

И. П. ВОРОБЬЕВА, И. А. ХМЕЛЬ, С. Л. БОГДАНОВА, В. Ю. ГАВРИЛОВ

РЕПЛИКАЦИЯ ДНК КОЛИЦИНОГЕННОГО ФАКТОРА E1 В ЦИКЛЕ КЛЕТОЧНОГО ДЕЛЕНИЯ *ESCHERICHIA COLI*

(Представлено академиком В. А. Энгельгардтом 13 III 1973)

Вопрос о связи репликации ДНК автономно размножающихся эпизомов с циклом деления бактериальной клетки исследован весьма мало. Имеются лишь данные о поведении F' lac-фактора в клеточном цикле (^{1, 2}). Зойтен и Пато (²), изучая изменения индуцированного синтеза β -галактозидазы, пришли к выводу о том, что репликация ДНК F' lac-фактора происходит в четко выделенный момент, приходящийся приблизительно на середину цикла клеточного деления при всех изученных скоростях роста. При некоторых скоростях роста этот момент отличается от момента инициации цикла репликации хромосомной ДНК.

В настоящей работе исследовалась репликация ДНК колициногенного фактора E1 в синхронно-делящихся клетках *E. coli* K12SE1. Известно, что колициногенные клетки *E. coli* содержат до 24 копий фактора на клетку (³); их репликация имеет случайный характер, т. е. на протяжении одной генерации некоторые копии реплицируются по крайней мере два раза, а некоторые ни одного раза (⁴). Не было, однако, ясно, происходит ли процесс репликации этих плазмид непрерывно в течение всего цикла деления или в какой-то определенный период этого цикла.

Мы показали, что при росте клеток *E. coli* K12SE1 на среде с глюкозой при 25° репликация ДНК колициногенного фактора E1, как и хромосомной ДНК, происходила непрерывно в цикле клеточного деления. На протяжении значительной части цикла средняя скорость синтеза колициновой ДНК была постоянной, затем наблюдалось удвоение скорости синтеза, после чего она вновь сохранялась постоянной.

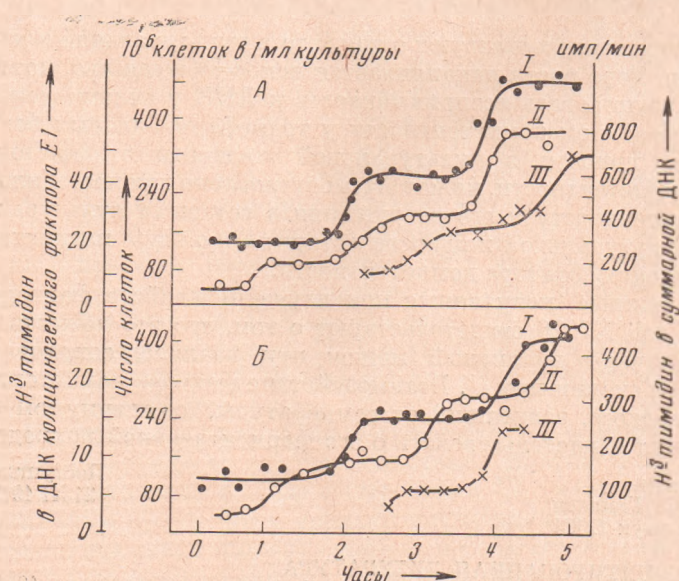


Рис. 1. Скорость репликации ДНК колициногенного фактора E1 и хромосомной ДНК в синхронной культуре *E. coli* K12SE1. А и Б — результаты двух различных опытов. I — включение H³-тимидина в суммарную ДНК за 1 мин., II — включение H³-тимидина (10⁻² имп/мин) во фракцию ДНК колициногенного фактора E1 за 15 мин.

Методы. Штамм *E. coli* K12SE1 выращивали на среде M9⁽⁵⁾ с 0,2% глюкозы при 25°.

Синхронизация клеточного деления. Синхронизацию клеточного деления *E. coli* K12SE1 проводили несколько модифицированным методом, описанным в работе Катлера и Эванса⁽⁶⁾. Отдельные небольшие колонии, выращенные на агаризованном бульоне, пересевали в большие пробирки с 10 мл среды M9. Культура росла 15–18 час. при 25°, затем содержимое пробирки переносилось в колбу со 100 мл среды, и клетки росли до ранней стационарной фазы. После 1–1,5 час. стационарной фазы клетки центрифугировали, отмывали средой M9 и разводили в свежей среде. 4–5 мл инокулята переносили в 100 мл среды и вновь растили до ранней стационарной фазы. Через 1 час после остановки роста клетки центрифугировали, отмывали и переносили в ферментер с 1,0–1,5 л среды до титра 100–150 млн клеток на 1 мл. В результате такой обработки мы получали обычно два-три цикла синхронного клеточного деления (рис. 1).

Измерение синтеза ДНК.

Скорость синтеза хромосомной ДНК определяли, измеряя начальные скорости включения H^3 -тимидина по методу Кларка и Малай⁽⁷⁾. На 5 мл культуры давали 15 μC H^3 -тимидина (уд. акт. 2,8 С/мМ), 10 $\mu\text{г}$ холодного тимидина и 1 мг дезоксиадеозина. Отбирали пробы по 0,5 мл через 30 сек. в течение 4 мин. с момента начала включения.

Выделение ДНК, меченной H^3 -тимидином. К 10 мл синхронной культуры добавляли 0,3 мС H^3 -тимидина и 2 мг дезоксиадеозина. Включение проводили на качалке при 25° в течение 15 мин. и останавливали добавлением избыточного количества холодного тимидина (0,3 мг/мл) при резком охлаждении. Лизис проводили в TES-буфере (0,05 М трис-НСl-буфер, 0,05 М NaCl, 0,005 М EDTA, pH 8,0) в присутствии 2% SDS при 40° в течение 10 мин. Лизаты центрифугировали при 30000 g 15 мин. При этом основная часть хромосомной ДНК (около 80%) переходила в осадок, а ДНК колициногенного фактора E1 оставалась в супернатанте. Осветленный лизат депротеинизировали свежеперегранным фенолом, насыщенным TES-буфером. Водный слой отделяли центрифугированием и промывали эфиром для удаления следов фенола и SDS.

Центрифугирование в градиенте плотности сахарозы. Использовали линейный сахарозный градиент 5–20% (5 мл). Сахарозу готовили на TES-буфере. Центрифугировали при 25000 об/мин, 8 час. при 16°. Фракции по 0,15 мл наливали во флаконы, прибавляли по 1 мл дистиллированной воды и по 10 мл диоксанового сцинтиллятора и просчитывали на жидкостно-сцинтилляционном счетчике Mark II.

Результаты и обсуждение. При фракционировании в градиенте плотности сахарозы осветленных лизатов колициногенных клеток,

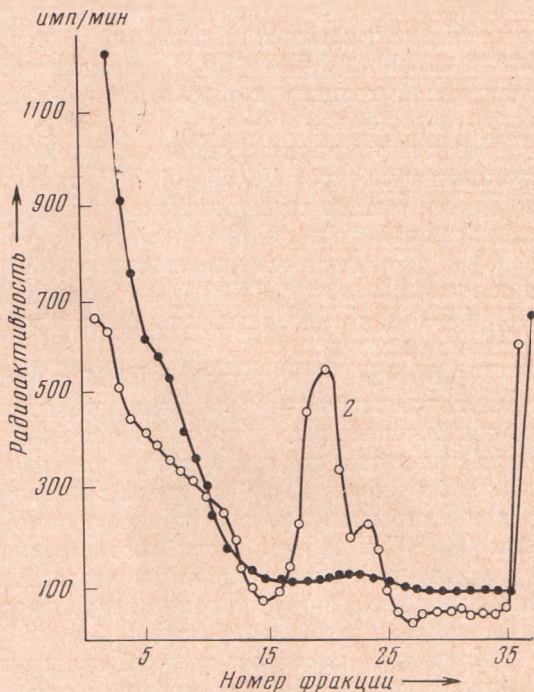


Рис. 2. Фракционирование в сахарозном градиенте H^3 -ДНК из осветленных лизатов клеток *E. coli* K12S (1) и *E. coli* K12SE1 (2)

содержащих меченую H^3 -ДНК, присутствующая в ней ДНК фактора E1 дает четко выраженные пики в области 15–25 фракций (рис. 2). Электроно-микроскопическое исследование, проведенное Ю. Ф. Дрыгиным (Московский университет, лаборатория биоорганической химии), показало, что в этих фракциях содержатся кольцевые молекулы ДНК колициногенного фактора E1. В лизатах неколициногенного штамма *E. coli* K12S эта ДНК отсутствует. Изменение скорости синтеза колициновой ДНК оценивалось по изменению количества импульсов в этих пиках при строго односторонней процедуре обработки проб, отобранных в различные моменты клеточного цикла.

Результаты двух тиричных опытов по изучению синтеза ДНК в синхронных культурах *E. coli* K12SE1 приведены на рис. 1. При использованном нами методе синхронизации культура находится в состоянии перехода от ранней стационарной к логарифмической фазе роста. Поэтому определение скоростей синтеза колициновой и хромосомной ДНК проводилось в основном во втором и третьем циклах деления, где отклонения от сбалансированного роста должны были проявиться в меньшей степени, чем в первом цикле.

Репликация хромосомной ДНК в цикле клеточного деления происходила непрерывно с четко выделенным моментом удвоения скорости включения H^3 -тимидина. В этом отношении характер синтеза хромосомной ДНК был таким же, как и в опытах ряда авторов (^{7–9}) при сбалансированном росте клеток *E. coli* на среде с глюкозой при 37 и 21°. Однако в наших условиях циклы репликации хромосомной ДНК были короче циклов деления (90–97 и 115–130 мин. соответственно), что, видимо, является результатом несбалансированного роста. Интервал времени между концом цикла репликации и началом следующего цикла деления был непостоянен и варьировал от 70 до 145 мин.

Характер изменения средней скорости синтеза колициновой ДНК был сходен с характером изменения скорости репликации хромосомной ДНК. Синтез колициновой ДНК происходил непрерывно на протяжении всего цикла клеточного деления.

Средняя скорость ее репликации была постоянна в течение значительной части цикла, затем наблюдалось резкое удвоение средней скорости синтеза, после чего она вновь сохранялась постоянной. Постоянство скорости синтеза ДНК колициногенного фактора E1 означает, что в течение этого периода в единицу времени реплицировалось одно и те же количество копий. Моменты удвоения скоростей синтеза колициновой и хромосомной ДНК не совпадали. Характер репликации колициновой ДНК не должен, по-видимому, изменяться при истинном сбалансированном росте, поскольку ход репликации хромосомной ДНК существенно не меняется (^{7–9}).

В работе Дрыгина и др. (¹⁰) были приведены данные, свидетельствующие в пользу того, что репликация ДНК колициногенного фактора происходит на мембране, как и репликация других репликонов (^{11, 12}). По-видимому, существуют участки мембраны, специфические для репликации этого типа реплика. Исходя из данных о случайном выборе копий для репликации (⁴), можно предположить, что в любой момент клеточного цикла часть молекул ДНК колициногенного фактора E1 находится в цитоплазматическом пуле и копии из пула диффундируют к репликативным участкам на мембране. Характер кривой изменения средней скорости репликации ДНК колициногенного фактора E1 согласуется с предположением, что количество репликативных мест на мембране ограничено и не меняется в период постоянства скорости синтеза колициновой ДНК; удвоение количества репликативных мест в определенный момент клеточного цикла приводит к удвоению средней скорости репликации.

Если считать, что в среднем на клетку приходится около 20 копий колициногенного фактора E1 (³), то среднее время, приходящееся на ре-

пликацию одной копии, в наших условиях составляет несколько минут. Если бы синтез колициновой ДНК происходил с той же скоростью, что и синтез хромосомной ДНК, то время репликации одной копии фактора, исходя из его молекулярного веса ($4,2 \cdot 10^6$ дальтон), составляло бы при 25° около 15 сек. Эта величина, таким образом, намного меньше, чем время, приходящееся на репликацию одной копии в условиях нашего опыта. Причина такого расхождения может быть в том, что скорость синтеза колициновой ДНК в действительности намного меньше скорости синтеза хромосомной ДНК из-за различия в ферментативном аппарате этих ДНК. Было показано (^{13, 14}), что в репликации ДНК колициногенного фактора Е1 существенную роль играет ДНК-полимераза I, а не ДНК-полимераза III, необходимая для репликации хромосомной ДНК. Другим возможным объяснением может быть то, что основное время между репликациями занимает не собственно синтез ДНК одной копии колициногенного фактора, а подготовка активного состояния репликативного места на мембране.

Характер репликации колициновой ДНК существенно отличается от характера репликации ДНК F'-эписомы тем, что копии колициногенного фактора Е1 могут реплицироваться в любой момент цикла деления, а ДНК F'-фактора реплицируется в строго определенный момент цикла. Это служит еще одним подтверждением обнаруженного рядом авторов (¹³⁻¹⁵) различия в регуляции репликации больших и малых плазмид.

Авторы выражают благодарность Ю. Ф. Дрыгину за электронно-микроскопические исследования, Э. Г. Могилевской и А. И. Новиковой за помощь при проведении опытов и Н. Ф. Мясоедову за предоставление H_2 -тимидина.

Институт атомной энергии
им. И. В. Курчатова
Москва

Поступило
5 II 1973

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ W. Donachie, M. Masters, *Gen. Res.*, **8**, 119 (1966). ² J. Zenuthen, M. L. Pato, *Mol. Gener. Gen.*, **111**, 242 (1971). ³ D. B. Clewell, B. Evenchik, J. W. Cranston, *Nature, New Biol.*, **237**, 29 (1972). ⁴ M. Bazaral, D. R. Helinski, *Biochemistry*, **9**, 399 (1970). ⁵ S. Cohen, R. Arbogast, *J. Exp. Med.*, **91**, 619 (1950). ⁶ K. G. Cutler, J. E. Evans, *J. Bacteriol.*, **91**, 469 (1966). ⁷ D. J. Clark, O. Maaløe, *J. Mol. Biol.*, **23**, 99 (1967). ⁸ O. Pierucci, *J. Bacteriol.*, **109**, 848 (1972). ⁹ J. E. Urban, K. G. Lark, *J. Mol. Biol.*, **58**, 711 (1971). ¹⁰ Y. F. Drygin, S. L. Bogdanova, A. A. Bogdanov, *FEBS Letters*, **12**, 201 (1971). ¹¹ N. Sueoka, W. G. Quinn, *Cold Spring Harbor Symp. Quant Biol.*, **33**, 695 (1968). ¹² R. Knippers, R. L. Sinsheimer, *J. Mol. Biol.*, **34**, 17 (1968). ¹³ D. T. Kingsbury, D. R. Helinski, *Biochem., Biophys. Res. Commun.*, **41**, 1538 (1970). ¹⁴ W. Goebel, *Nature New Biol.*, **237**, 67 (1972). ¹⁵ W. Goebel, M. Schrempf, *Biochim. et biophys. acta*, **262**, 32 (1972).