

УДК 575.24:576.851.48

ГЕНЕТИКА

К. М. ЗЛОТНИКОВ, В. Г. КОСЫХ

ВЛИЯНИЕ МУТАЦИИ *prv*, *ESCHERICHIA COLI* K-12 НА РЕПАРАЦИОННЫЕ СПОСОБНОСТИ КЛЕТОК

(Представлено академиком А. А. Баевым 2 VI 1975)

Предполагается, что механизм генетической коррекции, лежащей в основе аллельных или внутригенных рекомбинаций, аналогичен механизму эксцизионной репарации повреждений ДНК (^{1, 2}). Показано, что *rolA* мутации, приводящие к инактивации в клетке фермента ДНК-полимеразы I, снижают частоту внутригенных рекомбинаций (³). Если учесть известную роль указанного фермента в репарации различных повреждений ДНК (⁴), а также что в основе внутригенных рекомбинаций у *E. coli*, очевидно, лежит механизм генетической коррекции (^{3, 5}), то на основе этих данных можно сделать предположение об участии ДНК-полимеразы I как в репарации, так и в генетической коррекции ДНК. Таким образом, механизмы репарации и коррекции ДНК, помимо внешнего сходства, вероятно, имеют и некоторые общие ферментные системы. Последний вывод представляется важным, так как, во-первых, общность ферментных систем репарации и коррекции ДНК ставит проблему общей регуляции этих процессов в клетке, во-вторых, становится очевидной целесообразность перекрестной проверки мутаций, влияющих на репарационные способности клеток, и мутаций, изменяющих частоту аллельных рекомбинаций. Можно надеяться, что исследования в указанных направлениях будут способствовать успешному изучению как механизма репарации, так и механизма коррекции ДНК.

В связи с вышесказанным, нами было проверено влияние на репарационные способности клеток *E. coli* мутации *prv*, которая как известно (^{3, 6}), повышает частоту внутригенных рекомбинаций.

Эксперименты проводили на изогенных, сконструированных с помощью Р1 трансдукции, штаммах *E. coli* K-12 MEV1K (*thyA*, *drm*, *prv*⁺) и MEV2K (*thyA*, *drm*, *prv*₁), происходящих от штамма ME1 (⁷). В работе использованы минимальные среды М9 (⁸) и М9К (среда М9 с 4 мкг/мл казиминовых кислот и глюкозы и 2 мкг/мл тимина), полноценная среда — мясо-пептонный бульон. Во всех экспериментах бактерии выращивали при 37°. Для определения выживаемости бактерий при у.-ф. облучении соответствующие разведения клеток, выращенных до экспоненциальной стадии роста в среде М9К, высевали на агаризованную полноценную среду (МПА) и облучали бактерицидной лампой БУВ-15 при мощности дозы 7 эрг/мм²·сек. В случае γ-облучения бактерии облучали при 0° в аэробных условиях в фосфатном буфере и высевали на чашки с МПА. Источником γ-лучей служил ⁶⁰Со с мощностью дозы 1290 р/мин. О репарации ДНК после у.-ф. облучения судили по изменению молекулярного веса ДНК в клетках в соответствии с общепринятым методом Мак Граса и Вильямса (⁹) с модификациями Янга и Смита (¹⁰). В случае эксцизионной репарации бактерии выращивали в течение 2—2,5 час. в среде М9К, содержащей ³Н-тимидин (100 мкС/мл, уд. активность 10,9 С/ммоль). После мечения клетки собирали на мембранных фильтрах, отмывали и ресуспендировали в среде М9. Суспензию делили на

две части, одну облучали у.-ф. светом в дозе 845 эрг/мм², другая служила контролем. Контрольные и облученные клетки разбавляли в 2 раза средой М9К, содержащей двойную концентрацию добавок. При изучении пострепликативной репарации ночные культуры засеивали в среды М9К и подращивали в течение 1,5–2 час. Потом клетки собирали на мембранных фильтрах, отмывали и ресуспендировали в среде М9. Часть клеток облучали у.-ф. светом в дозе 390 эрг/мм². Далее контрольные и облученные клетки отмывали и ресуспендировали в среде М9К с тимидином-³Н (500 мкС/мл). Через 10 мин. контрольные и облученные клетки промывали на мембранных фильтрах и ресуспендировали в среде М9К. Клеточную суспензию

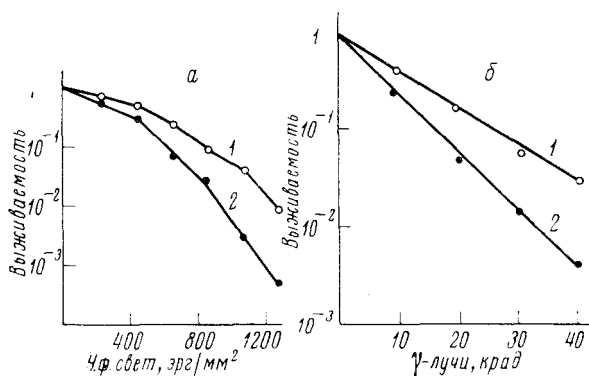


Рис. 1. Чувствительность бактерий *E. coli* K-12 к у.-ф. облучению (а) и к γ-облучению (б). 1 – MEV2K (prv₁), 2 – MEV1K

(10⁶ клеток/мл) наносили на вершину 4,8 мл градиента сахарозы в 0,1 *N* NaOH, куда предварительно наслаивали 0,1 мл 1% саркозила на 0,5 *N* NaOH и 0,01 *M* ЭДТА. Градиенты выдерживали 40 мин. при комнатной температуре, центрифугировали 105 мин. в центрифуге «Beckman L-5» при 30 000 об/мин и 20° в роторе SW 50.1 и раскапывали на бумажные фильтры («Whatman» 3 ММ). Фильтры после высушивания отмывали 5% трихлоруксусной кислотой, спиртом и ацетоном и использовали для определения радиоактивности в сцинтилляционном счетчике. Для анализа распределения ДНК в градиентах щелочной сахарозы в качестве маркера использовали меченную ¹⁴С ДНК фага Т7, которую нам любезно предоставил В. И. Танияшин.

На рис. 1а приведены кривые выживаемости бактерий штаммов MEV1K и MEV2K (prv₁) при у.-ф. облучении, согласно которым клетки штамма MEV2K в 1,5 раза устойчивее к у.-ф., чем клетки контрольного штамма MEV1K. В соответствии с полученными кривыми выживаемости тех же штаммов после γ-облучения (рис. 1б), мутация prv₁ повышает устойчивость бактерий к этому агенту в 1,3–1,4 раза. Мы также обнаружили, что выживаемость мутанта prv₁ более чем в 1,5 раза повышена и при обработке клеток метилметансульфонатом (данные не приводятся). На основе полученных результатов сделано предположение о повышении репарационных способностей клеток мутанта prv₁.

Для проверки этого предположения мы изучили влияние мутации prv₁ на эффективность механизмов эксцизионной (¹¹) и пострепликационной (¹²) репараций при у.-ф. облучении. Как видно из седиментограмм на рис. 2А, при дозе у.-ф. света 845 эрг/мм² ДНК контрольного штамма MEV1K после 60 мин. инкубации клеток остается низкомолекулярной, тогда как ДНК из штамма MEV2K (prv₁) после 60 мин. инкубации клеток располагается в области высокомолекулярной ДНК. Следовательно, скорость исчезновения образующихся при темновой репарации повреж-

дений ДНК в клетках мутанта *rgv₁* выше, чем в клетках дикого штамма. Отсюда можно сделать вывод, что мутация *rgv₁* вызывает повышение эффективности эксцизионной репарации.

В случае пострепликативной репарации мутация *rgv₁* влияет аналогичным образом. Действительно, практически вся меченная после у.-ф. облучения (390 эрг/мм²) ДНК из штамма MEV2K(*rgv₁*) после 30 мин. инкубации клеток располагается в области фракций высокомолекулярной ДНК, тогда как ДНК из контрольного штамма MEV1K при тех же условиях располагается в основном в области фракций низкомолекулярной ДНК (рис. 2Б). Следовательно, у мутанта *rgv₁* выше и эффективность постреп-

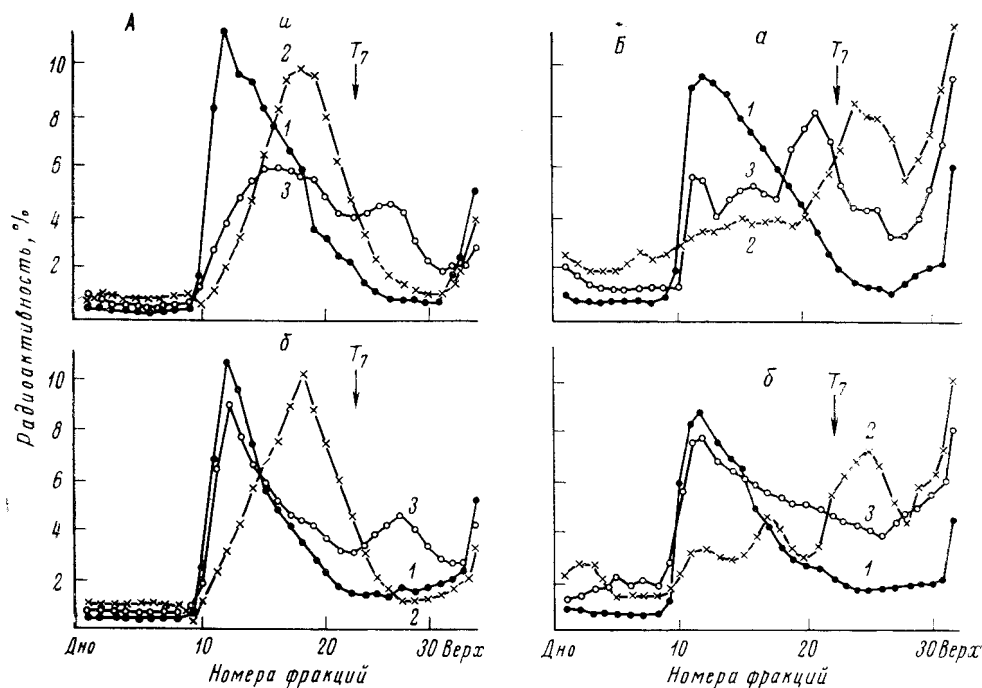


Рис. 2. Седиментограммы однотяжевой ДНК клеток MEV1K (а) и MEV2K (б), предварительно меченной ³H-тимидином (А) и меченной ³H-тимидином после у.-ф. облучения (Б), в зависимости от времени пострадиационной инкубации клеток. 1 — ДНК необлученных клеток. А: 2 — ДНК клеток, облученных в дозе 345 эрг/мм², 3 — облученных после инкубирования в течение 60 мин; Б: 2 — ДНК клеток, облученных в дозе 390 эрг/мм², 3 — облученных после инкубирования в течение 30 мин. Стрелкой указано положение первого момента кривой седиментационного распределения ДНК фага T7

ликативной репарации повреждений ДНК, образующихся при синтезе ДНК на матрице, содержащей тиминовые димеры.

В соответствии с имеющимися данными, мутация *rgv₁* повышает как частоту аллельных рекомбинаций (³, ⁶), так и эффективность репарации ДНК. Кроме того, мутация *rgv₁* повышает также темп спонтанного мутирования бактериальных генов (¹³). В настоящее время нам не представляется возможным объяснить молекулярные основы этого сложного фенотипического проявления мутаций *rgv*. Для такого объяснения, по-видимому, прежде необходимо будет изучить у мутантов *rgv* количественный уровень и активность репарирующих ДНК ферментов и, возможно, некоторые аспекты репликации ДНК.

В заключение, отметим, что полученные нами данные о повышении репарационных способностей и уровня выживаемости клеток под влиянием мутации *rgv₁* позволяют считать ген *rgv* единственным известным у *E. coli* геном, мутирование которого приводит к повышенной резистентности бактерий к поражающим ДНК факторам.

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов
Академии наук СССР
Пуцдино Московской обл.

Поступило
26 V 1975

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ I. R. S. Fincham, R. Holliday, Mol. Gen. Genet., v. 109, 309 (1970). ² В. В. Кушев, Механизмы генетической рекомбинации, Л., «Наука», 1971. ³ К. М. Злотников, М. И. Хмельницкий, Генетика, т. 10, № 11, 71 (1974). ⁴ M. Goulian, Progr. in Nucl. Acid. Res. and Mol. Biol., v. 12, 29 (1972). ⁵ I. P. Crawford, B. Wang, Genetics, v. 77, Suppl. 1, Part 2, 14 (1974). ⁶ К. М. Злотников, М. И. Хмельницкий, ДАН, т. 209, 717 (1973). ⁷ G. B. Smirnov, E. V. Filkova, A. G. Skavronskaya, Mol. Gen. Genet., v. 126, 255 (1973). ⁸ Сб. методик по генетике микроорганизмов, М., «Медицина», 1970. ⁹ R. A. McGrath, R. W. Williams, Nature, v. 212, 532 (1966). ¹⁰ D. A. Youngs, R. C. Smith, J. Bacteriol., v. 116, 175 (1973). ¹¹ R. B. Setlow, W. L. Carrier, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., v. 51, 226 (1964). ¹² W. D. Rupp, P. Howard-Flanders, J. Mol. Biol., v. 31, 291 (1968). ¹³ М. И. Хмельницкий, К. М. Злотников, Генетика, т. 10, № 12, 110 (1974).