

И. Н. ТОДОРОВ, А. В. ШУГАЛИЙ, А. Б. ФОНАРЕВ

## О НЕСЛУЧАЙНОМ РАСПРЕДЕЛЕНИИ НАРУШЕНИЙ СТРУКТУРЫ ДНК ПРИ $\gamma$ -ОБЛУЧЕНИИ IN VITRO

(Представлено академиком Г. М. Франком 31 X 1974)

$\gamma$ -Облучение молекул ДНК вызывает в них ряд повреждений, к которым относятся разрывы сахаро-фосфатной цепи (однонитевые разрывы), химическая модификация и потери оснований, а также сшивки между комплементарными нитями ДНК (<sup>1</sup>). Однако до сих пор остается невыясненным вопрос о локализации различного рода нарушений, что исключает возможность постановки вопроса об относительной радиочувствительности участков генома, выполняющих различные функции. Тем не менее, имеются данные о корреляции между относительным количеством пиримидиновых кластеров в ДНК различных организмов и радиочувствительностью этих организмов (<sup>2</sup>), а также о сгруппированности на ограниченных участках молекулы возникающих при  $\gamma$ -облучении ДНК дефектов первичной и вторичной структуры (<sup>3, 4</sup>). Вопрос о распределении этих дефектов по фрагментам генома с определенными физико-химическими характеристиками — блоки (<sup>5</sup>) и повторы (<sup>6</sup>) — не исследовался.

Целью настоящей работы было исследование характера распределения дефектов первичной и вторичной структуры в  $\gamma$ -облученных фракциях гетерогенного препарата тимусной ДНК, отличающихся между собой как средним ГЦ-составом (блоки), так и содержанием повторяющихся последовательностей (повторы), что позволяет связать интерпретацию распределения повреждений в  $\gamma$ -облученной ДНК как с различиями в радиочувствительности оснований (<sup>4</sup>), так и с особенностями их распределения (пиримидиновые изоплиты) по фракциям ДНК (<sup>7</sup>).

ДНК выделяли из тимуса теленка по методу (<sup>8</sup>), обрабатывали пропаной фирмы Calbiochem, США. Содержание белка в препаратах ДНК было менее 1% (по Лоури). После диализа на холоду в течение двух суток против 0,06 M фосфатного буфера, pH 7,0 ДНК фрагментировали ультразвуком на установке УЗДН-1 до размера фрагментов  $500 \pm 100$  пар нуклеотидов. Реассоциацию ДНК проводили в 2 см кюветах при температуре 65° на спектрофотометре Unicam SP-8000. Для получения фракций ДНК, отличающихся средним ГЦ-составом, проведено температурное фракционирование на колонке с гидроксипатитом (<sup>9, 10</sup>). Полученные фракции приводили к одной концентрации (20 мкг/мл) и облучали на  $\gamma$ -установке «ТУР», мощность дозы 17 кр/мин. Для оценки количественного вклада повреждений азотистых оснований и разрывов водородных связей в нарушенной структуре облученной ДНК использовали изменение оптического поглощения в максимуме спектра как при pH 2,5, так и при pH 8,0 (<sup>11</sup>). Подкисление растворов до pH 2,5 использовано с целью разделения тяжелой ДНК для исключения влияния гиперхромизма при определении доли оснований, подвергшихся радиолизу; доля же нарушенных водородных связей рассчитывалась по разности между общим числом водородных связей в нативном и облученном препаратах ДНК (<sup>12, 13</sup>), с учетом поправки на распад оснований (<sup>14</sup>).

В табл. 1 показаны результаты фракционирования тимусной ДНК путем плавления ее на гидроксипатите. Разделение фракций основано на

Таблица 1

## Термодинамические параметры и количество пострадиационных дефектов во фракциях

Температура фракционирования, °С	Доля фракции в суммарном препарате	$T_{пл}$ , °С	Гиперхромизм, %	Число поврежденных оснований, %	Число поврежденных водородных связей, %
89,5	0,16	88,4	26	4,4	5,2
86	0,35	86,6	26,8	5,8	6,4
83	0,55	84	27	7,0	8,2
79	0,83	82,8	28,2	8,2	9,5

Примечание. Нефракционированная ДНК имела по тем же параметрам следующие результаты 1,0, 81,2, 30,0, 8,7, 11 соответственно.

том принципе, что при фиксированной температуре в интервале плавления ДНК фрагменты более низкого ГЦ-содержания (а возможность вариации среднего нуклеотидного состава фрагментов ДНК животного происхождения довольно высока (<sup>5</sup>, <sup>15</sup>)) выплавляются и элюируются с колонки. Устанавливая с каждой новой порцией ДНК на колонке более высокую температуру, мы получаем нативные остатки, все более обогащенные фрагментами с высоким ГЦ-содержанием.

В результате фракционирования получено 4 фракции, их термодинамические характеристики определяли из кривых плавления. Из рис. 1 видно, что с увеличением температуры фракционирования ГЦ-содержание фракций, вычисленное из температуры плавления нативных остатков, увеличивается, а ширина интервала плавления уменьшается. Отметим линейный характер изменения этих параметров с изменением температуры фракционирования. При этом процент гиперхромизма во фракциях незначительно падал с повышением температуры фракционирования, что может быть связано как с увеличением ГЦ-состава фракций (<sup>16</sup>), так и с некоторым подплавлением собираемого материала.

Полученные таким образом фракции с различным ГЦ-содержанием приводили к одной концентрации и облучали в равных условиях в дозе 5 кр. В случае равномерного распределения дефектов вдоль молекулы процент нарушений должен сохраняться независимо от того, какую часть данная фракция составляет от тотального препарата. Проведенные измерения количества нарушенных водородных связей и потерь оснований в  $\gamma$ -облученных фракциях (табл. 1) указывают на то, что с уменьшением гетерогенности фрагментов и повышением их ГЦ-состава количество дефектов значительно уменьшается. Так, если на суммарный препарат приходится 11% разорванных водородных связей и 8,7% потерь оснований, то в самой ГЦ-богатой фракции их 5,2% и 4,4% соответственно. Заметное изменение этих величин противоречит предположению о равномерном распределении рассматриваемых дефектов по фракциям. Из факта падения этих величин по мере обогащения материала ГЦ-богатыми фракциями вытекает весьма важное заключение о том, что основные места повреждений структуры ДНК сосредоточены в АТ-богатых фрагментах, вклад которых уменьшается в процессе фракционирования.

Особенности локализации повреждений различного среднего нуклеотидного состава, тем не менее, не содержат информации о функциональной роли преимущественно поражаемых участков структуры ДНК в наших экспериментах. Сведения такого рода можно было бы получить, изучая кинетику реассоциации фракций и определяя долю последовательностей разной степени повторяемости в каждой фракции, ибо связь между повторяемостью последовательностей и их функциональной ролью в настоящее время выявляется (<sup>17</sup>, <sup>18</sup>). С этой целью проводилась реассо-

цияция фракций ДНК до значений  $C_0t$ , когда семейства быстрых повторов заведомо реассоциируют. Кривые реассоциации на рис. 2 представлены в линеаризованном виде, как описано в (18). Видно, что по мере обеднения фракций АТ-богатыми фрагментами в них увеличивается относительная доля семейств быстрых повторов, реассоциирующих в интервале значений  $C_0t$  до  $\sim 4 \cdot 10^{-3}$  моль·сек/л, хотя отсутствие данных о вкладе уникальной

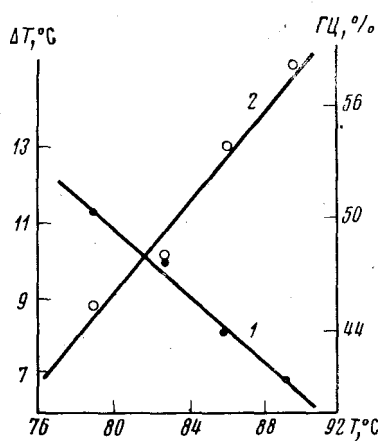


Рис. 1

Рис. 1. Зависимость ширины интервала плавления  $\Delta T$  (1) и процента ГЦ-пар (2), вычисленного из температуры плавления нативных остатков, от температуры фракционирования суммарной ДНК на гидроксипатите

Рис. 2. Кинетика реассоциации суммарной ДНК тимуса теленка и ее фракций, представленная в линеаризованном виде (18). 1 – суммарный препарат, 2, 3, 4 – фракции, полученные при температурах 79°, 83° и 89,5° соответственно.  $C$  – концентрация денатурированной ДНК в момент времени  $t$ ,  $C_0$  – значение  $C$  при  $t=0$

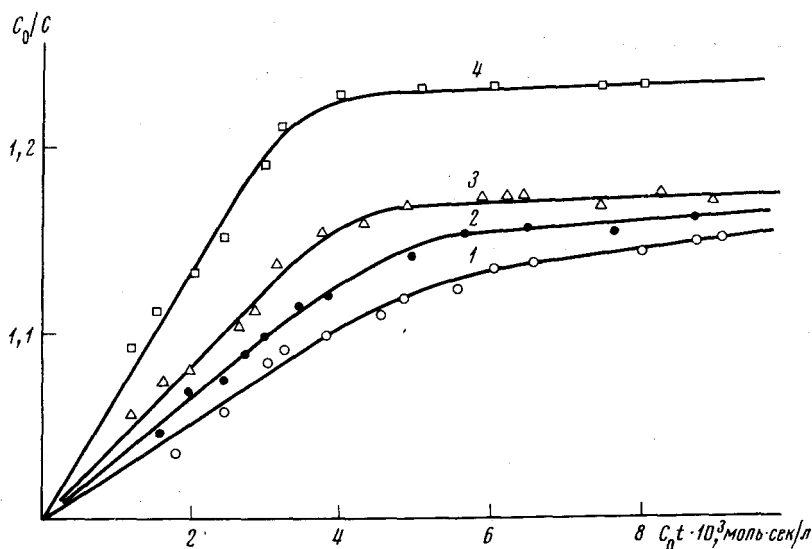


Рис. 2

последовательности в каждой фракции не позволяет нам судить о том, произошло ли перераспределение повторов в пределах данного семейства в результате фракционирования.

Сопоставление локализации дефектов по фракциям различного нуклеотидного состава (табл. 1) с кинетикой реассоциации фракций позволяет заключить, что большая часть дефектов как первичной, так и вторичной структуры ДНК, приходится на семейство средних повторов и уникальную часть последовательности, так как основная масса повреждений сосредоточена в АТ-богатых фрагментах, обедненных семейством быстрых повторов.

Показано (7), что сблоченность пиримидиновых нуклеотидов (пиримидиновые изоплиты) во фракциях различного нуклеотидного состава, выделенных из животной ДНК, неодинакова, а именно, в АТ-фракции степень сблоченности пиримидинов значительно больше, чем в ГЦ-фракции и суммарной ДНК. Если исходить из того факта, что в наших экспериментах степень поражения фракций ДНК падает по мере обогащения препарата ГЦ-богатыми фрагментами, а также из данных о повышенной радиочувствительности пиримидиновых оснований (1), то следует допустить, что неслучайный характер распределения нарушений первичной и вторичной структуры по фракциям ДНК обусловлен, прежде всего, особенностями их сблоченности по пиримидиновым основаниям, т. е. особенностями организации первичной структуры ДНК. Это утверждение тем более вероятно, что обнаружена статистически достоверная корреляция между относительным содержанием пиримидиновых блоков в ДНК организмов и их радиочувствительностью (2).

Институт молекулярной биологии и генетики  
Академии наук УССР  
Киев

Поступило  
25 X 1974

Институт медицинской радиологии  
Харьков

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> Первичные радиобиологические процессы, М., 1973. <sup>2</sup> Г. А. Крицкий, С. В. Александров, ДАН, т. 212, 1011 (1972). <sup>3</sup> А. Б. Фонарьов, О. В. Шугалий и др., Доп. АН УРСР, № 7, 642 (1974). <sup>4</sup> А. Б. Фонарьов, А. В. Шугалий и др., Радиобиология, т. 14, № 6 (1974). <sup>5</sup> А. В. Шугалий, М. Д. Франк-Каменецкий, Ю. С. Лазуркин, Мол. биол., № 5, 766 (1974). <sup>6</sup> R. J. Britten, D. E. Kohne, Science, v. 161, 529 (1968). <sup>7</sup> Б. Ф. Ванюшин, Особенности первичной структуры ДНК, Автореф. докт. дисс., М., 1972. <sup>8</sup> E. R. M. Kay, N. S. Simmons, A. U. Daunse, J. Am. Chem. Soc., v. 74, 1724 (1952). <sup>9</sup> M. McCallum, P. M. B. Walker, Biochem. J., v. 105, 165 (1967). <sup>10</sup> В. З. Тарангул, Ю. Н. Баранов и др., Мол. биол., т. 7, 849 (1973). <sup>11</sup> B. Collyns, S. Okada et al., Radiation Res., v. 25, 526 (1965). <sup>12</sup> A. Rich, J. Tinoco, J. Am. Chem. Soc., v. 83, 6409 (1961). <sup>13</sup> J. Applequist, J. Am. Chem. Soc., v. 82, 3158 (1960). <sup>14</sup> Н. П. Крушинская, М. И. Шальнов, Радиобиология, т. 9, 339 (1969). <sup>15</sup> А. Л. Мазин, Г. Е. Сулимова, Б. Ф. Ванюшин, Мол. биол., т. 4, 265 (1970). <sup>16</sup> M. Gillis, J. de Ley, M. de Cleene, Eur. J. Biochem., v. 12, 143 (1970). <sup>17</sup> Г. П. Георгиев, В сб.: Усп. биол. хим., т. 14, «Наука», 1973. <sup>18</sup> В. И. Прима, В. З. Тарангул и др., Укр. биохим. журн., т. 46, 255 (1974).