

Н. И. ЯКОВЛЕВА, Л. А. РУХКЯН, В. Н. СОИФЕР

ОБРАЗОВАНИЕ ОДНОНИТЕВЫХ РАЗРЫВОВ В ДНК БАКТЕРИЙ, НОРМАЛЬНЫХ И ДЕФЕКТНЫХ ПО УФ-СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ЭНДОНУКЛЕАЗЕ, ОБРАБОТАННЫХ ОДНОМОЛЯРНЫМ ГИДРОКСИЛАМИНОМ

Установлено, что обработка *E. coli* uvr⁺ и *E. coli* uvr⁻ гидроксиламином приводит к возникновению в ДНК сходного числа однонитевых разрывов как в кислородной среде, так и в условиях аноксии. Однонитевые разрывы, образующиеся в ДНК этих клеток после обработки их гидроксиламином в среде с достаточно высоким осмотическим давлением, возможно, обусловлены опосредованным действием каких-то ферментов.

Гидроксиламин широко используется как мутаген в экспериментах с вирусами и прокариотами [5, 9, 14], клетками культуры тканей млекопитающих и человека [1, 8, 13, 15] и растениями [7, 10, 11]. В серии экспериментов с бактериофагами лямбда, обрабатывавшимися внеклеточно гидроксиламином, а затем в опытах с бактериями *E. coli* uvr⁺ А⁺ и uvr⁻ А⁻ было установлено, что повреждения ДНК, вызванные гидроксиламином, не репарируются с участием uvr⁺ А-гена [2, 16, 17]. Было также показано, что обработка 1-молярным гидроксиламином ингибирует синтез ДНК [3], причем задержка синтеза продолжается в течение 2—3 часов после удаления его из культуральной среды. Одна из возможных причин ингибирования синтеза ДНК может быть связана с нарушениями ее вторичной структуры (в частности, с появлениями однонитевых разрывов в молекулах ДНК), препятствующими нормальной работе ДНК-полимераз.

В связи с этим представляло интерес выяснить, во-первых, вызывает ли обработка растворами 1 М гидроксиламина появление однонитевых разрывов в структуре ДНК бактерий перед началом их репликации и, во-вторых, связано ли восстановление синтеза ДНК с процессом репаративного устранения из ДНК этих нарушений. Поскольку действие гидроксиламина может быть опосредовано через образование перекисных соединений, были проведены аналогичные опыты в условиях аноксии (пробулькивание азота через инкубационную среду с клетками).

Материал и методика. Для исследований использовали бактерии *E. coli* uvr⁺ thy⁺ (АВ 1157), *E. coli* uvr⁺ thy⁻ (АВ 2497), *E. coli* uvr⁻ thy⁺ (АВ 1886) и *E. coli* uvr⁻ thy⁻ (АВ 2500), любезно предоставленные нам проф. К. Смитом (США). Методы выращивания бактерий и применявшиеся среды описаны ранее [3]. Исследовали дважды перекристаллизованные препараты солянокислого гидроксиламина (Koch Light,

Англия). Бактерии выращивали в синтетической среде с H^3 -тимидином (2 мкюри/мл до концентрации $5 \cdot 10^7$ — $4 \cdot 10^8$ клеток/мл), затем их отмывали, ресуспендировали в минеральной среде [3], выдерживали 1 час при температуре 25°C и обрабатывали раствором 1 М гидроксиламина в 1 М NaCl (pH 6,6—7,0) в течение часа при $t = 25^\circ\text{C}$. Бактерии осаждали центрифугированием для удаления гидроксиламина, ресуспендировали в буфере 0,015 М ЭДТА+0,15 М NaCl, дважды центрифугировали и ресуспендировали в 0,3 мл 20% сахарозы+0,05 М трис-HCl (Koch Light)—pH 8,0, переносили в водяную баню (37°C), добавляли 1 мл лизоцима фага T4 (Calbiochem) в конечной концентрации 100 мкг/мл, через 2 мин добавляли 0,1 мл проназы (Calbiochem, V. grate)—в конечной концентрации 200 мкг/мл и еще 2 мин 0,05 мл 2% раствора натрий додецилсульфата (N. V. C. США). После 30-минутной инкубации при 37°C полученные сферопласты (0,1 мл) наслаивали на щелочной сахарозный градиент (5—20%), на который предварительно было нанесено 0,1 мл 1 N NaOH в 4% сахарозе. Для создания градиента применяли раствор сахарозы, приготовленный в буфере (0,1 М NaOH; 0,7 М NaCl; 0,01 М трис HCl; 0,0001 М ЭДТА). Градиент наслаивали с помощью градиент-формера фирмы Бекман (США). Центрифугирование проводили при 20°C в роторах SW 41 и SW 50.1 в ультрацентрифуге Спинко—L 2—65 при 30 тыс. об/мин в течение 75 мин. По окончании центрифугирования (содержимое пробирок фракционировали с помощью устройства для фракционирования (форма Бекман), соединенного с перистальтическим насосом «Мультиперпекс» (фирма LKB, Швеция).

Фракции (по 3 капли) собирали на бумажные диски диаметром 25 мм (Ватман 3 ММ, Англия). Диски высушивали, промывали 5% трихлоруксусной кислотой и водой, затем подсчитывали радиоактивность в толуоловом сцинтиллаторе [4] (радиоспектрометр Mark-11, Nuclear Chicago).

Результаты и обсуждение. Полученные данные показали, что обработка бактерий *E. coli* раствором 1 М гидроксиламина в среде 1 М NaCl приводит к возникновению в ДНК большого числа одонитевых разрывов (рис. 1). На количество возникающих разрывов не оказывает влияния цит А-ген, поскольку в экспериментах был обнаружен сходный профиль седиментограмм ДНК бактерий линии АВ 1157 с нормальными репарирующими ферментами и ДНК бактерий линии АВ 1886 (мутант по цит А-гену).

В тех опытах, где обработанные гидроксиламином бактерии инкубировались в течение 2 час. после удаления гидроксиламина из среды с помощью двукратного центрифугирования суспензии клеток, не было замечено существенного изменения профиля седиментограмм. В этих опытах также не выявились различия в поведении клеток с нормальным геном цит⁺ и клеток с дефектом по УФ-специфичной эндонуклеазе (клетки цит А6). Эти данные не подтверждают предположение о том, что в ходе инкубирования обработанных гидроксиламином клеток может происходить устранение из ДНК одонитевых разрывов за счет активности ферментов эксцизионной репарации.

Известно, что разбавленные водные растворы гидроксиламина индуцируют в клетках и во внеклеточной среде образование перекисей [12], которые могут инактивировать клетки и способствовать появлению мутаций. В то же время известно [6], что мутагенное действие, вызываемое обработкой бактериофагов разбавленными растворами гидроксиламина ($1 \cdot 10^{-3}$ и $5 \cdot 10^{-3}$ М), ингибируется пробулькиванием азота через фаговую суспензию или путем обработки суспензии катала-

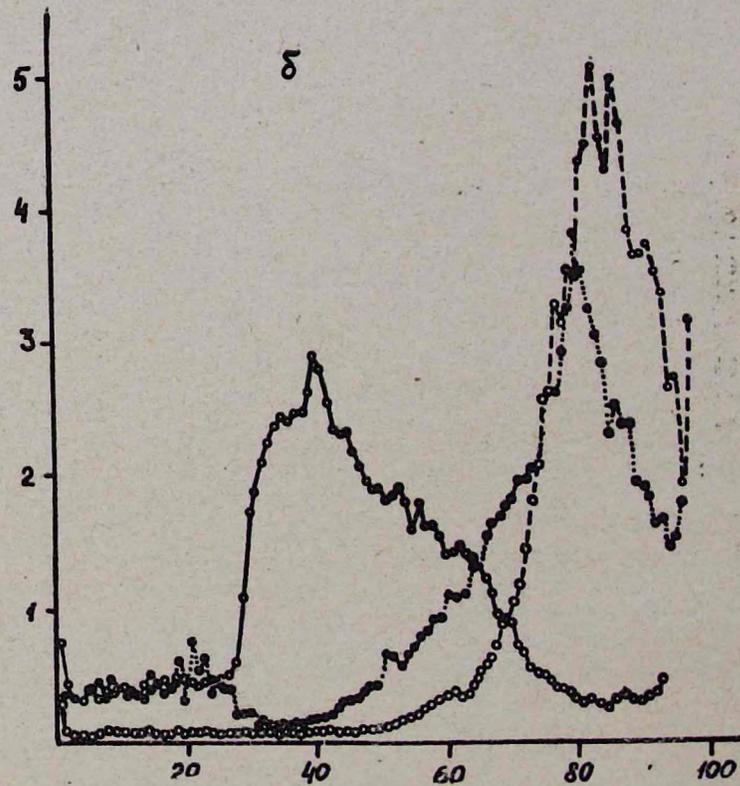
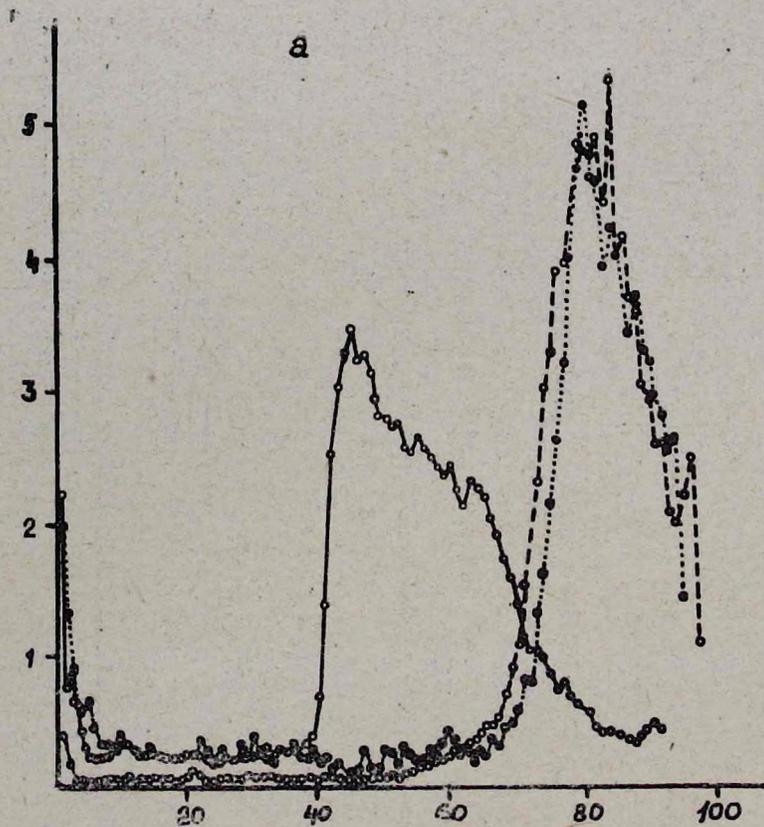


Рис. 1. Седиментограммы ДНК, выделенных из бактерий АВ 2497 и АВ 2500, обработанных гидроксиламином в среде с кислородом, а — бактерии *E. coli* K 12 *uvr*⁺ (АВ 2497); б — бактерии *E. coli* K 12 *uvr*⁻ (АВ 2500). ○—○ контроль; ○— — ○ обработка 1 М гидроксиламином; ● ··· ··· ● 2-часовая инкубация клеток в ростовой среде после обработки их гидроксиламином. По оси абсцисс—номера фракций, по оси ординат — доля от общей радиоактивности, %.

зой, в то время как мутагенный эффект 1-молярного раствора гидроксилламина не зависит от присутствия кислорода в среде и не изменяется при замене его азотом. Полученные данные показали (рис. 2), что замена не сказывается существенно на числе возникающих в ДНК однонитевых разрывов. Профили седиментограмм оказались аналогичными

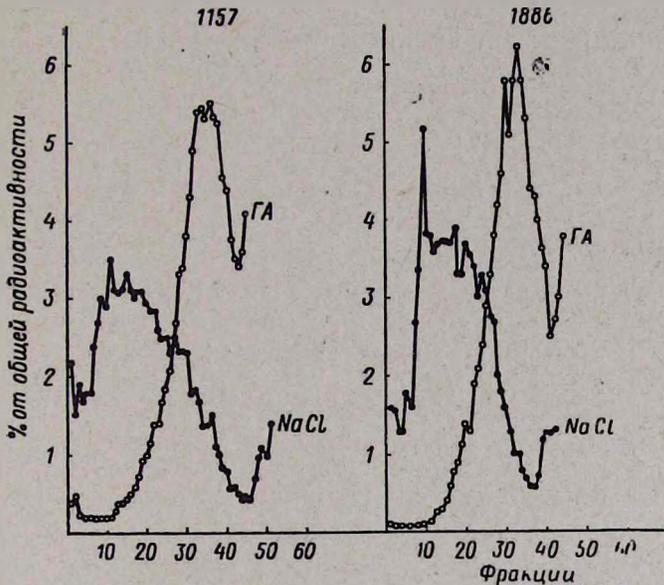


Рис. 2. Седиментограммы ДНК, выделенных из бактерий *E. coli* АВ 1157 и АВ 1886, обработанных гидроксилламином в условиях замены кислорода азотом. Ультрацентрифугирование проводили в роторе SW 50. 1 при 30 тыс. об./мин в течение 75 мин. Остальные обозначения те же, что и на рис. 1.

тем, которые были получены в экспериментах, проведенных с кислородной средой. Таким образом, приходится признать, что однонитевые разрывы, возникающие в ДНК клеток бактерий *E. coli* uvr^{+-} и uvr после обработки их растворами 1-молярного гидроксилламина, не являются следствием образования в клетках перекисей или влияния репарирующих ферментов типа УФ-специфической эндонуклеазы.

В целом результаты наших экспериментов свидетельствуют о том, что одной из наиболее возможных причин ингибирования синтеза ДНК под влиянием обработки бактериальных клеток растворами 1 М гидроксилламина является образование в ДНК этих клеток однонитевых разрывов. Отмеченное нами ранее восстановление синтеза ДНК после 2—3-часовой инкубации клеток в среде без гидроксилламина может быть объяснено по крайней мере тремя причинами: репарацией однонитевых разрывов с помощью ферментов, отличных от uvr -генов и работающих до начала репликации ДНК; преимущественным и быстрым размножением в популяции клеток таких бактерий, ДНК которых не повреждалась вовсе или повреждалась в незначительной степени, и, наконец, протеканием процесса, аналогичного пострепликативной репа-

рации. Эксперименты показали, что вторая альтернатива исключается, так как накопление клеток с неизменной или слабо измененной структурой ДНК неизменно привело бы к сдвигу кривых на седиментограммах в сторону поглощения пика ДНК не обработанных гидрокспламином клеток, а этот сдвиг не был обнаружен. Выбор между первой и третьей альтернативами можно будет сделать после проведения экспериментов на моделях *exg*, *gcs* и *rol*-мутантов.

Всесоюзный научно-исследовательский институт
прикладной молекулярной биологии и генетики
ВАСХНИЛ, Москва

Поступило 10.III 1976 г.

Ե. Ի. ՅԱԿՈՎԼԵՎԱ, Լ. Ա. ՌՈՒԿԿՅԱՆ, Վ. Ն. ՍՈՅՖԵՐ

ՀՍՍ ՌԻՆՏՐԱՄԱՆՈՒՇԱԿԱԳՈՒՅՆ-ՅՈՒՐԱՀԱՏՈՒԿ ԷՆԴՈՆՈՒԿԼԵԱԶԻ
ՆՈՐՄԱԿ ԵՎ ԱՐԱՏԱՎՈՐ ՄԻԿՐՈՐԵՆԵՐԻ ՄՈՏ ԴՆԹ-Ի ՄԻԱԹԵԼԱՆԻ
ՃԵՂՔՈՒՄՆԵՐԻ ԱՌԱՋԱՅՈՒՄԸ 1 ՄՈՂՅԱՐԱՆՈՑ
ՀԻԿՐՈՔՍԻԿԱՄԻՆՈՎ ՄՇԱԿՆԼՈՒ ԴԵՊՐՈՒՄ

Ա մ փ ո փ ու մ

Պարզվել է, որ *E. coli* *uvr*⁺ և *E. coli* *uvr*⁻ ինչպես թթվածնավոր, այնպես էլ անթթվածին միջավայրում հիդրօքսիլամինով մշակելիս նրանց ԴՆԹ-ում առաջանում են միաթելանի ճեղքումներ: Փորձերը ցույց են տալիս, որ բավական բարձր օսմոտիկ ճնշում ունեցող միջավայրում, հիդրօքսիլամինով մշակման հետևանքով, ԴՆԹ-ում առաջացած միաթելանի ճեղքումները արդյունք են ոչ թե բջիջներում առաջացած պերօքսիդների կամ ԴՆԹ-ռեպարացիոն ռեպարացիոնային համակարգի կողմից ֆերմենտների, այլ, հավանաբար, պայմանավորված են ներբջջային այլ ֆերմենտների ազդեցությամբ:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Резник Л. С., Шапиро Н. И. Генетика, 9, 1973.
2. Соуфер В. Н. Вопросы вирусологии, 6, 667, 1970.
3. Соуфер В. Н., Яковлева Н. И. ДАН СССР, 217, 235, 1974.
4. Соуфер В. Н., Циемжис К. К. ДАН СССР, 215, 1261, 1974.
5. Budovsky E. I., Krivitsky A. S., Klebanova L. M., Metlitskaya A. Z., Turkhinsky M. E., Savin F. A. Mutation Res., 24, 245, 1974.
6. Chu B. C. F., Brown D. M., Burdon M. Mutation Res., 20, 265, 1953.
7. Cohn N. S. Experientia (Basel), 20, 158, 1964.
8. Engel W., Krone W., Wolf U. Mutation Res., 4, 353, 1967.
9. Freese E., Bautz E., Freese E. B. Proc. Natl. Acad. Sci., 45, 845, 1961.
10. Kihlman B. A. J. Biophys. Biochem. Cytol., 2, 543, 1956.
11. Reddy T. P., Reddy C. S., Reddy C. M. Mutation Res., 125, 1974.
12. Rhaese H. S., Freese E. Biochim. Biophys. Acta., 155, 456, 1968.
13. Rurtshausen A., Ballag W. Experientia., 19, 131, 1963.
14. Singer B., Fraenkel Conrat H. Progress in Nucleic Acid Res. and Molec. Biol., 9, 1, 1969.
15. Somers C. E., Hsu T. S. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 48, 935, 1962.
16. Soyfer V. N. Microbiol Genetics Bull., 31, 18, 1969.
17. Soyfer V. N. Arch Roumain. Pathol. exper. et Microbiol., 28, 941, 1969.