

НЕКОТОРЫЕ СВОЙСТВА УФ-ЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ МУТАНТОВ SALMONELLA DERBY

К. Г. ДАНАГУЛЯН, Н. Н. САРКИСЯН, Дж. Б. БЕГЛАРЯН,
 Ж. А. КЦОЯН

Изучались свойства УФ-чувствительных мутантов *Salmonella derby*. Показано, что исследуемые штаммы *S. derby* К24, К82, К157 имеют дефект на поздних стадиях эксцизионной или пострепликативной репарации. Установлено, что УФ-чувствительность мутанта К82 обусловлена дефектом по ДНК-полимеразе типа I, а мутант К24 имеет дефект по индудибельной репарации, возможно, в гене *exlA*.

Выделение и изучение свойств радиочувствительных мутантов микроорганизмов помогает выявить ряд закономерностей процесса репарации радиационных повреждений ДНК. Процесс репарации наиболее детально изучен на таком классическом генетическом объекте, каким являются бактерии *E. coli*. Однако исследования других объектов *Nestophilus influenzae*, *M. luteus*, *S. typhimurium* [3, 9, 10, 12] выявили существенные особенности репарации ДНК у иных видов бактерий. Сравнительное изучение процессов репарации у бактерий, отличных от *E. coli*, может дать новые данные для расшифровки механизмов поддержания генетической стабильности клетки.

Совершенно неизученным в этом отношении объектом являются бактерии *S. derby*. Целью данной работы было изучение репарационной способности этих бактерий на основе выделения и изучения свойств радиочувствительных мутантов.

Материал и методика. Использовали штамм *S. derby* К89 и его радиочувствительные мутанты—К82, К24, К157, а также фаг др8 *S. derby*.

В качестве питательных сред использованы мясоептонный бульон (МИБ) 0,7 и 2,0%-ный мясоептонный агар (МПА), а также фосфатный буфер (рН 7,2).

Радиочувствительные мутанты получены обработкой 2%-ным ЭМС двойного аутографного мутанта К93 *S. derby*, дефектного по аргинину и гистидину, по методу, использованному для *S. typhimurium* [3].

Определение УФ-чувствительности бактериальных мутантов. Облучение проводили с помощью лампы БУВ-30, в дозах от 50 до 450 эрг/мм². Бактериальные культуры в логарифмической фазе роста, содержащие $2-4 \cdot 10^8$ кл/мл, центрифугировали, и осадок ресуспендировали в физиологическом растворе. Порции по 5 мл облучали при постоянном помешивании и высевали на чашках с 2%-ным МПА. Контролем служил высев необлученных бактерий. Инкубировали 18 час., при 37°, подсчитывали число выросших колоний.

Способность реактивации клеткой хозяина изучали по их отношению к фагу др8 *S. derby*. Бульонный фаголизат ($T=2 \cdot 10^{12}$) разводили 1:100 в фосфатном буфере и подвергали облучению лампой БУВ-30 в различных дозах (50—540 эрг/мм²). Облу-

чинный и необлученный фаг (контроль) высевали в соответствующих разведениях на индикаторный штамм K89 *S. derby* и его радиочувствительные мутанты. Подсчет выживаемости вели через 18 час. после инкубации при 37°.

Чувствительность к действию ММС. Культуру бактерий в логарифмической фазе роста центрифугировали, и осадок ресуспендировали в фосфатном буфере. Концентрация клеточной суспензии составляла около $4 \cdot 10^9$ кл/мл, конечная концентрация ММС—0,1—1%. Бактерии с ММС инкубировали при 37° на качалке. К контрольным пробам добавляли физиологический раствор в объеме, равном мутагену. Пробы отбирали через определенные промежутки времени (5, 15, 20 мин) и разводили 1:100 раз в пептонной воде для снятия действия мутагена. Высевы из разведений производили на 2%-ном МПА и инкубировали 18 час., при 37°.

УФ-реактивацию фага др 8 *S. derby* проводили по общепринятой методике [1], опыты по трансфекции—компетентными клетками *S. derby* по модифицированной методике Камерона и др. [4]. Компетентность бактериальных клеток достигалась путем кальцинирования 0,05 М раствором CaCl_2 .

Активность ДНК-полимеразы I определяли в стандартных условиях [5] с использованием «активированной» ДНК из спермы лосося (в качестве затравки—матрицы).

Результаты и обсуждение. На рис. 1 приведены кривые выживания УФ-чувствительных мутантов *S. derby* K82, K24, K157 в сравнении с диким типом после действия УФ-лучей; видно, что у мутантов кри-

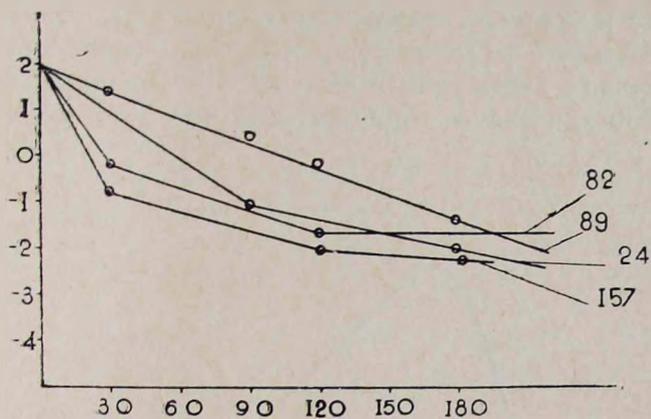


Рис. 1. Зависимость выживаемости клеток от дозы облучения: по оси ординат—выживаемость клеток в lg, по оси абсцисс—доза УФ-света в сек.

вые выживания имеют двухкомпонентный характер. D_{37} , рассчитанные из начальных наклонов кривых, равны ~ 40 — 50 эрг/мм², т. е. мутанты чувствительнее клеток дикого типа примерно в 3 раза. Наклон второй компоненты кривой инактивации у мутантов мало отличается от таковой у клеток дикого типа. Данные показывают, что мутанты дефектны по системе репарации ДНК, наиболее эффективной при относительно небольших дозах УФ-света. Проверка способности мутантов к реактивации клеткой хозяина (host cell reactivation) УФ-облученного фага др 8 *S. derby* выявила отсутствие дефекта системы hcr (табл. 1).

Учитывая промежуточную УФ-чувствительность указанных мутантов, а также отсутствие hcr-дефекта, можно предположить, что они имеют дефект на более поздних стадиях эксцизионной или в пострепли-

Действие УФ-лучей и ММС на клетки *S. derby*

Штаммы	Выживаемость клеток <i>S. derby</i> УФ-облученных (50–450 эрг), %	Выживаемость клеток <i>S. derby</i> обработанных 0,20%-ным ММС, %	Способность к реффага др8 УФ-облученного (50–450 эрг), %
К-89 дикий	77 —0,05	14—1,4	70 —9,3 her ⁺
К-24	25 —0,01	20—0,3	61 —2,3 her ⁺
К-82	23,8—0,022	18—2	74 —4,1 her ⁺
К-157	25,7—0,012	5—1,4	66,5—2,8 her ⁺

кативной репарации, т. е. их можно отнести к мутантам по репаративному синтезу, рекомбинации или индуцибельной репарации.

Известно, что УФ-чувствительные мутанты бактерий, дефектные на поздних стадиях экспозиционной репарации, рекомбинации и индуцибельной репарации, часто бывают чувствительными не только к УФ-облучению, но и к действию ионизирующих излучений и радиомиметиков, в частности к метилметансульфонату (ММС) [11]. Однако проверка мутантов К24, К82, К157 на чувствительность к ММС показала отсутствие различий с диким типом К89 (табл. 1). Прямая проверка активности ДНК-полимеразы в экстрактах К82, К24, К157 (табл. 2), способ-

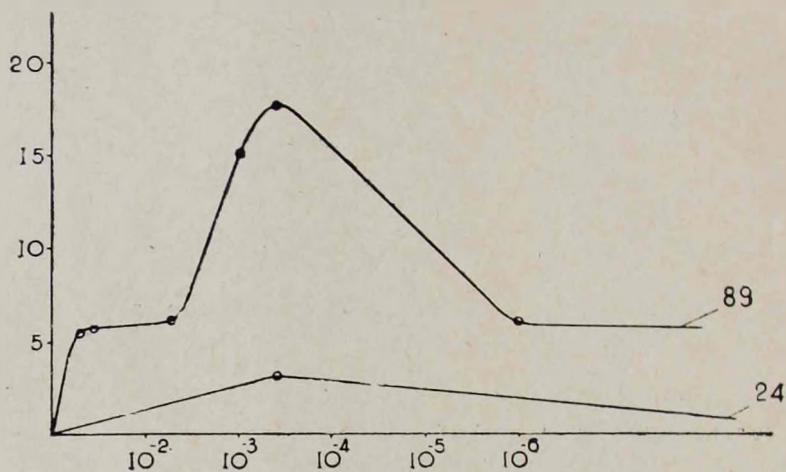


Рис. 2. Зависимость w -реактивации фага др8 от УФ-облучения клеток. Доза УФ-света на клетки—50 эрг/мм²; по оси ординат—фактор w -реактивации, по оси абсцисс—выживаемость фага.

ности указанных мутантов к w -реактивации УФ-облученного фага (рис. 2), а также анализ эффективности трансфекции необлученной ДНК фага др8 [2] позволили сделать следующие предположения. Мутант К82, который чувствительнее к УФ-лучам по сравнению с клетками дикого типа в 4 раза, содержал менее 5% активности ДНК-полимеразы I в экстракте и с нормальной эффективностью трансфицировался фаго-

вой ДНК (табл. 2). По-видимому, его УФ-чувствительность обусловлена дефектом по ДНК-полимеразе типа I и напоминает в этом отношении *rol A* мутанты в *E. coli* [7]. PCR^- — фенотип мутанта K82 *rol* — обусловлен, по-видимому, особенностями фага *dr 8*. Как известно, ДНК-полимераза фага T4 (ген 43) участвует в репарации УФ-индуцированных повреждений [6]. Очевидно, фаг *dr 8* кодирует собственную ДНК-полимеразу или активирует бактериальную. Действительно, в экстрактах из клеток мутанта K24, инфицированных фагом *dr 8* (табл. 2), бы-

Таблица 2
Содержание ДНК-полимеразы I в клетках

Штаммы	Активность ДНК-полимеразы I (импульсы за 60 сек)
K-89 дикий	9000
K-24	3968
K-82	765
K-157	8968
После инфицирования фаг <i>dr 8</i>	
K-89	10002
K-24	6941

Количество белка 1 мг/мл во всех опытах.

ло обнаружено повышение удельной активности ДНК-полимеразы в 2 раза. Несколько неожиданно, что мутант K82 *rol* не был чувствителен к ММС, так, *rol A* мутанты *E. coli* чувствительны к этому мутагену [7]. Возможно, ДНК-полимераза *S. derby*, отсутствующая в K82, не участвует в репарации ММС-повреждений, или клетки *S. derby* устойчивы к ММС благодаря изменению клеточной стенки.

Мутант K24 содержал ~50% активности ДНК-полимеразы в экстракте (табл. 2), нормально трансфицировался фаговой ДНК и имел дефект по *w*-реактивации. Из рис. 2 видно, что при изоэффективных (выживаемость фага на необлученных клетках) дозах УФ-света фактор *w*-реактивации на K24 был в 5—6 раз меньше по сравнению с диким типом. Мы предполагаем, что K24 имеет дефект по индуцибельной репарации в гене *exg A* [8]. Природа дефекта в штамме K157 остается неизвестной: этот мутант содержит нормальное количество ДНК-полимеразы I и нормально трансфицируется.

Институт экспериментальной биологии АН АрмССР

Поступило 21.II 1979 г.

S. DERBY-ի ՄՓ-ՉԳԱՅՈՒՆ ՄՈՒՏԱՆՏԵՐԻ ՈՐՈՇ շԱՏԱՌՔՅՈՒՆՆԵՐԸ

Վ. Գ. ԳԱՆԱԳՈՒՅԱՆ, Ն. Ն. ՍԱՐԿՈՅԱՆ, Զ. Բ. ԲԵՂԱՐՅԱՆ, Ժ. Ա. ԿՈՅԱՆ

Ուսումնասիրվել են *S. derby*-ից ստացած ՄՓ-զգայուն մուտանտների հատկությունները Ցույց է արվում, որ *S. derby*-ի ուսումնասիրված շտամները՝ K24, K82, K157 կրում են դեֆեկտ կամ ռեպարացիայի ուշ փուլում,

Կամ հետոնեպիլիկացիոն ռեպարացիայի փուլում: Բացահայտվում է, որ K 82 մուտանտի զգայունությունը պայմանավորված է ՌՆԹ-պոլիմերազա 1-ի դեֆեկտով, իսկ K24 մուտանտը կրում է դեֆեկտ ըստ ինդուցիբիլ ռեպարացիայի, նարավոր է exrA գենում:

SOME PROPERTIES OF UV-SENSITIVE MUTANTS OF *S. derby*

K. G. DANAGULIAN, N. N. SARKISIAN, J. B. BEGLARIAN, J. A. KTSOIAN

Some obtained UV-sensitive mutants of *S. derby* have been studied. It has been shown that UV-sensitive mutants K24, K82, K157, of *S. derby* have defects in late stages of exisious reparation.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Азизбекян Р. Р., Кривиский А. С. Генетика, 1, 66, 1969.
2. Կժոյն Զ. Ա., Տարկիսյան Ն. Ն. Биолог. ж. Армения, 32, 4, 352, 1979.
3. Скавронская А. Г., Покровский В. Н., Злаев В. И., Андреева И. В. Генетика, 5, 7, 88, 1969.
4. Cameron R., Panasenko M. et al. Proc. nat. Acad. Sci., 72, 9, 3416, 1975.
5. Gefter M. Progr. Nucl. Acid. Research, 14, 101, 1974.
6. Goulian M., Lucas L. Y., Kornberg A. JBC, 243, 627, 1967.
7. De Lucia P. Cairns. Nature, 224, 1164, 1939.
8. Radman M. MMRD, posta. 355, 1975.
9. Setlow Y. et al. J. Bacteriol., 95, 546, 1963.
10. Sluis van C. Ph. D. thesis. Rotherdam, 1972.
11. Strauss G., Robbins M. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 33, 277, 1968.
12. Zherebtsov S. V., Tomilin N. V. BbA, 333, 1975.