

А. И. ГАЗИЕВ, С. А. СЕРГЕЕВА, член-корреспондент АН СССР А. М. КУЗИН

АТФ-ЗАВИСИМЫЙ СИНТЕЗ ДНК В γ -ОБЛУЧЕННЫХ КЛЕТКАХ E. COLI, ОБРАБОТАННЫХ ТОЛУОЛОМ

В ряде исследований с использованием клеток бактерий, обработанных толуолом, или ДНК-мембранных комплексов был продемонстрирован *in vitro* АТФ-зависимый полуконсервативный синтез ДНК (¹⁻⁶). Этот синтез зависит от ДНК-полимеразы III и не зависит от ДНК-полимеразы I. Нуклеотидпроницаемые толуолообработанные клетки для наблюдения репликативного синтеза ДНК *in vitro* оказались более надежной и стабильной системой, чем ДНК-мембранные комплексы (⁷). Недавно на толуолообработанных клетках было показано подавление АТФ-зависимого репликативного и появление дополнительного неполуконсервативного синтеза ДНК под действием у.ф. света (^{5, 8}).

В настоящей работе методом центрифугирования в градиенте плотности CsCl исследовано влияние γ -радиации на АТФ-зависимый репликативный и репаративный синтезы ДНК в обработанных толуолом клетках бактерии. В работе использован штамм E. coli P 3478 (pol AI) дефицитный по ДНК-полимеразе I (⁹). Клетки выращивали в среде, содержащей 1,5 мкС/мл ¹⁴С-тимидина в течение 2-3 генераций (⁸). Суспензию (5-8·10⁸ кл/мл) промывали в 0,07 M калий-фосфатном буфере pH 7,4 и облучали в этом же буфере на источнике ⁶⁰Co при мощности дозы 1100 рад/мин. После облучения клетки обрабатывали толуолом с последующим отмыванием (¹). Обработанные толуолом клетки ресуспендировали (5-8·10⁸ кл/мл) в 0,07 M калий-фосфатном буфере pH 7,4 и инкубировали в реакционной смеси (1,0 мл), содержащей 13 ммол MgCl₂, 1,3 ммол АТФ, 150 мкмол. НАД, 5 ммол. меркаптоэтанол и по 35 мкмол. дЦТФ, дГТФ, Вг-дУТФ, ³H-дАТФ (18 мкмол./мл) каждого (полная система). Смесь инкубировали при 37°, синтез ДНК прерывали добавлением 0,2 мл 0,25 M ЭДТА (pH 8,1) и охлаждали. Далее к смеси добавляли 0,5 мл 0,05 M трис-НСI буфера (pH 8,1), содержащего 0,3 мол. NaCl, 0,3 мл раствора лизоцима (2 мг/мл) и инкубировали 30 мин. (37°). К лизату добавляли 0,05 мл 20% ДДС и нагревали 10 мин. (60°). Лизат разбавляли до 4 мл водой, 2 мл лизата смешивали с раствором CsCl pH 12,5 в центрифужных пробирках, как указано в (^{10, 11}) до плотности 1,76 г/см³. Центрифугирование проводили на роторе 65 центрифуги «Beckman L2-65B» в течение 42 час. (40 000 об/мин, 15°С). После центрифугирования образцы обрабатывали как описано (^{10, 11}) и подсчитывали радиоактивность на установке SL-30. Часть толуолообработанных клеток использовали для исследования восстановления односторонних разрывов в ДНК после проведения АТФ-зависимого синтеза ДНК. Для этого клетки инкубировали в тех же условиях, только взамен ³H-дАТФ и Вг-дУТФ в реакционную смесь добавляли дАТФ и ТТФ. После остановки синтеза ДНК из клеток получали сферопласты, наносили на градиент щелочной сахарозы (¹¹). Центрифугирование и дальнейшую обработку образцов проводили, как указано в (¹¹).

Результаты исследований показали, что в присутствии АТФ в необлученных обработанных толуолом клетках E. coli наблюдается высокой интенсивности полуконсервативный синтез ДНК. Этот синтез не зависит от ДНК-полимеразы I, как было отмечено в работах (^{1, 5, 6}). В отличие от контрольных клеток в γ -облученных клетках мы наблюдаем

2 типа АТФ-зависимого синтеза ДНК — репликативный и репаративный (рис. 1).

Как видно из рис. 1, пики вновь синтезированной ДНК располагаются в разных плотностях CsCl. Инкубация облученных и обработанных толуолом клеток в полной системе в различное время показала, что репликативный синтез ДНК в этих клетках через 5, 20 и 40 мин. (рис. 1) имеет почти одинаковую величину, тогда как репаративный синтез ДНК растет с увеличением времени инкубации клеток. Эти данные свидетельствуют о том,

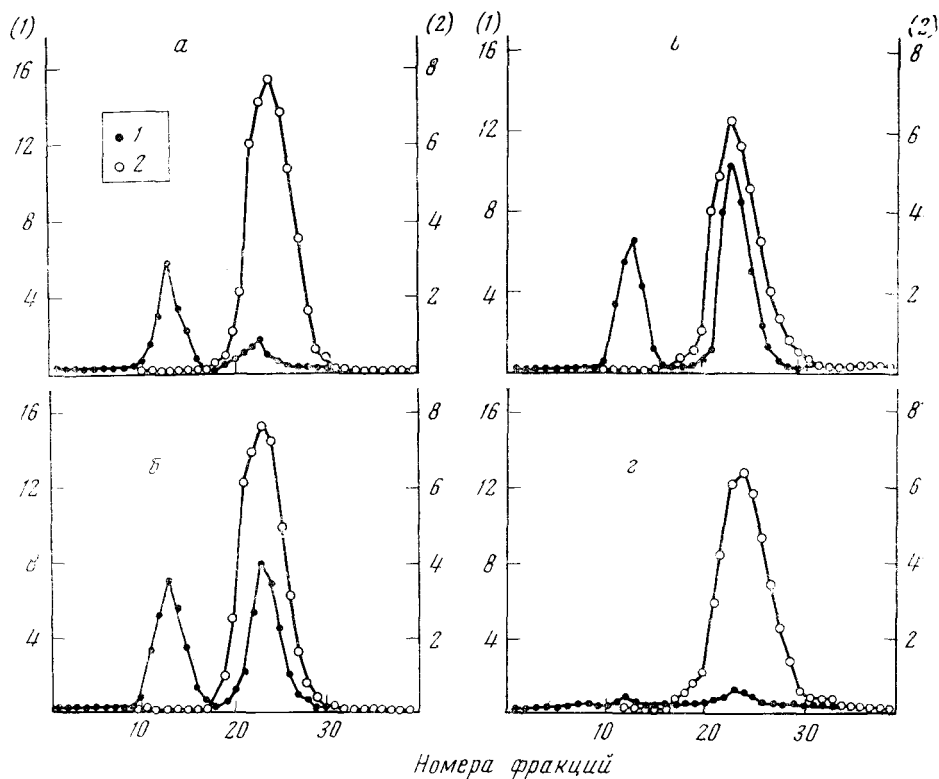


Рис. 1. Распределение ДНК γ -облученных клеток *E. coli* pol. A1 в градиенте плотности CsCl. Клетки облучали в дозе 20 крэд. После толуоловой обработки инкубировали в полной системе, останавливая синтез ДНК через 5 (а), 20 (б) и 40 (в) мин. г — инкубации 40 мин. без АТФ. Радиоактивность (в имп/мл · 10³) по ³H (1) и по ¹⁴C (2)

что АТФ-зависимый репликативный синтез ДНК в γ -облученных клетках ингибируется в течение нескольких минут, а потом останавливается. Причем наблюдаемый АТФ-зависимый репликативный синтез в γ -облученных клетках представляет незначительную величину (~5%) по сравнению с контролем. Очевидно, эта задержка синтеза обусловлена наличием индуцированных γ -радиацией повреждений в ДНК-матрице, а не связана с поражением белков, ответственных за репликативный синтез. Возможно, АТФ-зависимые репаративный и репликативный синтезы ДНК в γ -облученных клетках обусловлены участием разных ферментных систем. Поскольку в толуолообработанной системе γ -облученных клеток мы наблюдали АТФ-зависимый репаративный синтез независимый от ДНК-полимеразы I, то казалось интересным проанализировать — завершается ли эта репарация восстановлением однонитевых разрывов в ДНК. Результаты анализов показали, что АТФ-зависимый репаративный синтез ДНК в этих клетках не завершается восстановлением однонитевых разрывов (рис. 2). Отрицательный результат получен, хотя толуолообработанные клетки *E. coli* pol A1 содержат функционально активную ДНК-лигазу и в инку-

бационную среду был добавлен кофактор этого фермента — НАД. Эти данные позволяют предположить, что АТФ-зависимый репаративный синтез в нуклеотидпроницаемых γ -облученных клетках проходит с меньшей скоростью, чем эксцизионная деградация поврежденных участков полинуклеотидных цепей ДНК. Поэтому в условиях данного эксперимента можно полагать, что между концами разрывов в ДНК постоянно сохраня-

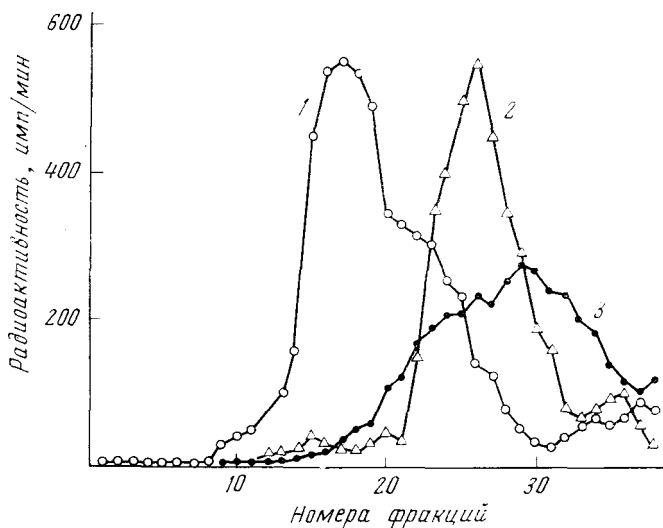


Рис. 2. Седиментация ДНК толуолообработанных клеток *E. coli* pol. A1 в градиенте щелочной сахарозы. 1 — необлученные; 2 — облученные (10 град), не инкубированы; 3 — облученные, инкубированы в полной системе 30 мин.

ются нуклеотидные бреши, что делает действие ДНК-лигазы не эффективной. Возможно, деградация ДНК в этой системе усиливается наличием в инкубационной среде АТФ, которая активнрует АТФ-зависимую экзонуклеазу.

Полученные данные позволяют заключить, что в обработанных толуолом γ -облученных клетках *E. coli* происходит АТФ-зависимый репаративный синтез ДНК. Этот синтез не зависит от ДНК-полимеразы I и не сопровождается восстановлением однонитевых разрывов в ДНК.

Институт биологической физики
Академии наук СССР
Пушкино-па-Оке

Поступило
11 III 1974

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ R. E. Moses, C. C. Richardson, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., v. 67, 674 (1970).
² R. Knippers, W. Stalling, Nature, v. 226, 713 (1970). ³ R. B. Wickner, J. Hurwitz, Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 47, 202 (1972). ⁴ H. Schaller, B. Otto et al., J. Mol. Biol., v. 63, 183 (1972). ⁵ D. Bowersock, R. E. Moses, J. Biol. Chem., v. 248, 7449 (1973). ⁶ C. Majumdar, F. R. Frankel, Nature, v. 243, 33 (1973). ⁷ R. F. Moses, J. Biol. Chem., v. 247, 6031 (1972). ⁸ W. E. Masker, P. C. Hanawalt, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., v. 70, 129 (1973). ⁹ P. De Lucia, J. Cairns, Nature, v. 224, 1164 (1969).
¹⁰ R. M. Burger, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., v. 68, 2124 (1971). ¹¹ W. D. Rupp, P. Howard-Flanders. Methods in Enzymology, v. 21, Nucleic Acids, Part D, N. Y.—London, 1971, p. 231.