

57
A 59

АКАДЕМИЯ НАУК ЛАТВИЙСКОЙ ССР
ОТДЕЛЕНИЕ ХИМИЧЕСКИХ И БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК

На правах рукописи

В.М.Берзинь

ВЛИЯНИЕ РЕПЛИКАЦИИ БАКТЕРИОФАГА MS2
НА БИОСИНТЕЗ РНК ESCHERICHIA COLI

(специальность 03.093 – биологическая химия)

Диссертация написана на русском языке

А в т о р е ф е р а т
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Рига 1972

АКАДЕМИИ НАУК ЛАТВИЙСКОЙ ССР
ОТДЕЛЕНИЕ ХИМИЧЕСКИХ И БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК

На правах рукописи

В.М. Берзинь

ВЛИЯНИЕ РЕШЕНИЯМИ БАКТЕРИОФАГА MS2 НА БИОСИНТЕЗ
РНК ЭСШЕНГИСИА СОЛИ

(специальность 03.093 - биологическая химия)

Диссертация написана на русском языке

А в т о р е ф е р а т
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Рига 1972

Диссертационная работа выполнена в орден Трудового Красного Знамени Институте органического синтеза Академии наук Латвийской ССР

Научный руководитель: доктор химических наук Э.Я. ГРЕН

Официальные оппоненты:
доктор биологических наук, профессор В.И. АГОЛ
кандидат биологических наук В.П. ЛОУА

Высшее научно-исследовательское учреждение:
Институт химии природных соединений им. М.М. Вемкина
Академии наук СССР

Автореферат разослан " 30 " апреля 1972 года

Защита диссертации состоится " 22 " июня 1972 года

на заседании Объединенного ученого совета по биологическим наукам при Отделении химических и биологических наук Академии наук Латвийской ССР.

Просим ознакомить специалистов с авторефератом и прислать отзывы в двух экземплярах с подписью, заверенной печатью учреждения, по адресу: г. Рига, ул. Тургенева, 19, Отделение химических и биологических наук АН Латвийской ССР.

С диссертацией можно ознакомиться в фундаментальной библиотеке АН Латвийской ССР (г. Рига, ул. Коммунала, 4).

Ученый секретарь Совета
кандидат сельскохозяйственных наук

М. Зарубина
М.П. Зарубина

Заражение клеток *E. coli* РНК-содержащими бактериофагами, в отличие от Т-четных ДНК-фагов, не приводит к полному подавлению биосинтеза ДНК, РНК и белка *E. coli* сразу же после инфекции. Однако, во время интенсивной репликации РНК-содержащие фаги оказывают определенное тормозящее воздействие на матричный биосинтез хозяина, степень и избирательность которого, согласно литературным данным для различных фагов, может меняться в весьма широких пределах.

Было установлено, что синтез рибосомальной РНК и рибосом подавляется после инфекции бактериофагами R17, R23 и ZIK/I (Ellis, Paranchych, 1963; Hudson, Paranchych, 1967; Igarashi et al., 1970; Watanabe, Watanabe, 1971; Knolle, 1967; Bishop, 1965, 1966).

Уровень тРНК в клетках понижается при заражении *E. coli* фагами R23, ZIK/I и Q_φ (Watanabe, Watanabe, 1971; Bishop, 1966; Hung, Overby, 1968) но остается без изменений в случае R17 и MS2 (Hudson, Paranchych, 1968; Igarashi et al., 1970; Nau et al., 1967). Синтез ДНК *E. coli* несколько уменьшается в результате фагового заражения, хотя свидетельствующие об этом данные не всегда достаточно убедительны (Dooreg, Zinder, 1962; Granboulan, Franklin, 1966; Watanabe, Watanabe, 1971). Синтез непосредственно мРНК в зараженных клетках ранее не был изучен - косвенные исследования индукции синтеза β-галактозидазы привели к противоречивым выводам (Watanabe, Watanabe, 1970; Watanabe et al., 1968; Sugiyama, Stone, 1968).

Маловероятно, чтобы близкие как по структуре, так и по механизму репликации РНК-содержащие фаги проявляли бы столь существенные различия в своем воздействии на матричный биосинтез хозяина. Разнообразие данных, полученных различными авторами, вызвано, по-видимому, применением не всегда наиболее чувствительных и однозначных методов исследования.

Для определения истинного характера воздействия репликации РНК-содержащих бактериофагов на биосинтез клеточной ДНК и РНК нами были проведены комплексные исследования на примере фага MS2, включающие:

I. Изучение скорости синтеза ДНК и общей РНК в клетках

E. coli, зараженных бактериофагом MS2.

2. Исследование влияния инфекции MS2 на синтез тРНК, функциональную активность тРНК и аминоацил-тРНК синтез в клетках-хозяина.

3. Изучение синтеза клеточной мРНК и рРНК во время интенсивной репликации бактериофага MS2.

I Скорость синтеза ДНК и РНК в клетках *E. coli*, зараженных бактериофагом MS2

Характер синтеза ДНК в зараженных MS2 клетках *E. coli* был изучен при помощи кратковременной (5 мин.) метки ДНК ^{14}C -тимидином (рис. 1).

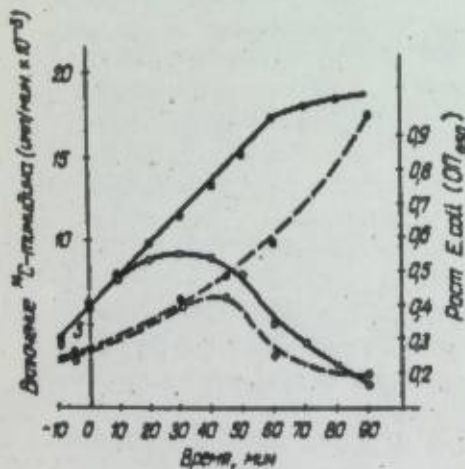


Рис. 1. Синтез ДНК в зараженных фагом MS2 клетках *E. coli* (5-мин. импульсная метка ^{14}C -тимидином) и рост культуры (OP₆₅₀). Радиоактивность — непрерывная линия; OP₆₅₀ — прерывистая. Зараженные клетки: —○—; контроль *E. coli*: —□—.

Скорость включения меченого предшественника в ДНК не претерпевает заметных изменений по сравнению с контролем почти до 30-й мин. инфекции, что свидетельствует об отсутствии фagosпецифического торможения синтеза ДНК в зараженных клетках на данном эта-

пе инфекции (рис. 1). Это в какой-то степени подтверждается и нормальным ростом культуры вплоть до 40-й мин. инфекции (рис. 1). Литературные данные, в свою очередь, также свидетельствуют о слабо выраженном торможении синтеза ДНК в клетках *E. coli* после заражения их фагами R23 (Watanabe, Watanabe, 1971) и f2 (Cooper, Zinder, 1962). Замедление синтеза ДНК после 30-й мин., распространяющееся неспецифически и на другие виды матричного биосинтеза, в том числе на синтез РНК (рис. 2, 3) и белка, очевидно, связано с истощением биосинтетических ресурсов клетки и начинающимся лизисом бактерий (OP₆₅₀).

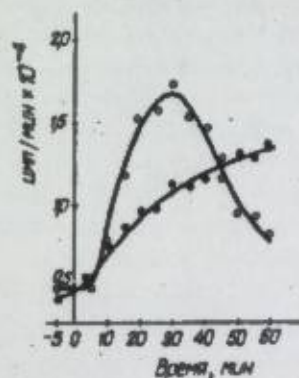


Рис. 2. Скорость синтеза РНК в зараженных бактериофагом MS2 клетках *E. coli*. 4-мин. импульсная метка ^{14}C -урацилом; зараженные клетки: —○—; контроль: —□—.

В отличие от *E. coli*, в зараженной культуре, начиная с 15-й минуты инфекции, заметно возрастает скорость включения ^{14}C -урацила, достигая максимума на 30-й минуте, после чего она постепенно падает. Естественно предположить, что отрезок времени, характеризующийся ускоренным включением ^{14}C -урацила в зараженных клетках (рис. 2), является периодом интенсивного синтеза фagosпецифических РНК. Последующее же замедление включения ^{14}C -урацила означает завершение синтеза основных структурных элементов фага и начинающийся лизис культуры.

Использование антибиотика рифампицина, который подавляет синтез клеточных РНК, ингибируя ДНК-зависимую РНК-полимеразу *E. coli* (Sippel, Hartman, 1968), но не влияет на синтез фagosвой РНК (Froma-

geot, Zinder, 1968), позволяет выявить изменения скорости синтеза исключительно фагоспецифической РНК во время репликации бактериофага MS2.

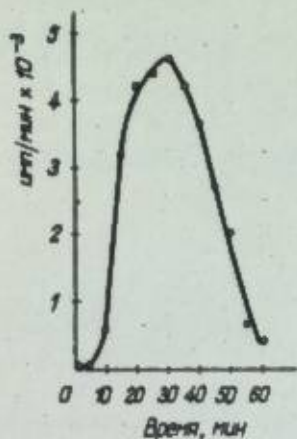


Рис. 3. Скорость синтеза фагоспецифической РНК в зараженных клетках, обработанных рифамицином. 4-мин. импульсная метка ¹⁴C-урацилом с одновременным добавлением рифамицина (100 мкг/мл). Данные приведены с коррекцией на включение ¹⁴C-урацила в клеточных РНК.

Скорость синтеза фаговой РНК в этом случае также нарастает до 30-й мин. (рис.3), что позволяет с достаточной уверенностью рассматривать увеличение скорости включения ¹⁴C-урацила, наблюдаемое в необработанных рифамицином зараженных клетках *E. coli* (рис.2), как результат интенсивного синтеза фагоспецифической РНК.

Из вышеприведенных данных видно, что включение ¹⁴C-урацила в зараженных клетках неравномерно и непропорционально по сравнению с включением предшественника в незараженных клетках, хотя скорость деления клеток до 40-й мин. инфекции практически одинакова в обоих случаях.

Были проведены исследования, показывающие, что увеличение скорости включения ¹⁴C-урацила в зараженных клетках, достигавшее максимального значения на 30-й мин. инфекции, не является результатом нарушения проницаемости клеточной мембраны после

инфекции. Это явление не вызвано также различиями нуклеотидных составов MS2 РНК и РНК *E. coli*, так как подобная картина наблюдается при включении как ¹⁴C-гуанина, так и ¹⁴C-урацила.

Следовательно, клетки *E. coli* в логарифмической фазе роста располагают дополнительным потенциалом синтеза РНК, используемым при репликации фаговой РНК. Однако, это не означает, что в зараженных клетках синтез фаговой РНК просто накладывается на синтез клеточных РНК, продолжающийся на уровне незараженных клеток. Далее будет показано, что, хотя в отношении РНК не реализуется принцип эквивалентного замещения клеточных синтезов фагоспецифическими, фаговая репликация приводит к определенным изменениям в синтезе РНК хозяина.

На основании приведенных данных можно сделать заключение, что наблюдаемое в зараженных клетках после 30-40-й мин. инфекции замедление скорости синтеза как фагоспецифической РНК, так и общей РНК и ДНК *E. coli* является результатом завершения синтеза основных структурных элементов фага, истощения биосинтетических ресурсов клетки и начинающегося лизиса бактерий. Указанные эффекты, накладываясь на возможное избирательное действие фаговой репликации на матричный биосинтез хозяина, могут мешать его выявлению. Следовательно, специфическое воздействие фаговой репликации на биосинтез РНК *E. coli* должно быть выявлено на более ранних периодах инфекции, вероятнее всего, в районе 30-й минуты - во время интенсивного синтеза фаговой РНК.

II Влияние репликации фага MS2 на биосинтез тРНК, функциональную активность тРНК и амниоацил-тРНК синтетаз

Биосинтез тРНК в зараженных бактериофагом MS2 клетках *E. coli* исследовали, определяя радиоактивность чистой тРНК фракции, меченой ¹⁴C-урацилом или ¹⁴C-гуанином. Продолжительную метку тРНК ¹⁴C-урацилом проводили до 40-й мин. заражения, предшественник добавлялся к культуре за 30 мин. до инфекции. Меткой такого рода пользовались с целью создания равномерного распределе-

ния радиоактивности во вновь синтезированной после заражения тРНК. Одновременно была исключена возможность увеличения метки за счет обмена субтерминального цитозина в уже синтезированных до начала мечения тРНК, так как известная часть урацила в клетках *E. coli* превращается в цитозин (Mc Carthy, Britten, 1962). При кратковременной метке тРНК ^{14}C -гуанина присутствовал начиная с 25-й до 35-й мин. с последующим добавлением нерадиоактивного основания и инкубацией до 40-й мин. инфекции. Полученные препараты тРНК подвергались проверке на чистоту с помощью электрофореза в 7,5% полиакриламидном геле.

На табл. I приведены данные синтеза тРНК в зараженных фагом MS2 клетках. Как видно, включение предшественников ^{14}C -урацила и ^{14}C -гуанина в тРНК не подавлено по сравнению с контролем из незараженных клеток.

Таблица I

Синтез тРНК в клетках *E. coli*, зараженных бактериофагом MS2

Приведенные числа относятся к содержанию РНК, выделенной на 40-й мин. из 100 мл культуры, зараженной фагом MS2. Продолжительная метка ^{14}C -урацилом: -30-й по 40-й мин. инфекции. Кратковременная метка ^{14}C -гуанином - 25-35 мин. инфекции. Приведены данные трех независимых опытов. В скобках контроль (незараженные клетки *E. coli*)

Продолжительная метка ^{14}C -урацилом		Кратковременная метка ^{14}C -гуанином	
Суммарная РНК имп/млн. $\times 10^{-5}$	тРНК имп/млн. $\times 10^{-5}$	Суммарная РНК имп/млн. $\times 10^{-5}$	тРНК имп/млн. $\times 10^{-5}$
II5(II4)	7,80(8,10)	12,5(II,7)	1,33(I,12)
II4(II0)	8,50(8,35)		
II9(II6)	8,88(8,70)		

Следовательно, синтез тРНК после инфекции фагом MS2 продолжается на нормальном, характерном для незараженного *E. coli* уровне.

В литературе имеются данные, указывающие на то, что синтез тРНК и аминоксил-тРНК синтез соответствует в целом скорости роста бактериальной культуры (Tze-Fei Wong et al., 1969; Heinonen et al., 1968) и количественные соотношения отдельных видов тРНК в клетке хорошо коррелирует с содержанием аминокислот в суммарном бактериальном белке (Yasane, 1965). На возможность перемен в содержании индивидуальных тРНК в клетке указывает изменения количественного состава изоакцепторных тРНК в разных условиях роста (Doi et al., 1968). Голодание по определенной аминокислоте избирательно уменьшает степень аминокислотирования соответствующей тРНК, но, по-видимому, не уровень ее синтеза (Morris, De Moss, 1965; Kaplan, 1969). В отдельных случаях найдено ускорение образования аминоксил-тРНК синтез в условиях рестрикции соответствующих им аминокислот (Naas, Neidhardt, 1967; Williams, Neidhardt, 1969). Однако, до сих пор не выяснено, соответствует ли синтез отдельных тРНК и аминоксил-тРНК синтезу уровня использования соответствующих им аминокислот в биосинтезе белка и является ли такая регуляция строгой.

Клетки *E. coli*, зараженные бактериофагом MS2, представляют собой удобный объект исследования подобной регуляции, так как фаговая репликация вносит определенные изменения в скорости биосинтеза белка и в использование отдельных аминокислот для белкового синтеза, не влияя на общий уровень синтеза тРНК.

На поздних стадиях репликации наблюдается интенсивный синтез белка оболочки фага, составляющего 30-40% всех синтезированных зараженной клеткой белков (Sugiyama, Stone, 1968). Белок оболочки MS2 по своему аминокислотному составу отличается от суммарного белка клеток *E. coli*, что должно отразиться на эффективности использования отдельных аминокислот в биосинтезе белка. При сопоставлении определенного нами аминокислотного состава общего белка *E. coli* AB 259 Hfr 3000 и известного состава белка оболочки MS2 (Lin et al., 1967) выявились наиболее характерные в этом отношении аминокислоты: гистидин (не содержащийся в белке оболочки MS2), валин (содержащийся в нем в избытке) и лизин (с одинаковым содержанием в белках).

Об уровне использования каждой из этих аминокислот в биосинтезе белка судили по включению ^{14}C -аминокислот во времени, сопоставляя данные для незараженных и зараженных фагом MS2 клеток.

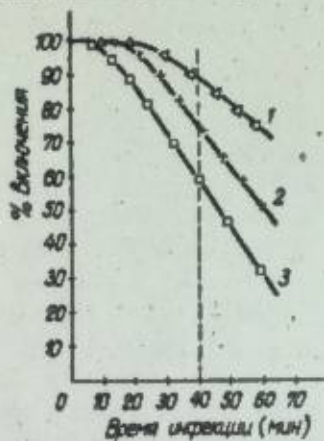


Рис. 4. Включение ^{14}C -аминокислот, присутствующих с начала инфекции в зараженных фагом MS2 клетках. (1 - валин; 2 - лизин; 3 - гистидин). Включение выражено в процентах от такового в незараженных клетках (контроль).

Фаговая инфекция на поздних стадиях вызывает заметное уменьшение синтеза общего белка в клетках и одновременно изменяет пропорции использования отдельных аминокислот в биосинтезе белка, в соответствии с их содержанием в общем клеточном белке и фаговом белке оболочки (рис. 4).

Несмотря на заметные различия во включении ^{14}C -аминокислот - валина, лизина и гистидина - в зараженных и незараженных клетках, акцепторная активность выделенной из них тРНК одинакова. Как общая активность, так и пропорциональные соотношения между валин-, лизин- и гистидинакцепторными активностями тРНК в зараженных клетках остаются без изменений (табл. 2).

Аналогичному анализу подверглись аминокцил-тРНК синтетазы, где определялась их активность в бесклеточном экстракте. Никаких различий в переносе валина, лизина и гистидина между препаратами аминокцил-тРНК синтетаз из зараженных и незараженных клеток не было обнаружено (табл. 3). В таблице приведенные данные для неочищенных препаратов, но такие же выводы были сделаны и при анализе очищенных на ДЭАЭ-целлюлозе ферментов.

Таблица 2

Акцепторная активность тРНК, выделенной из зараженных бактериофагом MS2 клеток *E. coli* на 40-й мин. после инфекции (микромоль связанной аминокислоты на 1 мг тРНК при 25°)

Аминокислота	Незараженные клетки (контроль)		Зараженные клетки
	0-мин.	40-мин.	40-мин.
Гистидин	0,20	0,23±0,01	0,20±0,01
Лизин	1,31	1,51±0,11	1,47±0,09
Валин	0,69	0,76±0,02	0,74±0,02

Таблица 3

Активность аминокцил-тРНК синтетаз (неочищенный препарат-105000 мг супернатант), выделенных из зараженных бактериофагом MS2 клеток *E. coli* на 40-й мин. после инфекции

Аминокислота	Незараженные клетки (контроль)	Зараженные клетки
	40-мин.	40-мин.
Гистидин	0,0185	0,0178
Лизин	0,430	0,440
Валин	0,251	0,259

Следовательно, уровень отдельных тРНК и аминокцил-тРНК синтетаз, установившийся в клетках *E. coli* логарифмической фазы, не претерпевает заметных изменений в результате заражения фагом MS2, хотя степень использования некоторых аминокислот в биосинтезе белка заметно меняется, особенно на поздних стадиях инфекции. Можно заключить, что уровень суммарной тРНК и соотношение отдельных ее видов не изменяются в новых физиологических условиях, вызванных заражением фагом MS2. Это делает вероятной гипотезу о конститутивном синтезе тРНК в клетках *E. coli*.

с сохранением характерного для данной бактерии соотношения индивидуальных тРНК. Пока еще нет убедительных доказательств, способных утвердить или опровергнуть данную гипотезу, однако весьма вероятно, что если синтез отдельных видов тРНК действительно поддается регуляции, то ее связь с биосинтезом белка не является прямой или, по крайней мере, пропорциональной. Отсутствие ответной реакции со стороны аминсацил-тРНК синтетаз в условиях нашего эксперимента также указывает на отсутствие пропорциональной взаимосвязи их количества с эффективностью использования соответствующих им аминокислот в белковом синтезе.

III Синтез клеточных рРНК и мРНК во время интенсивной репликации бактериофага MS2.

Согласно литературным данным, синтез рРНК *E. coli* заметно подавляется во время интенсивной репликации РНК-содержащих бактериофагов B17 (Hudson, Raganbush, 1967; Igarashi et al., 1970), ZIK/I (Bishop, 1966), R23 (Watanabe, Watanabe, 1971). Следует отметить, что почти все данные были получены анализом РНК из зараженных клеток ультрацентрифугированием в градиенте сахаразы, который не позволяет полностью разделить фагоспецифические и клеточные РНК, без чего нельзя с полной уверенностью судить о степени угнетения синтеза рРНК хозяина.

Более точным методом анализа рРНК является ДНК/РНК гибридизация с насыщенным ДНК, фиксированной на мембранных фильтрах (Gillespie, Spiegelman, 1965). При изучении синтеза рРНК источником РНК для гибридизации служили зараженные клетки *E. coli*, в которых РНК метили ^3H -урацилом с 15-й по 25-ю мин. или с 25-й по 35-ю мин. инфекции, после чего в присутствии избытка радиоактивного урацила продолжали инкубацию до 40-й минуты. В качестве контроля служила РНК незараженных клеток *E. coli* в аналогичных условиях эксперимента. Избирательность гибридизации, т.е. связывание с ДНК практически только рРНК контролировалась методом конкурентной гибридизации с избытком немеченой рибосомальной РНК.

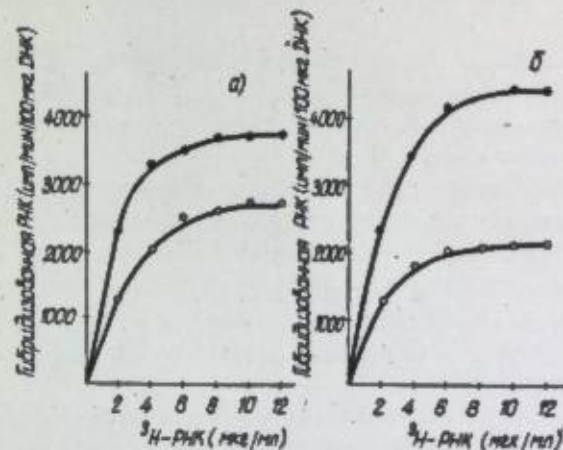


Рис. 5. Гибридизация *E. coli* ДНК с ^3H -РНК из зараженных MS2 (—•—) и незараженных (---○---) клеток *E. coli*. Продолжительная метка суммарной РНК ^3H -урацилом (2 мкг/мл) на 15-25 мин. (а) или 25-35 мин. (б) после инфекции с последующей инкубацией с немеченым урацилом до 40-й мин. Гибридизацию ^3H -РНК проводили 5 часов при 67° в 1 мл буфера 6 x SSC (0,9 M NaCl, 0,09 M цитрат натрия, pH 7,0) на фильтрах Whatman, содержащих 40-45 мкг ДНК.

Как видно из рис. 5, характер кривых насыщения ДНК меченой РНК из зараженных клеток не отличается от контроля *E. coli*, но радиоактивность гибридованной РНК заметно понижается в районе насыщения, что свидетельствует о более низкой удельной радиоактивности рибосомальной РНК, участвующей в гибридизации. Так как удельная радиоактивность общей рибосомальной РНК коррелирует с эффективностью ее синтеза за время метки, можно вычитать, что в зараженных клетках в период с 15 по 25-ю мин. инфекции рРНК образуется, по крайней мере, на 29% меньше, чем за то же время в незараженных клетках (рис. 5а); в период же с 25

по 35-й мин. после инфекции синтез рРНК уменьшается на 54% (рис.5б).

Следовательно, в период наиболее интенсивного синтеза фаговой РНК в зараженных клетках образование рибосомальной РНК хозяина уменьшается более чем в два раза по сравнению с незараженными клетками.

Распространяется ли подобное торможение специфически только на образование рибосомальной РНК или затрагивает также синтез клеточной мРНК - ответ на этот вопрос мог быть получен лишь в результате изучения синтеза мРНК в зараженных клетках.

В литературе имеются данные, которые как будто бы свидетельствуют о подавлении синтеза мРНК хозяина на поздних стадиях репликации фагов MS2, MS2, MS2 (Watanabe, Watanabe, 1970) и MS2 (Sugiyama, Stone, 1968). Однако, они недостаточно убедительны, так как сделанные выводы основываются лишь на измерениях активности β-галактозидазы в клетке, где понижение активности фермента может быть результатом угнетения общего синтеза клеточных белков после заражения, а не предполагаемого подавления синтеза лас мРНК.

Для определения синтеза мРНК в зараженных фагом MS2 клетках E. coli нами были проведены эксперименты по гибридизации ДНК E. coli с импульсно меченой (1 мин.) ³H-урацилом РНК - радиоактивный предшественник добавлялся к культуре на 30-й мин. инфекции (время максимальной скорости репликации фаговой РНК, рис.3).

Для обеспечения наиболее полного связывания всех видов клеточных РНК и ДНК в опытах использовались денатурация РНК формамидом (Mc Connoughy et al., 1969) и предложенный Кеннедом (Kennel, 1968) большой избыток ДНК в гибридационной смеси ($\frac{ДНК}{РНК} > 200$), что позволило в случае E.coli РНК гибридизовать более 60% введенной РНК (рис. 6).

Гибридуемая ³H-РНК из зараженных клеток составляет 75% от контроля E. coli, что, с учетом одинаковой эффективности гибридизации, свидетельствует о подавлении синтеза РНК хозяина на 30-й мин. (рис. 6).

Учитывая, что тРНК составляет незначительную часть гибриди-

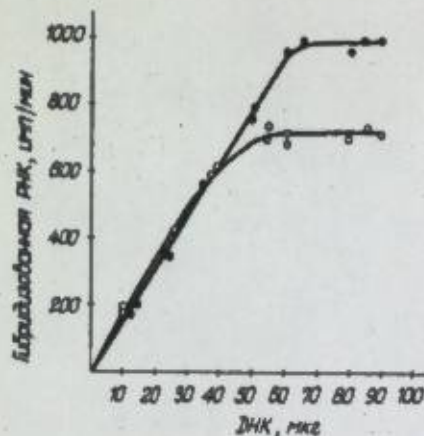


Рис.6. Гибридизация импульсно меченой ³H-РНК. Гибридизации проводили 40 часов при 42° на фильтрах NUP3 с указанным количеством ДНК, в 0,5 мл 48% формамида - 5 x SSC, содержащем 0,276 мкг ³H-РНК (1550 имп/мин.) из интактных клеток E. coli (—•—) или 0,282 мкг ³H-РНК (2700 имп/мин.) из зараженных фагом MS2 клеток (—○—). РНК в клетках метили в течение одной минуты ³H-урацилом на 30-й мин. инфекции.

зуемой РНК, и то, что заражение не затрагивает ее синтез, вопрос сводится к следующему: касается ли наблюдаемое угнетение синтеза обоих видов клеточных РНК (мРНК и рРНК), или репликация MS2 избирательно подавляет синтез лишь одного вида РНК.

Конкурентная гибридизация ³H-РНК в присутствии возрастающих концентраций немеченой рибосомальной РНК (рис.7) в сопоставлении с данными, представленными на рис.6, позволила определить количество рРНК и мРНК в гибридуемой РНК и сделать анализ состава суммарной РНК, синтезированной зараженными клетками на 30-й мин. инфекции (табл.4).

Из результатов, приведенных на табл. 4, следует, что содержание мРНК в общей гибридуемой ³H-РНК практически одинаково в обоих случаях (840 имп/мин. в препарате ³H-РНК из зараженных фагом MS2 клеток, 870 имп/мин. - в контроле E. coli). Следовательно, репликация фага MS2 не влияет на биосинтез матричной РНК E. coli. Кроме того, приведенные результаты показывают снижение на 50% содержания рибосомальной РНК в суммарной гибри-

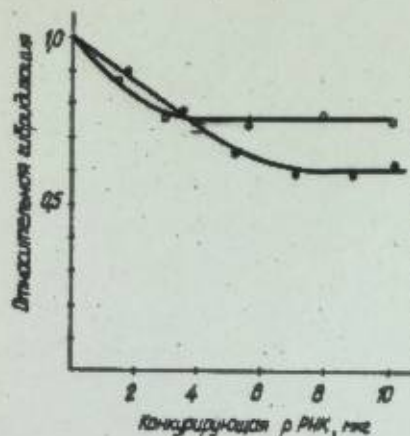


Рис. 7. Конкуренция гибридация ^3H -РНК.
Гибридацию проводили в условиях, охарактеризованных на рис. 6. Смесь, кроме ^3H -РНК, содержала 80 мкг ДНК на фильтрах и соответствующее количество немеченой рРНК.
 ^3H -РНК из зараженных клеток (—○—), контроль E. coli (—□—).

Таблица 4

Состав РНК, выделенных из незараженных и зараженных бактериофагом MS2 клеток E. coli (по данным гибридизации) (*) Количество тРНК — условное, вычислено с учетом ее содержания — 10% от количества рРНК

Вид РНК	Радиоактивность ^3H -РНК (имп/мин.)	
	Незараженные клетки E. coli	Зараженные фагом MS2 клетки
Суммарная РНК MS2 РНК, мРНК, рРНК, тРНК	-	2600
Гибридуемая мРНК, рРНК, тРНК РНК	1550	1200
рРНК	620	300
тРНК (*)	60	60
мРНК	870	840
MS2 РНК	-	1400

дикуемой РНК, выделенной из зараженных фагом MS2 клеток, по сравнению с аналогичным препаратом ^3H -РНК из незараженного E. coli что полностью подтверждает сделанный ранее вывод о подавлении синтеза рибосомальной РНК хозяина в зараженных клетках E. coli (рис. 5).

Повышенное количество фаговой РНК, содержание которой определено по разнице между суммарной и гибридуемой РНК зараженных клеток (с учетом эффективности гибридизации — 60%), дополнительно указывает на связь между увеличением скорости синтеза общей РНК в зараженных клетках (рис. 2) и интенсивным синтезом РНК бактериофага MS2 (рис. 3).

Таким образом, в зараженных фагом MS2 клетках E. coli фагоспецифическая РНК синтезируется с нарастающей скоростью, что приводит к увеличению скорости синтеза общей РНК в периоде 20-40 мин. после инфекции с максимумом на 30-й мин., когда, по данным гибридизации, синтезированная фаговая РНК составляет 50% от общей РНК. Интенсивная репликация фаговой РНК сопровождается избирательным подавлением синтеза клеточной рибосомальной РНК, которой на 30-й мин. инфекции образуется в два раза меньше, чем в незараженных клетках E. coli. Незмененный синтез остальных видов РНК хозяина (мРНК, тРНК) свидетельствует об избирательности действия фаговой репликации, тормозящей биосинтез исключительно рибосомальной РНК в клетке. Это подавление, очевидно, предопределяется уже на уровне регуляции синтеза рРНК, а не является результатом ускоренной деградации рРНК в зараженных клетках, так как опыты с продолжительной (рис. 5б) и импульсной (табл. 4) метками дают одинаковые результаты. Подавление синтеза рибосомальной РНК во время фаговой репликации можно объяснить двойко: 1) фаговая РНК или фагоспецифические белки являются специфическими репрессорами биосинтеза рибосомальной РНК; 2) торможение синтеза рибосомальной РНК является результатом конкуренции между фагоспецифическим и клеточным матричным биосинтезом за использование какого-либо дефицитного фактора хозяина. Имеющиеся в литературе данные (Traversa et al., 1970) свидетельствуют в пользу второй возможности, ибо в случае РНК-содержащего бактериофага Q_d найдено, что фаговая

Центральная научная
Библиотека
Академии наук Украинской ССР

РНК-полимераза содержит в качестве одной из субъединиц белковый фактор Ψ_{τ} , который в незараженных клетках *E. coli* стимулирует инициацию транскрипции локуса рибосомальной РНК клеточной ДНК-зависимой РНК-полимеразой.

Учитывая возможность существования аналогичного положения и в случае других РНК-содержащих бактериофагов, можно предположить, что в зараженных фагом M32 клетках, параллельно образованию фагоспецифической РНК-полимеразы, уменьшается количество свободного фактора Ψ_{τ} , в связи с чем стимуляция синтеза рибосомальной РНК снижается (рис.5). Инициация же синтеза других клеточных РНК (мРНК и тРНК) не требует участия фактора Ψ_{τ} , и их синтез в зараженных клетках не подавлен.

В ы ы ы

1. В отличие от Т-четных бактериофагов, полностью подавляющих биосинтез ДНК, РНК и белка *E. coli* сразу после инфекции, РНК-содержащий бактериофаг M32 лишь на поздних стадиях репликации оказывает определенное тормозящее воздействие на матричный биосинтез хозяина, причем это действие является избирательным.

2. Скорость синтеза ДНК в зараженных фагом M32 клетках не претерпевает заметных изменений до 30-й мин. инфекции. В результате эффективного синтеза фаговой РНК наблюдается ускорение синтеза суммарной РНК по сравнению с незараженными клетками с достижением максимальной скорости на 30-й мин. инфекции. Следовательно, клетки *E. coli* в логарифмической фазе располагают дополнительным потенциалом синтеза РНК, не используемым при нормальном росте.

3. Синтез тРНК в клетках *E. coli* не изменяется в результате репликации фага M32 (содержание включенного ^{14}C -урацила и ^{14}C -гуанина в очищенных препаратах тРНК) и продолжается на уровне, характерном для незараженных клеток *E. coli*.

4. Различия в аминокислотном составе суммарного клеточного

белка и фагового белка оболочки, образующегося в большом избытке в зараженных фагом M32 клетках, приводит к соответствующим изменениям в использовании аминокислот в биосинтезе белка. Это коррелирует с изменениями во включении ^{14}C -аминокислот - валина, лизина и гистидина - по сравнению с незараженными клетками.

5. Несмотря на неодинаковую степень участия валина, лизина и гистидина в биосинтезе белка зараженными фагом M32 и незараженными клетками *E. coli* функциональная активность соответствующих тРНК и аминоацил-тРНК синтетаз в обоих случаях одинакова. Таким образом, уровень синтеза отдельных видов тРНК и активность аминоацил-тРНК синтетаз строго не определяется эффективностью использования соответствующих им аминокислот в биосинтезе белка.

6. Репликация фага M32 в клетках *E. coli* не влияет на синтез клеточной мРНК, образование которой в незараженных и зараженных клетках (по данным ДНК/РНК гибридизации) на 30-й мин. инфекции протекает практически с одинаковой скоростью.

7. Уровень синтеза рибосомальной РНК в зараженных клетках *E. coli* на 30-й мин. инфекции составляет не более 50% ее синтеза незараженными клетками (по данным ДНК/РНК гибридизации). Согласно предполагаемому механизму, в зараженных клетках, параллельно образованию фаговой РНК-полимеразы, уменьшается количество свободного фактора Ψ_{τ} , необходимого для инициации синтеза рибосомальной РНК.

Основные результаты диссертации изложены в следующих работах:

1. Берзин В.М., Грен Э.Я.
"Устойчивость и обратимая инактивация аминокцилл-тРНК синтезов". Изв.АН ЛатвССР, 1971, № 6, 53
2. Берзин В.М., Грен Э.Я.
"Корреляция между включением ^{14}C -аминокислот и ферогенетическим синтезом белка в клетках *E. coli*, инфицированных бактериофагом MS2".
Изв.АН ЛатвССР, 1971, № 11, 115.
3. Берзин В.М.
"Влияние репликации бактериофага MS2 на биосинтез ДНК и матричной РНК *E. coli*". Тезисы II конференции молодых ученых Института органического синтеза АН ЛатвССР, Рига 1972, 28.
4. Берзин В.М., Грен Э.Я.
"тРНК и аминокцилл-тРНК синтезам в клетках *E. coli*, зараженных фагом MS2".
Молекулярная биология, 1972, 6, № 5.
5. Берзин В.М., Грен Э.Я.
"Синтез стабильных РНК в зараженных бактериофагом MS2 клетках *E. coli*". Биохимия, 1972, 37, № 4.
6. E.Gren, G.Rosenthal, V.Berzin
"Effect of bacteriophage MS2 infection on protein and RNA synthesis in *Escherichia coli*"
Abstr. Commun. 7th Meet. Eur. Biochem. Soc., 1971, p.168.

Подписано к печати 25 апреля 1972 г.
ИТ №5268 . Заказ №64 . Тираж 250
Бесплатно. Отпечатано на ротационной
машине Института органического синтеза АН
Латв.ССР, г. Рига, ул. Аляксандра 21.