

С. Л. БОГДАНОВА, [В. Ю. ГАВРИЛОВ]

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

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

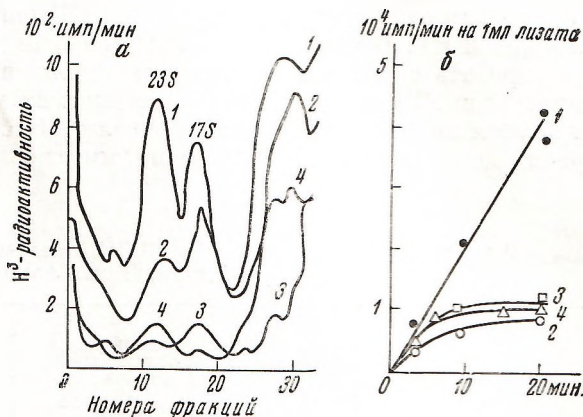
Колициногенный фактор E1 — небольшая бактериальная плазмида (мол. вес $4,2 \cdot 10^6$ дальтонов), встречающаяся в семействе кишечных бактерий. Обычно в колициногенных клетках содержится в среднем 25–40 копий Col E1 ДНК; присутствие их определяет способность таких клеток к синтезу антибиотика узко специфического спектра действия — колицина E1. Синтез колицина E1 в клетках в норме репрессирован и индуцируется лишь при определенных воздействиях, в частности, при действии на колициногенные клетки агентов, влияющих на синтез ДНК, например митомицина С, налидиксовой кислоты (^{1–3}). Если репликация и сегрегация Col E1 ДНК при размножении колициногенных клеток интенсивно изучается, и в этой области накоплена значительная сумма знаний (³), 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 E1 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 Мэйнеел недавно сообщили, что уровень синтеза Col E2 ДНК при индуцирующем воздействии почти не отличается от уровня синтеза этой ДНК в норме в неиндуцированных клетках (^{4–6}).

В качестве индуцирующих агентов мы использовали N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидин (НГ) — сильный метиллирующий агент, брунеомицин — антибиотик из группы стрептомицина, и митомицин С. Индуцирующая активность первых двух соединений была нами установлена ранее (⁷). Клетки *E. coli* K12 S E1 выращивали на минеральной среде М9 с 0,2% глюкозы до титра $3\text{--}4 \cdot 10^8$, затем порции культуры, содержащие $50\text{--}80 \cdot 10^8$ клеток, суспендировали в 5 мл свежей среды, в которую было добавлено (в расчете на 1 мл) 2 мкг тимидина, 250 мкг дезоксиаденозина, 40 мкг H^3 -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 М трис-HCl-буфер, pH 8,0, 0,005 М версен и 0,05 М NaCl), содержащего 0,02 М NaNa₃. Клетки триж-

ды промывали холодным раствором TES с добавлением 40 мкг/мл тимидина. Разрушение клеток проводили по методу, описанному Хелинским (⁸). 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 варпаны после отмывки 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 индуктирующих 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 возросло при индукции в 200–500 раз по сравнению со спонтанным уровнем. Репликацию хромосомной ДНК оценивали по радиоактивности неосветленных лизатов клеток, меченных H³-тимидином за 20 мин. индукции.

На рис. 1б представлена зависимость синтеза Col E1 ДНК от времени включения H³-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 выживающих, 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 N₇ и O₆ гуанина и по N₁ и N₃ аденина (⁹, ¹⁰). Подобные модификации оснований приводят к возникновению локальных дефектов в двойной спирали ДНК, вследствие чего возникают участки, доступные для действия клеточных эндонуклеаз. Это приводит к накоплению в молекулах ДНК однонитевых разрывов (¹¹), 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 (¹²). Благодаря этому митомицин С может «сшивать» 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 ³ -тимидина в хромосомную ДНК, имп. на 1 мл неосветл. лизата	Ингибирование синтеза хромосомной ДНК, $\frac{\text{ДНК}_{\text{контр.}}}{\text{ДНК}_{\text{инд.}}}$	Включение Н ³ -тимидина в Col E1 ДНК, имп. на 1 мл осветл. лизата	Ингибирование синтеза Col E1 ДНК, $\frac{\text{ДНК}_{\text{контр.}}}{\text{ДНК}_{\text{инд.}}}$
Контроль	921300		6170	
НГ, 60 мкг/мл	209700	4,3	1195	5,2
Брунеомицин, 4 мкг/мл	174900	5,2	575	10,0
Контроль	160800		2500	
НГ, 60 мкг/мл	28000	6,0	690	3,6
Брунеомицин, 4 мкг/мл	51600	3,1	500	5,0
Контроль	806100		8300	
Митомицин С, 1 мкг/мл	152700	5,4	1250	6,7
Митомицин С, 1 мкг/мл	147900	5,4	1200	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 Н³-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 Е1 не связана с накоплением повы-

шенного 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 (⁴). Однако нужно заметить, что *Proteus mirabilis* не является естественным хозяином колициногенного фактора E1, вследствие чего контроль синтеза плазмид в этом организме может быть ослаблен (¹³).

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 (¹⁴), 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 средством 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

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