

Л. С. БАРЕНФЕЛЬД, Т. В. БАРСКАЯ

**ГИДРОДИНАМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ДНК
ШТАММОВ *ESCHERICHIA COLI*, РАЗЛИЧАЮЩИХСЯ ПО
РАДИОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ,
И МАТРИЧНЫЙ СИНТЕЗ РНК IN VITRO**

(Представлено академиком Н. П. Дубининым 23 I 1975)

Многочисленными исследованиями установлено, что повреждения бактериальной ДНК, индуцированные рентгеновскими или γ -лучами, обратимы. Репарация ДНК, имеющей одонитевые разрывы, в настоящее время не вызывает сомнений ⁽¹⁾. Появляется все больше доказательств обратимости двойных разрывов и повреждений оснований ДНК ⁽²⁻⁴⁾. Однако эти данные не дают возможности ответить на вопрос, насколько правильно происходит репарация ДНК, осуществляется ли полный возврат к ее исходному, т. е. предальтерационному состоянию.

С другой стороны имеется предположение о том, что при полном восстановлении структурной целостности макромолекул ДНК их информационная целостность может остаться нарушенной. К такому выводу приходит ряд авторов на основании работ, в которых в качестве критерия оценки функциональной значимости репаративной репликации ДНК используется ее способность участвовать в дальнейшем в нормальной полуконсервативной репликации ^(5, 6).

В данной работе предпринята попытка подойти к решению вопроса, насколько полно восстанавливается информационная целостность макромолекул ДНК в результате репарации. С этой целью исследована матричная активность ДНК, выделенной из *E. coli* радиорезистентного штамма В/г после рентгеновского облучения и последующей инкубации в течение 60 мин. при 37°, во время которой, как известно ⁽¹⁾, происходит репарация одонитевых разрывов. Одновременно исследовалась матричная активность ДНК, выделенной из *E. coli* радиочувствительного мутанта В₈₋₁, у которого медленная репарация одонитевых разрывов не происходит. Кроме того, изучалось изменение гидродинамических свойств ДНК бактерий тех же штаммов после облучения и инкубации.

Клетки выращивали при 37° в течение 4,5 час. при аэрации в жидкой глюкозо-минимальной среде М-9 с добавлением казеиновых кислот (2,5 г/л) в объеме 1 л. Облучение проводили при температуре тающего льда на аппарате РУМ-11 ($V=200$ кв, $I=20$ ма, без фильтра) при мощности дозы 1,4 кр/мин. ДНК выделяли из бактерий: 1) необлученных (контроль), 2) облученных, 3) облученных и инкубированных в ростовой среде 60 мин. при 37°, 4) облученных и выдержанных 60 мин. при температуре тающего льда. ДНК 2-го и 4-го образцов не отличалась ни по характеристической вязкости, ни по матричной активности. Клетки, готовые для выделения ДНК, центрифугировали и дважды промывали додецилсульфатом натрия (SDS), затем лизировали 10 мин. при 60°, добавляя 2 мл 25% SDS при слабом помешивании. ДНК получали фенольным методом ⁽⁷⁾. Характеристическую вязкость ДНК измеряли в ротационном магнитном вискозиметре, представляющем собой модификацию вискозиметра Зимма ⁽⁸⁾. Условия измерения характеристической вязкости описаны ранее ⁽⁹⁾.

ДНК-зависимую РНК-полимеразу получали из *E. coli* Q13 по методу Чемберлена и Берга (¹⁰) с последующей хроматографией препарата на ДЭАЭ-целлюлозе с целью очистки от примесей эндогенной ДНК и нуклеаз *E. coli*. Инкубационная смесь для проведения матричного синтеза РНК *in vitro* содержала все необходимые компоненты (¹¹). Удельная активность ¹⁴C-АТФ составляла 0,4 мкС на 1 н/мол.

Таблица 1

Характеристическая вязкость и матричная активность ДНК *E. coli* после рентгеновского облучения и последующей инкубации (в % от контроля)

Штамм <i>E. coli</i>	Доза, кр	[η] ДНК, облучение	[η] ДНК, облучение, инкубация	J * ДНК, облучение	J ДНК, облучение, инкубация
V/r	10	80	100	70	98
	20	30	100	55	68
V _{s-1}	10	60	62	55	67

* J — включение ¹⁴C-АТФ в синтезированную РНК.

Характеристическая вязкость ДНК, выделенной из необлученных бактерий исследуемых штаммов, была одинакова и составляла в среднем 170 дл/г. Установлено, что величина ДНК *E. coli* V/r уменьшается при облучении бактерий в дозах 10 и 20 кр на 20 и 50% соответственно (табл. 1). Средняя квадратичная ошибка при измерении характеристической вязкости ДНК не превышала ±1%. После инкубации бактерий, облученных в этих дозах, характеристическая вязкость ДНК увеличивалась до уровня вязкости ДНК из необлученных бактерий.

Облучение *E. coli* радиочувствительного штамма V_{s-1} в дозе 10 кр приводит к снижению характеристической вязкости ДНК на 40%. Однако в этом случае пострадиационная инкубация бактерий не вызывает увеличения характеристической вязкости ДНК.

Уменьшение характеристической вязкости ДНК при облучении бактерий может быть обусловлено, по крайней мере, двумя причинами: 1) уменьшением молекулярного веса ДНК; 2) уменьшением эффективного гидродинамического объема макромолекул, в основе чего лежат повреждения ДНК на уровне первичной и вторичной структур, приводящие к уменьшению жесткости макромолекул. Это, по-видимому, главным образом однонитевые разрывы и зоны денатурации около них. Полученные нами результаты позволяют считать, что у *E. coli* радиорезистентного штамма V/r, в отличие от радиочувствительного мутанта V_{s-1}, происходит полное восстановление радиационных повреждений ДНК, обнаруживаемых по снижению характеристической вязкости.

Дальнейшая наша задача заключалась в исследовании матричной активности репарированной ДНК. Матричная активность данного образца ДНК определялась по включению ¹⁴C-АТФ в синтезированную РНК кислоторастворимой фракции. На рис. 1 приведена кинетика синтеза РНК на матрицах ДНК из необлученных бактерий, облученных и облученных с последующей инкубацией. Относительные величины изменения матричной активности ДНК представлены в табл. 1. Обнаружено, что облучение *E. coli* V/r в дозе 10 кр приводит к уменьшению матричной активности ДНК по сравнению с контролем на 30%. Средняя квадратичная ошибка этого эксперимента, как и всех последующих по измерению матричной активности ДНК, составляла не более ±2%. Если после облучения бактерий радиорезистентного штамма проинкубировать при 37° в течение 60 мин., то матричная активность ДНК возрастает практически до уровня матричной активности ДНК из необлученных бактерий.

Облучение бактерий этого же штамма в дозе 20 кр вызывает снижение матричной активности ДНК на 45%. Однако в этом случае пострадиационная инкубация бактерий приводит к увеличению матричной активности лишь на 12%. Таким образом, наблюдается значительное уменьшение репарации радиационных повреждений с увеличением дозы облучения (рис. 1а). Интересно отметить, что от дозы облучения зависит и способность ДНК, подвергнувшейся репаративной репликации, участвовать в дальнейшем в нормальной полуконсервативной репликации (6).

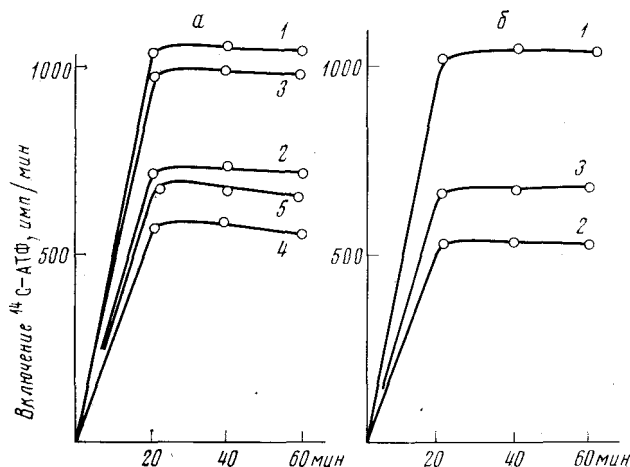


Рис. 1. Кинетика энзиматического синтеза РНК на матрицах ДНК *E. coli* В/г (а) и В₃₋₁ (б). 1 — ДНК из необлученных бактерий; 2 — 10 кр; 3 — 10 кр, инкубация 60 мин при 37°; 4 — 20 кр; 5 — 20 кр, инкубация

Согласно данным ряда авторов (12, 13), синтез РНК на γ -облученной ДНК начинается с определенных участков и продолжается до ближайшего радиационного повреждения в одной или двух полинуклеотидных цепях ДНК. Поэтому уменьшение количества РНК, синтезированной на ДНК после облучения, отражает уменьшение длины участков ДНК, с которых идет транскрипция. Предполагают, что из всех радиационных повреждений ДНК наиболее эффективными в уменьшении синтеза РНК являются разрывы, главным образом, односторонние. Повреждения оснований ДНК приводят к неправильному включению нуклеотидов в синтезируемую РНК (13, 14). Кроме того известно, что уменьшение матричной активности облученной ДНК сопровождается образованием на ДНК новых мест связывания с РНК-полимеразой, которые, однако, не являются промоторами (15, 16).

Известно, что все односторонние разрывы ДНК, обнаруживаемые методом ультрацентрифугирования в градиенте сахарозы при щелочном pH после облучения *E. coli* В/г в дозе 20 кр и последующей инкубации в ростовой среде при 37°, репарируются в течение 60 мин. (1). Поэтому неполное восстановление матричной активности ДНК после инкубации бактерий радиорезистентного штамма В/г, облученных в дозе 20 кр, можно объяснить следующим образом. Во-первых, разрывы ДНК, по крайней мере часть из них, могли восстановиться неправильно и остаться местами преждевременной терминации синтеза РНК. Во-вторых, некоторые повреждения могли остаться нерепарированными. И наконец, в-третьих, вполне вероятно, что облучение бактерий в дозе 20 кр приводит к образованию на ДНК большого количества новых мест связывания с РНК-полимеразой, неэффективных в синтезе РНК, чем это имеет место при облучении в дозе 10 кр. Последнее предположение подтверждается данными работы (16), согласно которым число таких мест связывания увеличивается линейно с дозой облучения.

При исследовании *E. coli* радиочувствительного мутанта B_{s-1} установлено, что облучение в дозе 10 кр приводит к уменьшению матричной активности ДНК на 45%. В отличие от *E. coli* В/г, инкубация *E. coli* B_{s-1} после облучения в такой дозе вызывает увеличение матричной активности ДНК лишь на 13% (табл. 1). Этот результат согласуется с представлением о том, что восстановление от радиационных повреждений возможно и у штамма B_{s-1} . По-видимому, таковыми являются повреждения азотистых оснований ДНК, равноэффективно репарируемые как у штамма В/г, так и у штамма B_{s-1} . Последнее можно предполагать из данных опытов Вилкинса (¹⁷), обнаружившего одинаковое убывание γ -эндонуклеазочувствительных участков у *E. coli* K 12 uvr^+ и uvr^- .

Таким образом, установлено, что восстановление матричной активности ДНК радиорезистентного штамма *E. coli* В/г зависит от дозы облучения. Хотя матричная активность ДНК *E. coli* В/г восстанавливается в результате инкубации бактерий после облучения в дозе 10 кр практически полностью, нельзя исключить, что число и длина цепей, а также состав оснований вновь синтезированной РНК изменены. На основании полученных данных можно предполагать, что репарация ДНК после облучения бактерий этого штамма в дозе 20 кр не возвращает структуру ДНК к ее предальтерационному состоянию.

Институт цитологии
Академии наук СССР
Ленинград

Поступило
23 I 1975

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ R. A. McGrath, R. W. Williams, *Nature*, v. 212, 534 (1966).
- ² A. D. Burrell, P. Feldchreiber, C. J. Dean, *Biochim. et biophys. acta*, v. 247, 38 (1971).
- ³ S. Kytayama, A. Matsuama, *Agr. Biol. Chem.*, v. 35, 644 (1971).
- ⁴ P. V. Hariharan, P. A. Cerutti, *J. Mol. Biol.*, v. 66, 65 (1972).
- ⁵ T. P. Brent, G. A. Wheatley, *Int. J. Radiat. Biol.*, v. 19, 339 (1971).
- ⁶ R. E. Rasmussen, B. L. Reisner, R. B. Painter, *Int. J. Radiat. Biol.*, v. 17, 285 (1970).
- ⁷ С. Е. Бреслер, Р. А. Кренева и др., *Биохимия*, т. 29, 477 (1964).
- ⁸ Э. В. Фрисман, Л. В. Щагина, В. И. Воробьев, *Колл. журн.*, т. 27, 3 (1965).
- ⁹ Л. С. Баренфельд, Автореф. канд. дисс., Инст. цитологии АН СССР, 1970.
- ¹⁰ M. Chamberlin, P. Berg, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, v. 48, 81 (1962).
- ¹¹ Л. А. Осерман, *Усп. биол. хим.*, т. 11, 3 (1970).
- ¹² J. J. Weiss, C. M. Wheeler, *Biochim. et biophys. acta*, v. 145, 68 (1967).
- ¹³ U. Hagen, M. Ullrich, H. Jung, *Int. J. Radiat. Biol.*, v. 16, 597 (1969).
- ¹⁴ U. Hagen, *Biophysic*, v. 9, 279 (1973).
- ¹⁵ J. P. Goddard, J. J. Weiss, S. M. Wheeler, *Biochim. et biophys. acta*, v. 199, 126 (1970).
- ¹⁶ U. Hagen, M. Ullrich et al., *Biochim. et biophys. acta*, v. 199, 115 (1970).
- ¹⁷ R. J. Wilkins, *Nature New Biol.*, v. 244, 269 (1973).