

В. Д. ЖЕСТЯНИКОВ, Г. Е. САВЕЛЬЕВА

УЧАСТИЕ ПРОДУКТА ГЕНА *dnaG*⁺ В РЕПАРАЦИИ
ГАММА-ИНДУЦИРОВАННЫХ ПОВРЕЖДЕНИЙ ДНК
У *ESCHERICHIA COLI*

(Представлено академиком Н. П. Дубининым 22 IX 1975)

Репарация повреждений ДНК, вызываемых у *Escherichia coli* редко-ионизирующими излучениями, осуществляется с участием ряда ферментов и генных продуктов: ДНК-полимеразы I, ДНК-лигазы, экзонуклеазы V, продуктов генов *exr*(*lex*), *гесА*, *гесF* (¹). Показано также, что в этот процесс вовлечены обязательные компоненты репликаций ДНК: реплицирующий фермент ДНК-полимераза III и продукт гена *dnaB*, контролирующего элонгацию нитей (^{2, 3}). Задачей данной работы было исследовать роль в репарации гамма-индуцированных повреждений другого генного продукта, участвующего в репликации ДНК, — продукта гена *dnaG*, контролирующего инициацию синтеза фрагментов Оказаки (⁴). С этой целью исследованы выживаемость, синтез и деградация ДНК и репарация однонитевых разрывов в гамма-облученных клетках *Escherichia coli* PC3 с термочувствительной мутацией в гене *dnaG* в условиях активной работы этого гена при 30° и при выключенной активности в условиях непермиссивной температуры 43°.

Работа проведена со штаммами *E. coli* PC3 *dnaG*^{ts} *leu*⁻ *thy*⁻, полученными от К. Ларка (⁴), и его терморезистентным ревертантом TR-9, полученным в настоящей работе. Для изучения бактерий, находящихся в стационарной фазе роста, клетки выращивали на агаризованной полной питательной среде (пептонный агар с рыбкоостной мукой — РКА) при 30° в течение 18–20 час. Взвесь бактерий 5 · 10⁸ кл/мл облучали гамма-лучами ¹³⁷Cs на установке ЛМБ-γ-1 (мощность дозы 2,8 крад/мин) при температуре таящего льда. Контрольные и облученные бактерии высевали на РКА и инкубировали либо весь срок при 30°, либо сначала 4 часа при 43°, а затем при 30° до образования макроколоний. Выживаемость бактерий в логарифмической фазе роста определяли следующим образом. Клетки выращивали в жидкой глюкозе — минимальной среде М-9 с добавлением казаминовых кислот (2 мг/мл), лейцина (10 мкг/мл) (основная среда — о.с.) и тимина (4 мкг/мл) с аэрацией при 30° в течение 2 час. После центрифугирования и ресуспендирования бактерий в свежей о.с. или в воде клетки облучали, затем одну часть облученных и контрольных пробирок инкубировали при 30°, а другую — при 43° в течение 2 час. Высев производили на РКА, посевы инкубировали при 30° до образования макроколоний. Для изучения синтеза ДНК бактерии выращивали в течение 1–2 час. в о.с. с добавлением меченого тимина при 30°. Бактерии, отмытые и ресуспендированные в среде М-9 без глюкозы, облучали при температуре таящего льда. Затем в среду добавляли глюкозу, казаминовые кислоты, лейцин, тимин (2 мкг/мл) и ³H-тимидин (специфическая активность 20 С/ммол, 5 мкС/мл). В ходе инкубации необлученных и облученных бактерий при 30 и 43° при аэрации отбирали пробы по 0,04 мл на диски из фильтровальной бумаги, которые сразу же помещали в холодную трихлоруксусную кислоту (5%) на 30 мин., затем промывали холодной водой, 95% этанолом и эфиром. Для исследования деградации ДНК клетки выращивали в о.с. с ³H-тимидином (10 мкС/мл) при 30°, затем на 15 мин. добавляли немеченый тимин 100 мкг/мл. Отмытые и ресуспендированные в М-9 бактерии облучали на холоду. Во взвесь облученных клеток добавляли каза-

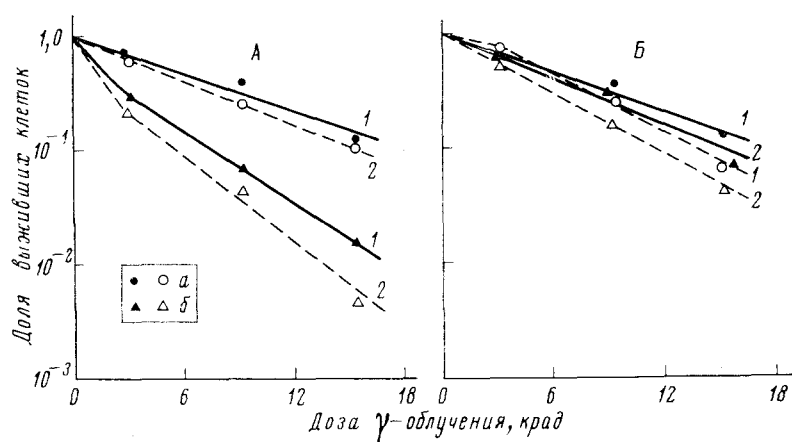


Рис. 1. Выживаемость *E. coli* PC3 *dnaG^{ts}* (А) и терморезистентного ревертанта TR-9 (Б) при гамма-облучении. 1 — клетки в стационарной фазе; 2 — клетки в логарифмической фазе. а — инкубация при 30°; б — предварительное выдерживание клеток при 43°, последующее — при 30°. Детали методики см. в тексте

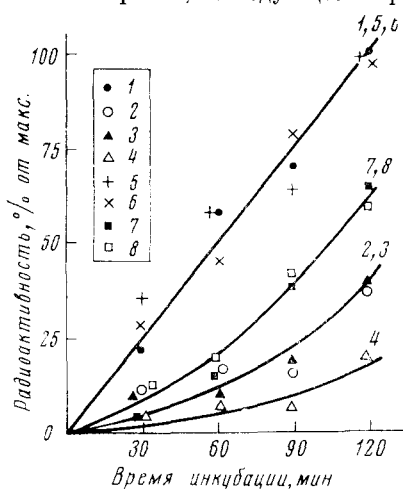


Рис. 2

Рис. 2. Синтез ДНК (включение ^3H -тимидина в кислотонерастворимую фракцию) в клетках штаммов PC3 *dnaG^{ts}* (1-4) и TR-9 (5-8). 1, 4 — необлученные клетки, инкубация при 30°; 2, 5 — необлученные клетки, инкубация при 43°; 3, 6 — облучение в дозе 14,5 крад, инкубация при 30°; 4, 8 — облучение в дозе 14,5 крад, инкубация при 43°. Радиоактивность (имп/мин) нормирована к уровню максимального включения

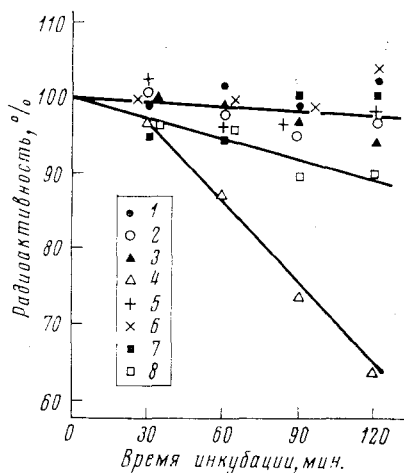


Рис. 3

Рис. 3. Дегградация ДНК в клетках штаммов PC3 *dnaG^{ts}* и TR-9, 1-8 — см. подпись к рис. 2. Радиоактивность в начальный момент инкубации принята за 100%

миновые кислоты, лейцин и немеченый тимин (10 мкг/мл). Облученные и контрольные клетки инкубировали при 30 и 43°. Пробы отбирали как описано выше. Для исследования репарации однонитевых разрывов ДНК бактерии выращивали в о.с. с добавлением ^3H -тимидина (10 мкС/мл) при 30° в течение 2 час. Отмытые и ресуспендированные в о.с. с немеченым тимином (4 мкг/мл) бактерии облучали при температуре таящего льда. Контрольные, облученные неинкубированные и облученные инкубированные в ростовой среде с аэрацией при 30 и 43° клетки лизировали на поверхности 4,8 мл изокинетических градиентов щелочной сахарозы с начальной концентрацией 5% (лизис в 1% саркозиле в 0,5 N NaOH). После центрифугирования при 33 000 об/мин. при 20° 85 мин. в роторе SW-65 центрифуги L2-65 «Spinko» градиенты фракционировали

(по времени) на диски из фильтровальной бумаги, промывали холодными 5% трихлоруксусной кислотой и этанолом. Кислотонерастворимую радиоактивность измеряли в стандартном толуольном сцинтилляторе на счетчике «Nuclear Chicago Mark II».

Выживаемость гамма-облученных клеток штамма PC3, несущего термочувствительную мутацию в гене *dnaG*, как видно из рис. 1А, зависит от температурных условий пост-радиационной инкубации. Более высокая выживаемость наблюдается при росте в условиях перmissive температуры 30°, пониженная — при предварительном выдерживании посевов 4 часа или взвеси бактерий 2 часа при температуре 43°. Различия почти отсутствуют у терморезистентного ревертанта TR-9 (рис. 1Б). Выживаемость клеток в логарифмической фазе роста во всех случаях несколько ниже таковой клеток, находящихся в стационарной фазе роста.

Аналогичный эффект имеет место при исследовании синтеза ДНК (рис. 2). В условиях неpermissive температуры в необлученных клетках штамма PC3 *dnaG^{ts}* уровень синтеза ДНК, судя по включению ³H-тимидина в кислотонерастворимую фракцию, через 2 часа инкубации составляет 1/3 от уровня синтеза ДНК при инкубации в условиях 30°, тогда как у штамма TR-9 синтез ДНК при 30 и 43° одинаков. Скорость синтеза ДНК в необлученных клетках при 30 и 43° коррелирует с выживаемостью: последняя у штамма PC3 *dnaG^{ts}* при выдерживании бактерий на средах или во взвеси в воде при 43° снижается примерно на 1/3. Облучение в дозе 14,5. Облучение в дозе 14,5 крэд существенно подавляет скорость синтеза ДНК, особенно в клетках, инкубируемых при неpermissive температуре. У терморезистентного ревертанта интенсивность включения радиоактивного тимидина в кислотонерастворимую фракцию при 30 и 43° одинакова и в 1,5 раза выше, чем в клетках термочувствительного мутанта, инкубированного после облучения в дозе 14,5 крэд при 30°.

Рис. 3 показывает характер деградации ДНК (потерю радиоактивного тимидина кислотонерастворимой фракцией) в клетках штамма PC3 *dnaG^{ts}* и его терморезистентного ревертанта. При неpermissивных условиях облученный штамм PC3 теряет 36% радиоактивности, тогда как у облученного ревертанта TR-9 деградирует всего 10% ДНК.

На рис. 4 представлены седиментограммы одного из 11 опытов, в которых исследована репарация односторонних разрывов ДНК в клетках мутанта PC3 *dnaG^{ts}*. Видно, что индуцированные гамма-облучением в дозе

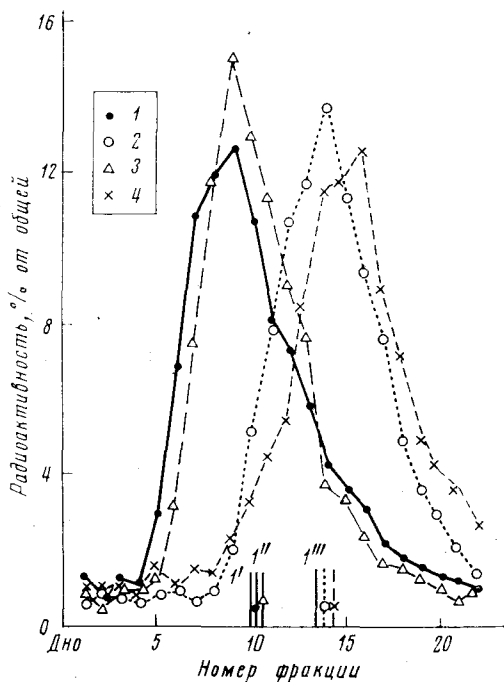


Рис. 4. Профили седиментации ДНК из клеток штамма PC3 *dnaG^{ts}* предварительно меченной ³H-тимидином, в градиентах щелочной сахарозы. 1 — необлученные клетки, неинкубированные; 2—4 — облучение в дозе 14,5 крэд: 2 — без инкубации, 3, 4 — инкубация 60 мин. при 30 и 43° соответственно. Указано положение первого момента (²) соответствующей седиментограммы. I', I'' — необлученные клетки, инкубация 90 мин. при 30 и 43° соответственно; I''' — необлученные клетки штамма TR-9, инкубация 60 мин. при 43°

14,5 крад однонитевые разрывы ДНК эффективно репарируются при 30°, но не репарируются при 43°. В остальных однотипных опытах получены такие же результаты. Репарация в условиях температуры 30° завершается через 15–20 мин. после облучения. Существенно, что у штамма РСЗ *dnaG^{ts}* не происходит спонтанное фрагментирование ДНК при 90-минутной инкубации при 30 и 43° (рис. 4), наблюдавшееся у терморезистентного ревертанта TR-9. Последнее обстоятельство не позволяет оценить восстановление молекулярного веса ДНК в клетках штамма TR-9 после облучения. Аналогичное спонтанное снижение молекулярного веса ДНК ранее наблюдали у штамма FA22 *dnaB^{ts}* (3).

Таким образом, в опытах со штаммом *E. coli* РСЗ *dnaG^{ts}* и его терморезистентным ревертантом TR-9 репарация однонитевых разрывов ДНК (только у термочувствительного штамма) в условиях перmissive температуры сопровождалась восстановлением жизнеспособности облученных бактерий, восстановлением синтеза и снижением деградации ДНК. Эти данные указывают на необходимость активного продукта гена *dnaG⁺* для репарации ДНК в гамма-облученных клетках бактерий *E. coli*.

Продукты генов *dnaG* (3) и *dnaB* (3), по-видимому, как и ДНК-полимеразы I и III (1, 2), необходимы для осуществления репаративной репликации, предшествующей завершающему репарацию ковалентному соединению репарированного фрагмента ДНК с основной нитью, катализируемому ДНК-лигазой.

Сопоставление возобновления синтеза ДНК и репарации однонитевых разрывов во времени позволяют полагать, что эти процессы разобщены. Репарация разрывов после облучения в дозе 14,5 крад завершается через 15–20 мин., когда синтез ДНК в облученных клетках составляет лишь 25% от уровня синтеза ДНК в контроле. У штамма *E. coli* BT 1026 *polAI dnaE^{ts}*, облученного гамма-лучами в меньшей дозе (8,9 крад), уровень синтеза ДНК через 60–120 мин. инкубации при 30° составляет также около 1/4 от его уровня в необлученных клетках (2). Вероятная независимость репарации однонитевых разрывов от репликативного синтеза ДНК позволяет предполагать, что не репликация является пусковым моментом этого типа репарации.

Выше была отмечена пониженная жизнеспособность клеток штамма РСЗ *dnaG^{ts}*, выдержанных несколько часов в условиях неперmissive температуры. Этот факт дает основание для предположения, что вне облучения продукт гена *dnaG⁺*, помимо участия в репликации, выполняет репарирующие функции, устраняя спонтанно возникающие повреждения в ДНК. По-видимому, такую же двойную роль в интактных клетках играют ДНК-полимераза III и ДНК-лигаза. ДНК-полимераза III, как известно, необходима не только для репарации гамма-индуцированных повреждений (2), но и для эксцизионной репарации (6) и ликвидации пострепликативных пробелов в у.-ф.-облученных клетках *E. coli* (7, 8).

Вовлечение одних и тех же ферментов и генных продуктов в репарации ДНК указывает на их участие в поддержании стабильности ДНК в интактной и поврежденной излучениями клетке.

Авторы приносят благодарность доктору К. Ларку за предоставление штамма РСЗ.

Институт цитологии
Академии наук СССР
Ленинград

Поступило
22 IX 1975

ЛИТЕРАТУРА

- ¹ C. D. Town, K. C. Smith, H. S. Kaplan, *Current Topics Radiat. Res. Quart.*, v. 8, 351 (1973). ² N. V. Tomilin, *Molec. Gen. Genet.*, v. 129, 97 (1974). ³ W. L. Fagman, M. Russel, *Molec. Gen. Genet.*, v. 110, 332 (1971). ⁴ K. G. Lark, *Nature New Biol.*, v. 240, 237 (1972). ⁵ H. S. Kaplan, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, v. 55, 1442 (1966). ⁶ D. A. Youngs, K. C. Smith, *Nature New Biol.*, v. 244, 240 (1973). ⁷ N. V. Tomilin, M. P. Svetlova, *FEBS Letters*, v. 43, 185 (1974). ⁸ S. G. Sedgwick, B. A. Bridges, *Nature*, v. 249, 348 (1974).