодальность может быть связана с быстрым воссоединением пробелов в одной из двух частей гетерогенной популяции или с тем, что в этой части популяции сразу после облучения реплицируются лишь те участки ДНК, которые содержат очень мало димеров. В настоящее время мы не имеем данных в пользу одной из этих двух возможностей.

Сравнение профилей седиментации ДНК клеток, которые выдерживались 70 мин. в ростовой среде после облучения в дозе 20 эрг/мм², показало, что у мутанта $V_{s-1}\gamma R$ молекулярный вес ДНК приближается к контрольному, тогда как в *E. coli* V_{s-1} , по сравнению с $V_{s-1}\gamma R$, более 30% пробелов остаются нерепарированными (табл. 1). 70-минутная инкубация после облучения в дозе 60 эрг/мм² также приводит к более существенному восста-

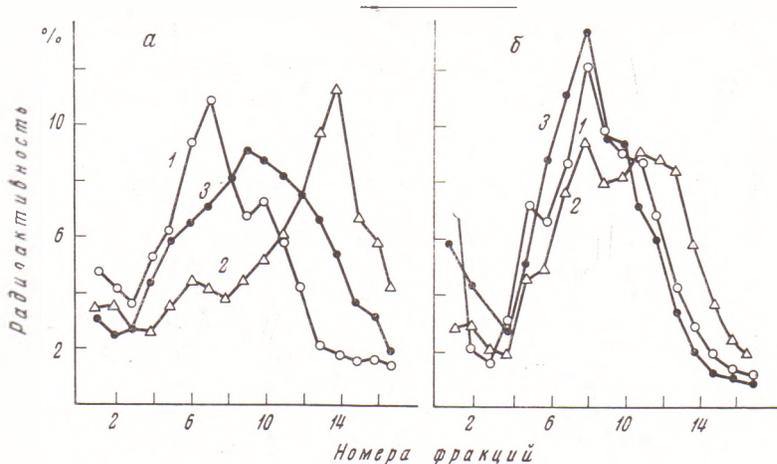


Рис. 3. Седиментация ДНК штамма $V_{s-1}\gamma R$ в щелочном градиенте сахарозы. Обозначения те же, что на рис. 2

новлению ДНК в клетках $V_{s-1}\gamma R$, чем V_{s-1} , у которых репарируется на 24,2% меньше пробелов. Полученные результаты несколько расходятся с данными Смита (³), обнаружившего у штамма V_{s-1} более эффективную репарацию пробелов при дозе 30 эрг/мм².

При удлинении периода пострадикационной инкубации до 140 мин. существенных сдвигов молекулярного веса ДНК обнаружить не удастся. По-видимому, основная часть пробелов в той части ДНК, которая реплициру-

Таблица 1

Пострепликативная репарация ДНК штаммов V_{s-1} и $V_{s-1}\gamma R$ после у.-ф. облучения (дальтоны)

Доза у.-ф.	V_{s-1}			$V_{s-1}\gamma R$		
	доля репарированных пробелов через 70 мин., %	$M_n \cdot 10^{-6}$ через 70 мин. после облучения	$M_n \cdot 10^{-6}$ сразу после облучения	доля репарированных пробелов через 70 мин., %	$M_n \cdot 10^{-6}$ через 70 мин. после облучения	$M_n \cdot 10^{-6}$ сразу после облучения
20 эрг/мм ²	59,0	46,5 ± 1,4	37,5 ± 1,5	91,4	74,1 ± 4,3	42,4 ± 2,6
60 эрг/мм ²	65,2	22,1 ± 2,2	6,8 ± 0,4	89,4	46,4 ± 1,7	8,6 ± 0,6

Примечание. Среднечисленный молекулярный вес контрольной ДНК (M_{nk}) составляет $88,6 \pm 2,5 \cdot 10^6$ дальтон; число пробелов на $88,6 \cdot 10^6$ дальтон рассчитывали по формуле $n = \frac{M_{nk}}{M_n} - 1$; исходное число пробелов соответствовало M_n , равному среднему расстоянию между димерами ($9,2$ и $27,5 \cdot 10^6$ дальтон соответственно для 60 и 20 эрг/мм²).

ется в течение 10 мин. после облучения, репарируется на протяжении одного часа. По данным Гейнсана и Смита (¹⁰), процесс полного восстановления генома бактериальной клетки с генотипом uvr^- занимает 5–6 час. В настоящее время хорошо известно, что уровень устойчивости клеток бактерий к излучениям находится под генетическим контролем. Поэтому увеличение репараторных возможностей мутанта $V_{s-1}\gamma R$ по сравнению с ро-

дательским штаммом может быть связано с мутацией γ -резистентности. Радиочувствительность штамма V_{s-1} определяется мутациями в локусах *uvrB*, *exrA*, *lon* (¹¹). Мутант $V_{s-1}\gamma R$ сохраняет фенотип Uvr^- (²). Исследование мутагенеза, индуцированного излучениями и радиомиметиками, показало, что мутант $V_{s-1}\gamma R$ может быть отнесен к мутантам Exr^- (¹²). Прямое доказательство отсутствия супрессии или реверсии мутаций *uvr* и *exr* дал генетический анализ, который подтвердил, что генетический детерминант, контролирующий радиорезистентность мутанта $V_{s-1}\gamma R$, не является аллелью локуса *exrA* (¹³), но тесно сцеплен с локусом *sul*, супрессирующим признак *Lon*. Мутация γ -резистентности штамма $V_{s-1}\gamma R$ влияет на филаментообразование после у.-ф. облучения (укорочение филаментов у части клеток), а также после γ -облучения (уменьшение числа филаментов). Эти данные позволяют предполагать, что ген *lon*, так же как и ген *hesA* (⁵), участвует в регуляции пострепликативной репарации. По-видимому, благодаря супрессии гена *lon* у мутанта $V_{s-1}\gamma R$ увеличивается выживаемость после у.-ф. облучения и повышается эффективность пострепликативной репарации.

Недавно проведенные исследования показали, что признак радиочувствительности и гиперпродукции капсулярного полисахарида в *lon* (*capR*)-мутантах *E. coli* обусловлен дефектом в одном и том же цистроне (¹⁴). С другой стороны, имеются данные о том, что ген, имеющий отношение к пострепликативной репарации в *E. coli*, — *hesA* участвует в координации репликации ДНК и клеточного деления (¹⁵). Не исключено, что регуляция пострепликативной репарации связана с некоторой субклеточной структурой, локализованной в клеточной оболочке, компонентами которой являются продукты генов *hesA* и *lon*.

Полученные в настоящей работе результаты свидетельствуют также о том, что репарация пострепликативных пробелов ДНК в у.-ф.-облученных клетках тесно связана с их у.-ф.-резистентностью.

Институт цитологии
Академии наук СССР
Ленинград

Поступило
12 II 1974

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ В. Д. Жестяников, Цитология, т. 8, 404 (1966). ² В. П. Парибок, Э. А. Вальдштейн, Н. В. Томили, Цитология, т. 11, 93 (1969). ³ R. B. Seilow, W. L. Carrier, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., v. 51, 226 (1964). ⁴ W. D. Rupp, P. Howard-Flanders, J. Mol. Biol., v. 31, 291 (1968). ⁵ K. C. Smith, Photophysiology, v. 6, 1971, p. 209. ⁶ J. G. Calvert, H. J. L. Rechen, J. Am. Chem. Soc., v. 74, 2101 (1952). ⁷ H. Noll, Nature, v. 215, 360 (1967). ⁸ F. W. Studier, J. Mol. Biol., v. 11, 2, 373 (1965). ⁹ A. Charlesby, Proc. Roy. Soc., v. 224A, 120 (1954). ¹⁰ A. K. Ganesan, K. C. Smith, Mol. Gen. Genet., v. 113, 285 (1971). ¹¹ I. E. Mattern, H. Zwenk, A. Rorsch, Mut. Res., v. 3, 374 (1966). ¹² В. Д. Жестяников, Э. А. Вальдштейн, Тез. докл. II Всесоюз. совещания общества генетиков и селекционеров им. Н. И. Вавилова, М., 1972, стр. 94. ¹³ Г. Ф. Нестерова, В. Д. Жестяников, Тез. докл. II Всесоюзного симпозиума: Молекулярные механизмы генетических процессов. Мутагенез и репарация, М., 1973, стр. 128. ¹⁴ J. W. Bush, A. Markovitz, Genetics, v. 74, 215 (1973). ¹⁵ M. Inoye, J. Bacteriol., v. 106, 539 (1971).