

УДК 575.24

Л. А. РУХКЯН, В. Н. СОИФЕР

ПОВРЕЖДЕНИЯ СТРУКТУРЫ ДНК НИТРОЗОГУАНИДИНОМ

Изучалось действие нитрозогуанидина на структуру ДНК бактерий и роль репарирующих ферментов в этом процессе. Были использованы бактерии *E. coli* *uvr*⁺ (AB 1157), *E. coli* *uvr*⁻ (AB 1886), а также *E. coli* *гес*⁻ (2487). Сделано предположение, что индукция однонитевых разрывов в ДНК бактерий обусловлена действием самого нитрозогуанидина, а не продуктов его распада в клетках.

Среди химических мутагенов широкое применение нашел нитрозогуанидин. Важной особенностью действия нитрозогуанидина является его высокая мутагенная активность во время репликации ДНК и относительно низкая мутагенная активность при обработке покоящейся ДНК [1]. В то же время действие этого мутагена на макромолекулярную структуру реплицирующейся и покоящейся ДНК недостаточно изучено, совершенно неясно, например, изменяется ли модифицированная нитрозогуанидином ДНК с помощью внутриклеточных репарирующих ферментов. Полученные рядом авторов данные о репарируемости нитрозогуанидиновых поражений носят противоречивый характер [2, 3].

Цель настоящей работы заключалась в изучении влияния нитрозогуанидина на структуру ДНК бактерий и роли репарирующих ферментов в этом процессе.

Материал и методика. Для исследований использовали бактерии *E. coli* *uvr*⁺ (AB 1157), *E. coli* *uvr*⁻ (AB 1886), а также *E. coli* *гес*⁻ (2487), любезно предоставленные нам проф. П. Говард-Фландерсом и К. Смитом (США). Было проанализировано появление однонитевых разрывов в ДНК неделящихся бактерий *E. coli* *uvr*⁺ и *E. coli* *uvr*⁻ подвергнутых действию нитрозогуанидина.

Для создания градиента щелочной сахарозы применяли раствор сахарозы, приготовленный в буфере (0,1М NaOH; 0,7М NaCl; 0,01М трис—0,0001М ЭДТА). Градиент наслаивали с помощью градиент-формера фирмы Бекман (США). Центрифугирование проводили при 20° в роторе SW-50. 1 в ультрацентрифуге Спинко L2—65 при 30 тыс. об/мин. По окончании центрифугирования содержимое пробирок фракционировали с помощью устройства для фракционирования фирмы Бекман, соединенного с перистальтическим насосом «Мультиперпекс» (фирма LKB, Швеция). Фракции по 3 капли собирали на бумажные диски диаметром 25 мм (Ватман-3ММ, Англия). Диски высушивали, промывали 5-процентной трихлоруксусной кислотой и водой и подсчитывали радиоактивность в голубовом сцинтиляторе (радиоспектрометр Mark II, Nuclear Chicago).

Результаты и обсуждение. Проведенные эксперименты показали, что обработка бактерий, большая часть которых не делится в момент обработки, приводит к возникновению в структуре ДНК большого числа однонитевых разрывов, что выявляется с помощью ультрацентрифугирования денатурированной щелочью ДНК в градиенте сахарозы (рис. 1).

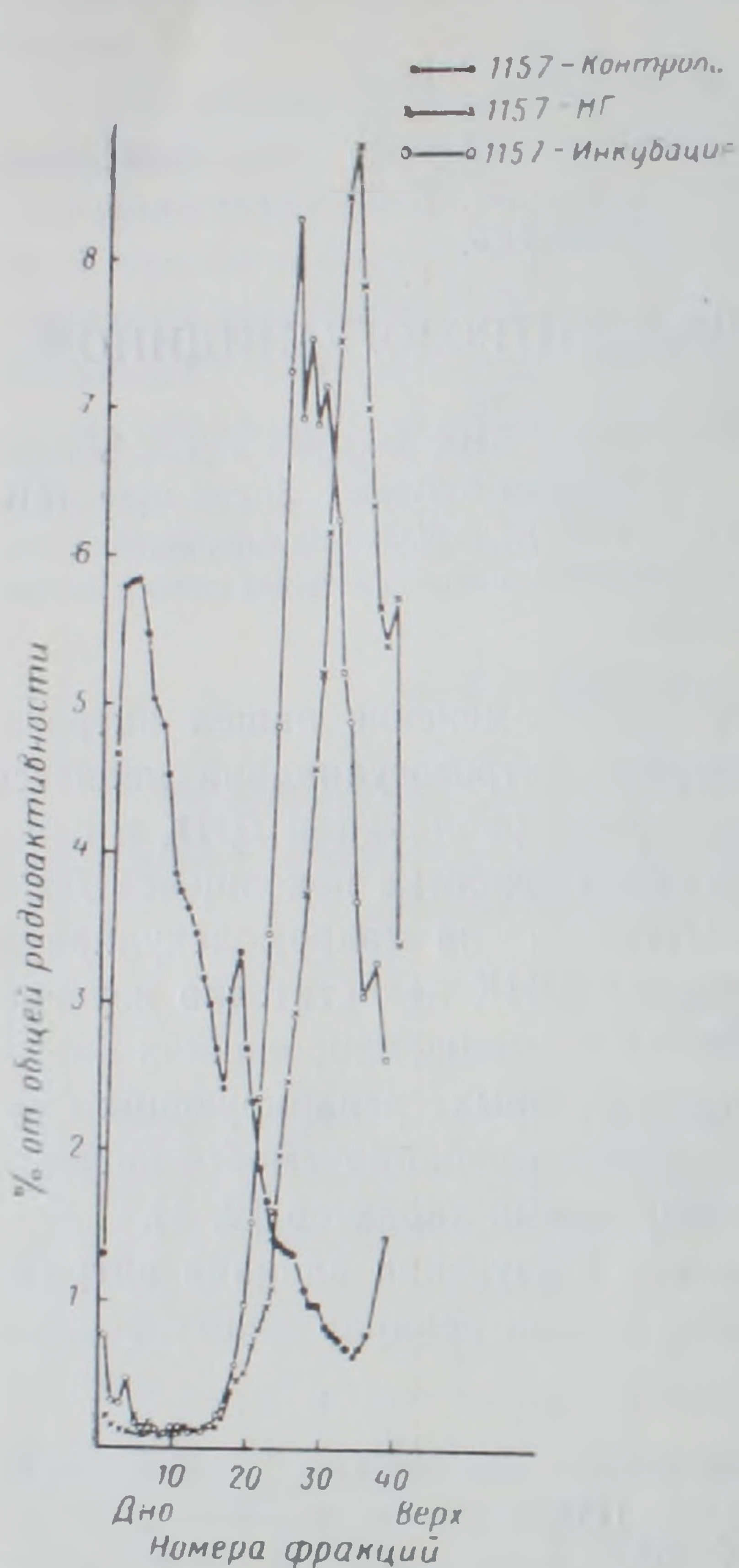


Рис. 1.

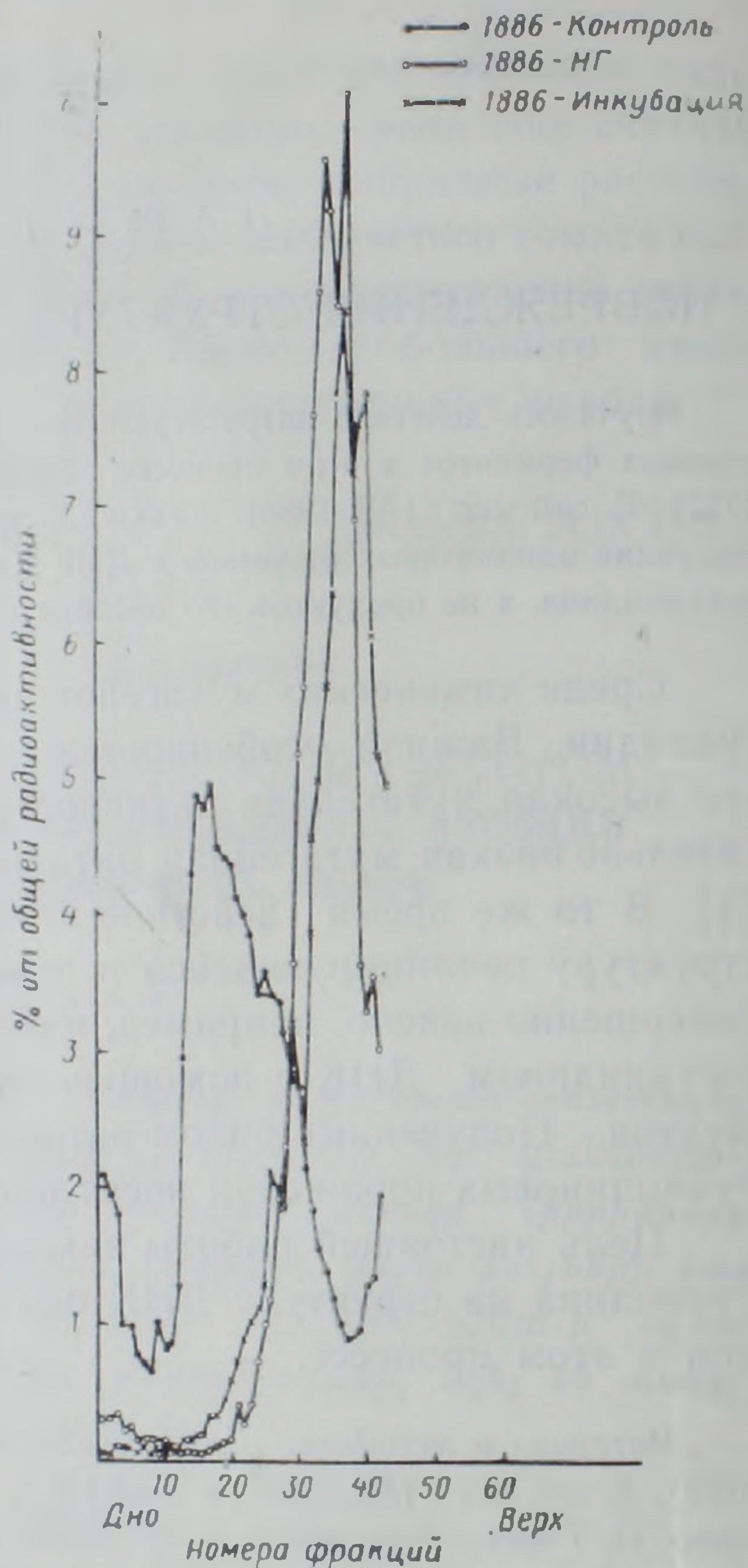


Рис. 2.

Рис. 1. Действие нитрозогуанидина на *E. coli* K 12 (1157) uvr^+

Рис. 2. Действие нитрозогуанидина на *E. coli* K 12 (1886) uvr^-

Возникновение однонитевых разрывов в ДНК могло быть обусловлено действием не самого нитрозогуанидина или продуктов его распада в клетке, а активностью репарирующих ферментов, устраняющих из ДНК поврежденные основания (например, димеры тимина или алкилированные основания) и оставляющих после этого бреши в структуре ДНК. Для проверки этого предположения были поставлены специальные эксперименты. Однако эти опыты с бактериями *E. coli* uvr^- , дефектными по ферменту, выполняющему репарационное вырезание поврежденных участков из ДНК в ходе репарации (УФ-специфическая эндонуклеаза), показали, что этот фермент не принимает участия в формировании разрывов. Профиль седиментации ДНК, выделенной из клеток uvr^- А6, обработанных нитрозогуанидином, не отличался от профиля ДНК нормальных по репарации бактерий (рис. 2).

Не оказывают влияния на структуру ДНК бактерий, обработанных нитрозогуанидином, и ферменты, обеспечивающие свойство рекомбина-

ции. Опыты с бактериями *E. coli* гес⁻, неспособными осуществлять нормальную рекомбинацию, выявили примерно такое же количество разрывов ДНК под действием нитрозогуанидина (рис. 3).

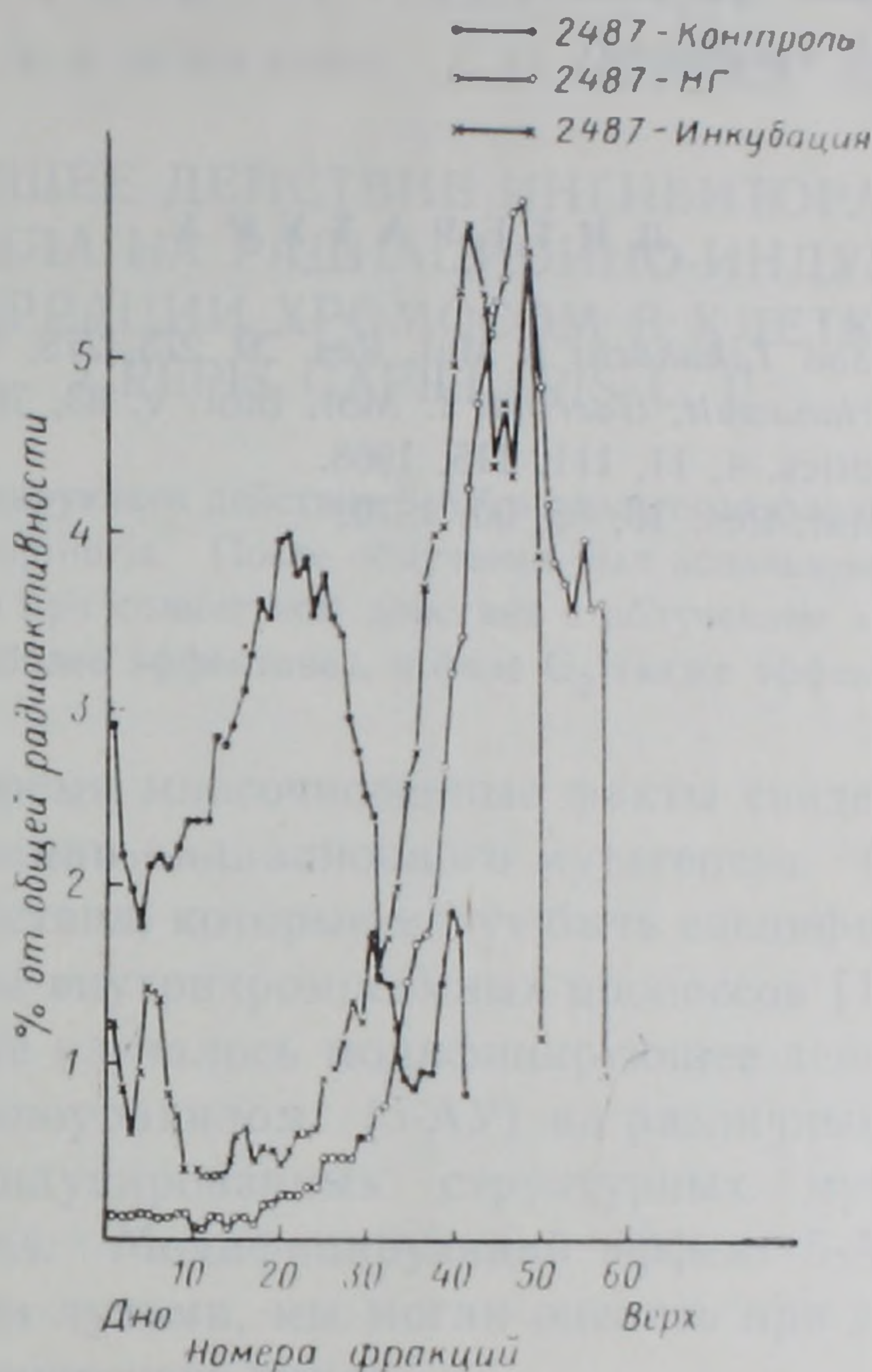


Рис. 3. Действие нитрозогуанидина на *E. coli* K 12 гес⁻ (2487).

Таким образом, возможно, что индукция односторонних разрывов в ДНК бактерий обусловлена действием самого нитрозогуанидина. Трудно также предположить, что в наших опытах на ДНК оказывал действие не сам нитрозогуанидин, а продукты его распада в клетках (в частности диазометан), так как наши опыты проводились при pH 6,0, при котором, как известно, нитрозогуанидин относительно стабилен [2]. Возможно, появление брешей связано с депуринизацией ДНК под действием нитрозогуанидина, описанной Колбом и Каудевитцем [4].

ВНИИ прикладной молекулярной биологии
и генетики ВАСХНИЛ, Москва

Поступило 29.IX 1975 г.

Л. А. АНТОНОВ, Ч. Б. САНДЕР

ԴՆԹ-Ի ԿԱՌՈՒՅՎԱԾՔԻ ՎՆԱՍՈՒՄԸ ՆԻՏՐՈԶՈԳՈՒԱՆԻՆԻՆՈՎ

Ա Մ Փ Ո Փ Ո Ն Մ

Փորձերը ցույց են տվել, որ բակտերիաների մեծ մասը, նիտրոզոգուանին-
դինով մշակման ընթացքում չեն բաժանվում, մշակումից հետո ԴՆԹ կա-

ռուցվածքում առաջանում են մեծ թվով միաթելանի կտրվածքներ: Դա հայտնաբերվում է սախարոզայի պրադիենտում հիմքով դենատուրացված ԴՆԹ-ի ուլտրացենտրաֆուգացիայի օգնությամբ:

Միաժամանակ ապացուցվել է, որ բակտերիաների միաթելանի կտրվածքների ինդուկցիան պայմանավորված է հենց նիտրոդոզուանիդինով և ոչ թե նրա քայքայման նյութերով:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Herrington M. B. and Takahachi I. Mut. Res. 20, 275, 278, 1974.
2. Gerda Olmeda E., Hanawalt, Guerola. I. Mol. Biol. v. 33, 705, 715, 1968.
3. Skavronskaja. Genetics, 4, 11, 111, 115, 1968.
4. Kolb, Kaudowitz. Mut. Res. 10, 85, 90, 1970.