

УДК 577.1

БИОХИМИЯ

С. Л. БОГДАНОВА, [В. Ю. ГАВРИЛОВ]

РЕПЛИКАЦИЯ ДНК КОЛИЦИНОГЕННОГО ФАКТОРА Е1  
ПРИ ИНДУЦИРУЮЩЕМ ВОЗДЕЙСТВИИ НЕКОТОРЫХ  
ДНК-ТРОПНЫХ АГЕНТОВ НА КЛЕТКИ  
*ESCHERICHIA COLI K12 S E1*

(Представлено академиком А. А. Баевым 31 II 1974)

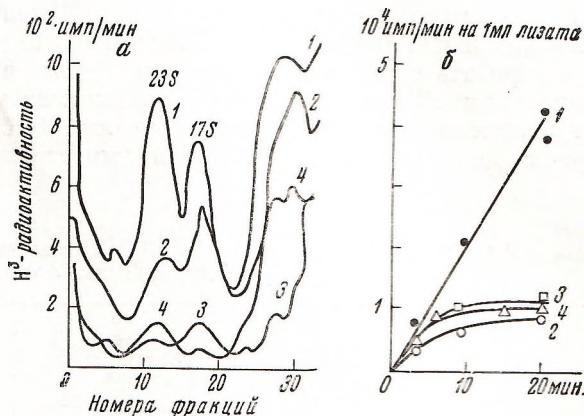
Колициногенный фактор Е1 — небольшая бактериальная плазмида (мол. вес  $4,2 \cdot 10^6$  дальтонов), встречающаяся в семействе кишечных бактерий. Обычно в колициногенных клетках содержится в среднем 25–40 копий Col E1 ДНК; присутствие их определяет способность таких клеток к синтезу антибиотика узко специфического спектра действия — колицина Е1. Синтез колицина Е1 в клетках в норме зарепрессирован и индуцируется лишь при определенных воздействиях, в частности, при действии на колициногенные клетки агентов, влияющих на синтез ДНК, например митомицина С, налидиксовой кислоты (<sup>1–3</sup>). Если репликация и сегрегация Col E1 ДНК при размножении колициногенных клеток интенсивно изучается, и в этой области накоплена значительная сумма знаний (<sup>3</sup>), то механизм индукции синтеза колицинов пока еще не ясен.

Настоящая работа посвящена выяснению уровня синтеза Col E1 ДНК при индуцирующем воздействии ДНК-тропных агентов на колициногенные клетки. Тем самым мы пытались установить связь между процессами репликации колициногенной ДНК, транскрипции и трансляции колицинового оперона. В литературе по этому поводу имеются противоречивые сведения. Так, три группы авторов, изучая индукцию колицинов с помощью митомицина С, пришли к различным выводам: Де Витт и Хеллинский нашли, что индукция синтеза колицина Е1 в *Proteus mirabilis* связана с множественным накоплением копий Col E1 ДНК; с другой стороны, Хаусман и Кловс установили, что синтез колицинов В3 и В4 может происходить в условиях полного подавления включения меченого предшественника в суммарную ДНК клетки (в этой работе не выделялась ДНК изучаемых колициногенных факторов); наконец, Харди и Мэйнел недавно сообщили, что уровень синтеза Col E2 ДНК при индуцирующем воздействии почти не отличается от уровня синтеза этой ДНК в норме в неиндуцированных клетках (<sup>4–6</sup>).

В качестве индуцирующих агентов мы использовали N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидин (НГ) — сильный метилирующий агент, брунеомицин — антибиотик из группы стрептомицина, и митомицин С. Индуцирующая активность первых двух соединений была нами установлена ранее (<sup>7</sup>). Клетки *E. coli* K12 S E1 выращивали на минеральной среде M9 с 0,2% глюкозы до титра  $3–4 \cdot 10^8$ , затем порции культуры, содержащие  $50–80 \cdot 10^8$  клеток, суспендировали в 5 мл свежей среды, в которую было добавлено (в расчете на 1 мл) 2 мкг тимидина, 250 мкг дезоксиаденозина, 40 мкС H<sup>3</sup>-тимидина (уд. акт. 3,4 С/ммоль) и соответствующий индуцирующий агент (1 мкг митомицина С, 4 мкг брунеомицина или 60 мкг НГ). Контрольный вариант не содержал индуцирующего агента. Пробы инкубировали 20 мин. при 37° в темноте, затем включение останавливали добавлением холодного раствора TES (0,02 M трис-HCl-буфер, pH 8,0, 0,005 M версен и 0,05 M NaCl), содержащего 0,02 M NaN<sub>3</sub>. Клетки трижды

ды промывали холодным раствором TES с добавлением 40 мкг/мл тимидина. Разрушение клеток проводили по методу, описанному Хелинским (9). Для удаления основного (90–95%) количества хромосомной ДНК лизаты центрифугировали при 22 000 g 50 мин. и обрабатывали проназой 2 мг/мл при 25° в течение 25 мин. Осветленные лизаты (0,2 мл) анализировали в градиенте концентраций сахарозы (5–20% сахарозы в TES-буфере при 39 000 об/мин 6 час. или при 50 000 об/мин 3 часа, 4°, роторы 4 или 6 центрифуги УЦП). О количестве вновь синтезированной Col E1 ДНК судили по площади пиков радиоактивности после центрифугирования соответствующих осветленных лизатов в градиенте концентраций сахарозы (рис. 1а). Параллельные нерадиоактивные варпанты после отмычки индукторов переносили в свежую среду с бульоном и растили

Рис. 1. а – фракционирование осветленных лизатов в градиенте концентраций сахарозы (5–20%), приготовленных из контрольных и индуцированных клеток *E. coli* K12S E1; б – синтез Col E1 ДНК в клетках *E. coli* K12S E1 при различном времени действия индуцирующих агентов. 1 – контроль; 2 – брунеомицин, 4 мкг/мл; 3 – НГ, 60 мкг/мл; 4 – митомицин, 1 мкг/л



их для созревания колицина E1 3 часа при 37°. В пробах определяли число индуцированных и выживших клеток, как было описано ранее (7). Эти величины варьировали от 30–70% и 0,1–10% соответственно. Количество колицина E1 определяли по наивысшему разведению обработанных хлороформом клеточных суспензий, задерживающих рост чувствительной культуры. В условиях нашего эксперимента количество E1 возрастало при индукции в 200–500 раз по сравнению со спонтанным уровнем. Репликацию хромосомной ДНК оценивали по радиоактивности неосветленных лизатов клеток, меченых  $H^3$ -тимидином за 20 мин. индукции.

На рис. 1б представлена зависимость синтеза Col E1 ДНК от времени включения  $H^3$ -тимидина в контрольные и индуцированные клетки. Из данных, представленных на рис. 1, следует, что при действии митомицина С, брунеомицина и НГ синтез Col E1 ДНК подавляется в 3–5 раз по сравнению с контролем. Примерно в такой же степени подавлялся синтез хромосомной ДНК.

Характерно, что при индуцирующем воздействии всех трех агентов скорость синтеза Col E1 ДНК снижается постепенно, и репликация колициногенной ДНК, начиная с 8–10 мин., почти полностью прекращается. При снижении концентрации индуцирующих веществ или при уменьшении времени их воздействия обычно возрастала доля выживших, а следовательно неиндуцированных клеток, что сразу же проявлялось в повышении радиоактивности во фракциях Col E1 ДНК и хромосомной ДНК.

Ранее Хелинским было показано, что Col E1 ДНК в клетках находится в двух формах: в ковалентно-непрерывной суперскрученной форме (23 S) и в форме комплекса с белком (24 S); при депротеинизации (в нашем случае обработка проназой) комплекс разрушается и содержащаяся в нем колициногенная ДНК переходит в форму открытых кольцевых молекул, имеющих специфический разрыв в одной из нитей ДНК (17 S) (8). Из рис. 1а видно, что при действии митомицина С в течение

20 мин. соотношение форм Col E1 ДНК в лизатах индуцированных клеток мало отличается от соотношения форм в лизатах контрольных клеток (кривые 1 и 4); для клеток, растущих на глюкозе, характерно присутствие около 70% Col E1 ДНК в суперскрученной и 30% в открытой форме. Однако при действии брунеомицина и НГ наблюдается заметное возрастание доли открытых форм Col E1 ДНК (до 70%). Известно, что при действии на ДНК алкилирующих агентов происходит модификация гетероциклических оснований по ряду реакционноспособных центров, по N<sub>7</sub> и O<sub>6</sub> гуанина и по N<sub>1</sub> и N<sub>3</sub> аденина (<sup>9</sup>, <sup>10</sup>). Подобные модификации оснований приводят к возникновению локальных дефектов в двойной спирале ДНК, вследствие чего возникают участки, доступные для действия клеточных эндонуклеаз. Это приводит к накоплению в молекулах ДНК однонитевых разрывов (<sup>11</sup>), чем, по-видимому, и объясняется увеличение доли открытых форм Col E1 ДНК при действии на клетки брунеомицина и НГ. В молекуле митомицина С имеется два центра, способных реагировать с гетероциклическими основаниями (<sup>12</sup>). Благодаря этому митомицин С может «шивать» комплементарные нити ДНК, не нарушая при этом целостность двойной спирали ДНК. Вполне вероятно, что репарация митомициновых повреждений имеет более медленную кинетику.

Таблица 1

Репликация хромосомной и Col E1 ДНК в течение 20 мин. после удаления индуцирующих агентов

Вариант	Включение Н <sup>3</sup> -ти- мидина в хромосом- ную ДНК, имп. на 1 мл неосветл. лизата	Ингибирование синтеза хромо- сомной ДНК, ДНКконтр., ДНКинд.	Включение Н <sup>3</sup> -ти- мидина в Col E1 ДНК, имп. на 1 мл осветл. лизата	Ингибирование синтеза Col E1 ДНК, ДНКконтр., ДНКинд.
Контроль НГ, 60 мкг/мл	921300 209700	4,3	6170 1195	5,2
Брунеомицин, 4 мкг/мл	174900	5,2	575	10,0
Контроль НГ, 60 мкг/мл	160800 28000	6,0	2500 690	3,6
Брунеомицин, 4 мкг/мл	51600	3,1	500	5,0
Контроль Митомицин С, 1 мкг/мл	806100		8300	
Митомицин С, 1 мкг/мл	152700 147900	5,4 5,4	1250 1200	6,7 6,9

Итак, мы нашли, что в присутствии митомицина С, брунеомицина и НГ происходит резкое подавление синтеза Col E1 ДНК. Далее важно было выяснить, будет ли увеличиваться число копий этой ДНК после удаления индуцирующих агентов. Опыты по титрованию колицина Е1 в лизатах индуцированных клеток показали, что уже через 20 мин. после переноса клеток в среду, не содержащую индуктора, в индуцированных клетках появляется колицин. Включение в клетки Н<sup>3</sup>-тимидина за этот период времени представлено в табл. 1. Из этих данных видно, что по сравнению с контрольным вариантом синтез Col E1 ДНК, а также хромосомной ДНК остается сильно подавленным даже после удаления индуцирующих агентов в течение 20 мин. роста клеток на свежей богатой среде. Таким образом, ингибирующее действие митомицина С, брунеомицина и НГ на синтезе Col E1 ДНК сохраняется и после их удаления из клеток, в которых индуцировано образование колицина Е1.

Из результатов настоящей работы вытекает, что индукция синтеза колицина Е1 в клетках *E.coli K12S E1* не связана с накоплением повы-

шеннного числа копий фактора Col E1, которое могло бы превысить количество свободных молекул репрессора в клетке и привести к синтезу колицина E1. Такой механизм возникновения индуцированных копий Col-фактора предполагали Де Витт и Хелинский, обнаружившие множественное накопление копий Col E1 ДНК у *Proteus mirabilis* при действии на клетки митомицина С<sup>(4)</sup>. Однако нужно заметить, что *Proteus mirabilis* не является естественным хозяином колициногенного фактора E1, вследствие чего контроль синтеза плазмид в этом организме может быть ослаблен<sup>(13)</sup>.

Таким образом, по нашим данным, индукция синтеза колицина E1 в *E. coli* K12S E1 происходит при резком подавлении репликации Col E1 ДНК. Отсюда, однако, не следует, что индукция может происходить без репликации Col E1 ДНК. Показано<sup>(14)</sup>, что в ts-мутантах по синтезу Col E1 ДНК индукция синтеза колицина митомицином С не происходит при повышенной температуре, когда репликация Col E1 ДНК полностью подавлена. Нами ранее было рассчитано, что при максимальном индуцирующем воздействии НГ на клетку в среднем приходится один цикл репликации Col E1 ДНК. Поскольку алкилирующие агенты действуют, в основном, в момент синтеза полинуклеотидной цепи, не исключено, что индуцируются лишь те копии Col E1 ДНК, которые образуются в присутствии этих веществ. Такие копии могут иметь модифицированный операторный участок с пониженным сродством к репрессору, вследствие чего на них может начаться синтез специфических колициновых мРНК.

Авторы благодарят З. Г. Могилевскую за постоянную помощь в работе, а также И. А. Хмель и И. П. Воробьеву за ценные советы.

Институт атомной энергии  
им. И. В. Курчатова  
Москва

Поступило  
1 II 1974

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> R. C. Clowes, Bacteriol. Rev., v. 36, 361 (1972). <sup>2</sup> T. Jijima, Biken J., v. 5, 1 (1962). <sup>3</sup> Ю. Д. Толчев, А. С. Саенко, В. Г. Лиходед, Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунол., т. 12, 136 (1969). <sup>4</sup> W. De Witt, D. R. Helinski, J. Mol. Biol., v. 13, 692 (1965). <sup>5</sup> C. Hausmann, R. C. Clowes, J. Bacteriol., v. 107, 633 (1971). <sup>6</sup> K. G. Hardy, G. G. Maynell, J. Bacteriol., v. 112, 2, 1007 (1972). <sup>7</sup> С. Л. Богданова, И. В. Фетисова, В. Ю. Гаврилов, Микробиология, т. 39, 4, 622 (1970). <sup>8</sup> D. B. Clewell, D. R. Helinski, Biochem., v. 9, 22 (1970). <sup>9</sup> P. D. Lowley, C. J. Thatcher, Biochem. J., v. 116, 693 (1970). <sup>10</sup> R. Süssmuth, R. Haerlin, F. Lingens, Biochim. et biophys. acta, v. 260, 276 (1972). <sup>11</sup> D. L. Dugle, C. E. Campbell et al., Mut. Res., v. 18, 3, 237 (1973). <sup>12</sup> E. Reich, A. J. Shatkin, E. L. Tatum, Biochim. et biophys. acta, v. 53, 1, 132 (1961). <sup>13</sup> R. Rownd, J. Mol. Biol., v. 44, 387 (1969). <sup>14</sup> D. T. Kingsbury, D. G. Sieckmann, D. R. Helinski, Genetics, v. 74, 1 (1973).