

УДК 547.963.32:577.391:582.232.7

ГЕНЕТИКА

С. В. ШЕСТАКОВ, И. В. ЕЛАНСКАЯ, В. М. ГЛАЗЕР,  
В. Д. ЖЕВНЕР

**РЕПАРАЦИЯ РАЗРЫВОВ, ИНДУЦИРОВАННЫХ  
РЕНТГЕНОВСКИМИ ЛУЧАМИ В ДНК СИНЕЗЕЛЕННОЙ ВОДОРОСЛИ  
ANACYSTIS NIDULANS**

*(Представлено академиком В. Д. Тимаковым 11 III 1975)*

Синезеленые водоросли обладают высокой устойчивостью к ионизирующей радиации (<sup>1</sup>), однако о механизмах, отвечающих за высокий уровень радиорезистентности, известно очень мало. Предполагается, что в клетках синезеленых водорослей функционируют мощные системы репарации радиационных повреждений в ДНК (<sup>2-4</sup>).

Как известно, под действием ионизирующей радиации в ДНК возникают однонитевые и двунитевые разрывы, происходит химическая модификация и деградация нуклеотидов (<sup>5-7</sup>). В клетках бактерий обнаружено три типа механизмов, осуществляющих репарацию индуцированных рентгеновскими лучами разрывов в ДНК: 1) система «сверхбыстрой» лигазной репарации, непосредственно во время облучения ликвидирующая разрывы, индуцированные в ДНК преимущественно в условиях аноксии (<sup>8</sup>); 2) система «быстрой» репарации, осуществляемая при участии ДНК-полимеразы I и функционирующая даже при облучении клеток в буферных растворах (<sup>9</sup>); 3) система «медленной» репарации, действующая в процессе пострадиационной инкубации клеток в среде роста и связанная с функциями гес-генов (<sup>10</sup>). О способности клеток к восстановлению разрывов в ДНК можно судить с помощью метода фракционирования ДНК по молекулярному весу при центрифугировании в градиенте щелочной сахарозы (<sup>11</sup>). В настоящей работе для выявления систем репарации радиационных повреждений в ДНК синезеленой водоросли *Anacystis nidulans* мы использовали данный метод, модифицированный применительно к клеткам этого объекта.

В работе использовали бактериологически чистую культуру *Anacystis nidulans* (№ 602 из коллекции Ленинградского государственного университета). Клетки выращивали 2 суток при 3000 лк и 37° в модифицированной среде С (<sup>12</sup>) в присутствии 4 мкМ 2-<sup>14</sup>С-урацила. Клетки отмывали на мембранном фильтре трис-HCl-буфером (рН 8,1) или ЦС-буфером (0,015 М цитрат Na, 0,15 М NaCl, рН 8,1), суспендировали в 0,4 мл буферного раствора и облучали в дозе 60 кр на рентгеновской установке РУМ-11. Пострадиационную инкубацию клеток проводили в среде С в люминистате. Клетки, облученные в ЦС-буфере, предварительно отмывали свежей средой. Для приготовления лизата клетки промывали и ресуспендировали в ЦС-буфере (0,2 мл), содержащем 0,05 М ЭДТА. В суспензию добавляли лизоцим до концентрации 5 мг/мл и пробы инкубировали 50 мин. при 37°. По 0,02 мл лизата вносили в слой 0,5 N NaOH на поверхности 4,8 мл линейного градиента 15–30 % сахарозы в 0,1 N NaOH, содержащей 1 М NaCl. Пробы центрифугировали 90 мин. при 37 000 об/мин в роторе SW-39 на ультрацентрифуге «Интела», фракционировали (40 фракций по 6 капель) в пробирки с 1 мл 0,5 N NaOH и 50 мкг немеченой ДНК, инкубировали 18 час. при 37° для гидролиза РНК, охлаждали, нейтрализовали, добавляли трихлоруксусную кислоту до 5 % концентрации и наносили на мембранные фильтры.

Фильтры с ДНК промывали, высушивали и помещали под толуольный сцинтиллятор для определения радиоактивности проб на автоматическом счетчике «Nuclear Chicago Mark-II». Профиль радиоактивности фракций отражает распределение ДНК с различным молекулярным весом в градиенте щелочной сахарозы.

Под действием рентгеновского облучения в ДНК *A. nidulans* возникают разрывы, приводящие к снижению молекулярного веса ДНК в градиенте щелочной сахарозы. При этом в ДНК из клеток, лизированных сразу после облучения в трис-HCl-буфере при 20°, обнаруживается значительно мень-

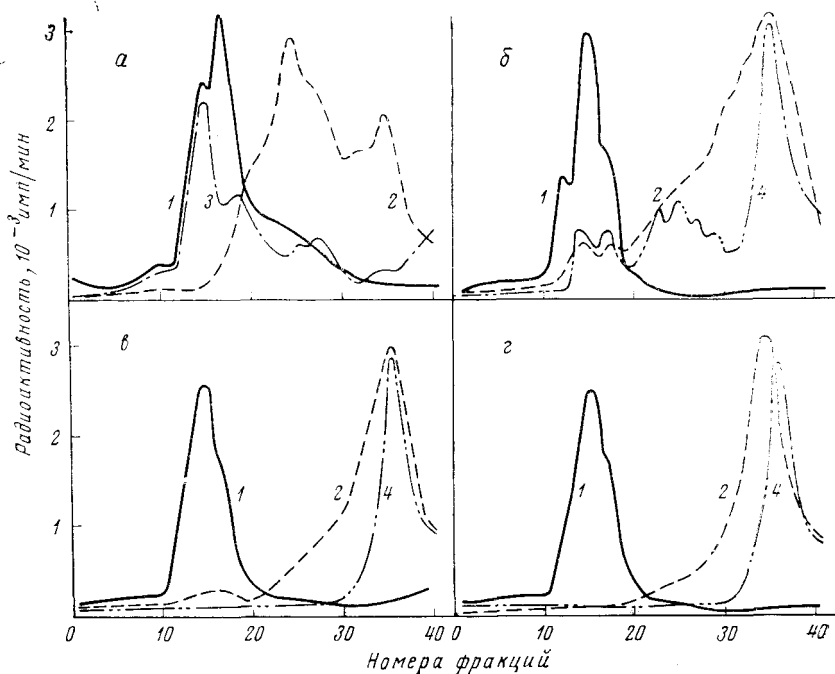


Рис. 1. Профили седиментации в градиенте щелочной сахарозы ДНК из клеток *A. nidulans*, облученных рентгеновскими лучами. 1 — ДНК из необлученных клеток; 2 — ДНК из клеток, облученных в дозе 60 кр; 3 — ДНК из клеток, облученных в дозе 60 кр и инкубированных в среде С в течение 3 час. и 4 — в течение 5 час. а — облучение в трис-HCl-буфере при 20°, б — при 0°, в — облучение в ЦС-буфере при 20°, г — при 0°

ше разрывов, чем в пробах с другими условиями облучения (рис. 1). Трехчасовая инкубация в среде С клеток, облученных в трис-HCl-буфере при 20°, приводит к восстановлению молекулярного веса ДНК до уровня, соответствующего ДНК из необлученных клеток, что свидетельствует о воссоединении разрывов, образующихся в результате облучения (рис. 1а). Выдерживание клеток при 0° в период облучения снижает эффективность процесса репарации разрывов в ДНК в пострадиационный период: даже после 5 час. инкубации в среде С клеток, облученных в трис-HCl-буфере при 0°, лишь небольшая фракция высокомолекулярной ДНК, соответствующей необлученному контролю, обнаруживается в градиенте щелочной сахарозы (рис. 1б). Облучение в ЦС-буфере как при 20°, так и при 0°, полностью подавляет пострадиационную репарацию разрывов в ДНК. При инкубации в среде С клеток, облученных в ЦС-буфере, наблюдается дальнейшее снижение молекулярного веса ДНК и уменьшение содержания ДНК в градиенте в результате деградации до кислоторастворимых продуктов (рис. 1в, г).

Таким образом, только после облучения в трис-HCl-буфере при 20° в клетках *A. nidulans* осуществляется эффективная пострадиационная ре-

парация индуцированных рентгеновскими лучами разрывов в ДНК. Система восстановления в активно метаболизирующих клетках, вероятно, аналогична механизму «медленной» репарации, которая находится у бактерий под контролем гес- и ехг-генов (<sup>10</sup>) и отвечает за репарационный синтез и ликвидацию брешей, образующихся в процессе эксцизионной или пост-репликативной репарации. Различия, обнаруженные в профилях седиментации ДНК сразу после облучения клеток при 0 или 20°, в трис-HCl-или ЦС-буфере, дают основания предполагать, что в клетках *A. nidulans* имеются и «быстрые» репаративные системы (<sup>9</sup>), функционирующие непосредственно в период облучения и восстанавливающие одонитевые разрывы в ДНК. Облучение в ЦС-буфере или при низкой температуре ингибирует как «быструю», так и «медленную» репарацию разрывов в ДНК. В этом отношении *A. nidulans* существенно отличается от клеток бактерий, у которых процессы «быстрой» и «медленной» репарации контролируются разными генетическими системами и нарушение одного из механизмов репарации не препятствует воссоединению разрывов в ДНК другими механизмами (<sup>6</sup>, <sup>13</sup>). Можно предположить, что облучение в ЦС-буфере или при низкой температуре приводит к образованию в клетках *A. nidulans* дополнительных повреждений, которые могут создать препятствия для осуществления процессов репарации. Такими повреждениями, например, могут быть возникающие под действием ионизирующей радиации в клетках бактерий и млекопитающих нарушения связей ДНК с мембранами (<sup>14</sup>, <sup>15</sup>). Поскольку синезеленые водоросли являются организмами с развитым мембранным аппаратом, то вполне вероятно, что репарационные процессы у них в значительной степени зависят от структурной целостности ДНК-мембранных комплексов.

Увеличение выхода разрывов при облучении клеток в ЦС-буфере или при 0° может быть также связано с тем, что нарушения в ДНК-мембранных комплексах способствуют возникновению дополнительных разрывов в ДНК при центрифугировании лизатов клеток в градиенте щелочной сахарозы. В таком случае предположение о наличии в клетках *A. nidulans* активных систем «быстрой» репарации разрывов в ДНК требует дополнительных доказательств. Так как многие синезеленые водоросли относятся к облигатно фотосинтезирующим организмам, то не исключено, что репарационные процессы у них энергетически сопряжены с фотосинтезом и осуществляются преимущественно с помощью системы «медленной» репарации в ходе пострадикационной инкубации в условиях нормального роста клеток.

Московский государственный университет  
им. М. В. Ломоносова

Поступило  
5 III 1975

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> *M. P. Kraus*, *Radiation Bot.*, v. 9, 481 (1969).    <sup>2</sup> *С. В. Шестаков, В. Д. Жевнер, Т. Н. Митронова*, Молекулярные механизмы генетических процессов, М., 1972, стр. 357.    <sup>3</sup> *Y. Asato*, *Rad. Bot.*, v. 11, 313 (1971).    <sup>4</sup> *V. D. Zhevner, S. V. Shestakov*, *Arch. Mikrobiol.*, v. 86, 349 (1972).    <sup>5</sup> *P. Alexander*, *Radiation Damage and Sulphydryl Compounds*, Vienna, 1969, p. 63.    <sup>6</sup> *C. J. Dean, M. J. Ormerod et al.*, *Nature*, v. 222, 1042 (1969).    <sup>7</sup> *P. V. Haricharan, P. A. Cerutti*, *J. Mol. Biol.*, v. 66, 65 (1972).    <sup>8</sup> *C. D. Town, K. C. Smith, H. S. Kaplan*, *Radiation Res.*, v. 52, 99 (1972).    <sup>9</sup> *C. D. Town, K. C. Smith, H. S. Kaplan*, *Science*, v. 172, 851 (1971).    <sup>10</sup> *D. S. Kapp, K. C. Smith, J. Bacteriol.*, v. 103, 49 (1970).    <sup>11</sup> *R. A. McGrath, R. W. Williams*, *Nature*, v. 212, 534 (1966).    <sup>12</sup> *В. Н. Столетов, В. Д. Жевнер и др.*, Генетика, т. 6, 61 (1965).    <sup>13</sup> *D. A. Youngs, K. C. Smith*, *J. Bacteriol.*, v. 114, 121 (1973).    <sup>14</sup> *A. D. Burrell, P. Feldshreiber, C. J. Dean*, *Biochim. et biophys. acta*, v. 247, 38 (1971).    <sup>15</sup> *M. M. Elkind, C.-M. Chang-Liu*, *Intern. J. Radiation Biol.*, v. 22, 75 (1972).