

УДК 577.113

©А.Ю.Лебенка, В.И.Мелвидас.

ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ШТАММОВ БАКТЕРИЙ *E. COLI* И *C. FREUNDII* К 5-АЗАЦИТИДИНУ

А.Ю.ЛЕБЕНКА, В.И.МЕЛВИДАС

Лаборатория генетики института ботаники, г.Вильнюс, Литовская Республика
тел.: (22) 729950; факс:(22) 729950.

Исследована чувствительность штаммов *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii* к 5-азацитидину и рестриктазная активность в частично очищенных бесклеточных экстрактах. Установлено, что рестриктазная активность присутствует только в штаммах, чувствительных к 5-азацитидину. В бактериальных штаммах, устойчивых к 5-азацитидину, рестриктазная активность не была определена.

Ключевые слова: 5-азацитидин, эндонуклеазы рестрикции, *E.coli*, *C.freundii*.

ВВЕДЕНИЕ: 5-азацитидин (5-азаС) является аналогом цитозина, в котором СН группа в 5 позиции замещена атомом азота. В начале он был исследован как химиотерапевтический противораковый агент, позже привлек внимание молекулярных биологов, так как он может селективно изменять активность эукариотических генов, а в некоторых случаях - уровень дифференциации клеток [1]. Причина этого - включение 5-азаС в ДНК и ингибирование процессов ее метилирования [2]. Известно, что при росте бактерий на минеральной среде с 5-азаС он замещает 8,4% цитозиновых оснований [3]. 5-азаС-ДНК образует прочные связи с ДНК-метилазами, выделенными из различных видов бактерий, и тем самым ингибирует их активность [3-4]. Исследования воздействия 5-азаС на природные штаммы энтеробактерий ранее не проводились.

Целью настоящей работы было определение чувствительности природных штаммов *E.coli* и *C.freundii* к 5-азаС и ее возможную связь с активностью ферментов рестрикции-модификации ДНК.

МЕТОДИКА: Бактерии высевали в стерильные пробирки, содержащие по 3 мл питательной среды LB [5]. Клетки выращивали в течение 3 ч на ротационной термостатируемой качалке при 37°C и 200 об/мин. В лунки репликатора вносили

образцы каждой из исследуемых культур объемом по 50 мкл. Репликатор вставляли в лунки и производили реплики исследуемых штаммов на чашки Петри со средой М9 следующего состава (г/л воды): Na_2HPO_4 - 6, KH_2PO_4 - 3, NaCl - 0,5, NH_4Cl - 1, MgSO_4 - 0,24, CaCl_2 - 0,01, глюкоза - 2, гидролизат казеина 2, агар 15, (рН 7,0-7,2), а также различные концентрации 5-азаС в диапазоне от 0,001 до 25 мкг/мл.

Для определения энзиматической реакции ферментов рестрикции ДНК *in vitro* бактерии выращивали в жидкой среде LB до конца логарифмической фазы и осаждали центрифугированием.

Получение бесклеточных экстрактов и частичную их очистку проводили ранее описанным способом [6]. Для этого 3-5 г биомассы бактерий суспендировали в 20 мл калий-фосфатного буфера рН 7,4, содержащего 7 мМ 2-меркаптоэтанол, 2 мМ ЭДТА и 10% глицерина (буфер А) и разрушали ультразвуком. Бесклеточный экстракт центрифугировали 1 ч при 48000 g. Надосадочную жидкость наносили на колонку фосфоцеллюлозы P11 (1X7 см), уравновешенную буфером А. Колонки отмывали буфером А до исчезновения поглощения при 280 нм. Элюцию проводили буфером А (100 мл) с линейным градиентом концентрации NaCl от 0 до 1 М. Определение активности рестриктаз проводили в 40 мкл реакционной смеси следующего состава: 10 мМ трис- HCl -буфер, рН 7,5, 10 мМ MgCl_2 , 5 мМ 2-меркаптоэтанол, 2 мкг ДНК фага λ (1 ч при 37°). Электрофорез ДНК проводили в 1%-ном геле агарозы в 40 мМ трис-ацетатном буфере, рН 8,0, 2 мМ ЭДТА [5].

5-азаС-ДНК выделяли из клеток *E.coli* В834, выращенных на минеральной среде М9 в присутствии 25 мкг/мл 5-азаС [4]. Метилирование ДНК *in vitro* проводили в 30 мкл реакционной смеси, содержащей 40 мМ калий-фосфатный буфер (рН 7,8), 10 мМ ЭДТА, 1 мМ ДТТ, 1 мкг ДНК *E.coli* В 834 или 1 мкг 5-азаС-ДНК и 2 мкл [^3H] Адо-мет (уд. активность 555 гБк/ммоль "Amersham" (Англия) и по 3-5 мкл метилаз.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ: Бактерии *E.coli* после их выращивания в течение 3 ч в жидкой минеральной среде LB реплицировали на чашки Петри, содержащие 5-азаС в концентрации 1,6,10,15,20,25 мкг/мл. В качестве контроля служили реплики на среду, не содержащую 5-азаС. Чашки Петри помещали в термостат и инкубировали в течение 16 ч при 37°С. Аналогично проводились эксперименты на штаммах *C.freundii* с той лишь разницей, что чувствительность их определялась на питательной среде, содержащей меньшие концентрации 5-азаС. Предварительные эксперименты показали, что штаммы *C.freundii* менее устойчивы к 5-азаС, чем штаммы *E.coli*, и для их исследования мы использовали концентрации 5-азаС 0,5, 1, 3, 5 и 8 мкг/мл.

В таблицах 1 и 2 представлены результаты определения чувствительности штаммов *E.coli* к 5-азаС при различных его концентрациях. Установлено, что в коллекции № 1 из восемнадцати исследованных штаммов тринадцать являются устойчивыми к 5-азаС и растут при его концентрации, равной 25 мкг/мл. В коллекции №2 из тридцати трех штаммов устойчивы двадцать два. Остальные штаммы обеих коллекций были чувствительны к 5-азаС.

Таблица 1. Чувствительность штаммов *Escherichia coli* к 5-азацитидину

№ шт	Штамм <i>E.coli</i>	Концентрация 5-азацитидина, мкг/мл							Возможное присутствие ферментов Р-М ДНК	Активность рестрик- тазы (+)
		0	1	6	10	15	20	25		
1	1-1	+	+	+	+	+	+	+	-	-
2	1-2	+	+	+	+	+	+	+	-	-
3	1-3	+	+	+	+	+	+	+	-	-
4	1-6	+	-	-	-	-	-	-	+	+
5	1-7	+	+	+	+	+	+	-	+	-
6	1-8	+	+	+	+	+	+	+	-	-
7	1-10	+	+	+	+	+	+	+	-	-
8	1-11	+	+	+	+	+	+	+	-	-
9	1-13	+	+	+	+	+	-	-	+	+
10	1-15	+	+	+	+	+	+	+	-	-
11	1-19	+	+	+	+	+	+	+	-	-
12	1-20	+	+	+	-	-	-	-	+	-
13	1-24	+	+	+	+	+	+	+	-	-
14	1-26	+	+	+	-	-	-	-	+	-
15	1-27	+	+	+	+	+	+	+	-	-
16	1-29	+	+	+	+	+	+	+	-	-
17	1-30	+	+	+	+	+	+	+	-	-
18	1-31	+	+	+	+	+	+	+	-	-

Восемь из пятнадцати штаммов *C.freundii* были устойчивы к 5-азаС (см. таблицу 3).

В каждом из исследованных штаммов мы определяли активность рестриктаз. Ее определяли в бесклеточных экстрактах бактерий, полученных из 3-5 г биомассы после их дезинтеграции ультразвуком, центрифугирования и очистки на фосфоцеллюлозе. Это позволяло очистить эндонуклеазы от неспецифических нуклеаз и очень точно определить их активность. Рестриктазная активность была нами определена в штаммах *E.coli* 1-6, 1-13 (см. таблицу 1), 148, 227, 1239 (см. таблицу 2) и в штаммах *C.freundii* 60/27 и 69/46 (см. таблицу 3). Все эти штаммы были чувствительны к 5-азаС. Штаммы *E.coli* 1-7, 1-20, 1-26, 32, 66, 369, 1268 и штаммы *C.freundii* 69, 73, 178, 3806, 3808, С-488 были чувствительны к 5-азаС, однако, в них нам не удалось определить активности рестриктаз.

В клетках *E.coli* и *C.freundii* найдено большое число ферментов рестрикции-модификации ДНК, узнающих различные последовательности ДНК [7]. Наши эксперименты показали, что в 5 из 51 (9,8%) нами исследованных штаммов *E.coli* и в 2 из 15 (13,3%) штаммов *C.freundii* найдены рестриктазы. Присутствие рестриктазной активности показывает, что в данном штамме имеется комплекс

Таблица 2. Чувствительность штаммов *Escherichia coli* к 5-азацитидину

No шт	Штамм <i>E.coli</i>	Концентрация 5-азацитидина, мкг/мл							Возможное присутствие ферментов Р-М ДНК	Активность рестрик- тазы (+)
		0	1	6	10	15	20	25		
1	22	+	+	+	+	+	+	+	-	-
2	32	+	+	+	+	+	-	-	+	-
3	62	+	+	+	+	+	+	+	-	-
4	66	+	+	+	+	+	+	-	+	-
5	94	+	+	+	+	+	+	+	-	-
6	102	+	+	+	-	-	-	-	+	-
7	126	+	+	+	+	+	+	+	-	-
8	131	+	+	+	+	+	+	+	-	-
9	148	+	-	-	-	-	-	-	+	+
10	149	+	+	+	+	+	+	+	-	-
11	151	+	+	+	+	+	+	+	-	-
12	153	+	+	+	+	+	+	+	-	-
13	155	+	+	+	+	+	+	+	-	-
14	156	+	+	+	+	+	+	+	-	-
15	160	+	+	+	+	+	+	+	-	-
16	170	+	+	+	+	+	+	+	-	-
17	227	+	+	-	-	-	-	-	+	+
18	309	+	+	+	+	+	+	+	-	-
19	316	+	+	+	+	+	+	+	-	-
20	341	+	+	+	+	+	+	+	-	-
21	361	+	+	+	+	+	+	+	-	-
22	368	+	+	+	+	+	+	+	-	-
23	369	+	+	+	+	+	+	-	+	-
24	370	+	+	+	+	+	+	+	-	-
25	381	+	+	+	+	+	+	+	-	-
26	396	+	+	+	+	+	+	+	-	-
27	414	+	+	+	+	+	+	+	-	-
28	428	+	+	+	+	+	+	+	-	-
29	433	+	+	+	+	+	+	+	-	-
30	465	+	+	+	+	+	+	+	-	-
31	1239	+	+	+	+	+	+	-	+	+
32	1248	+	+	+	+	+	+	+	-	-
33	1268	+	+	+	+	+	-	-	+	-

ферментов рестрикции-модификации ДНК, выполняющих функцию защиты клетки от фаговой инфекции. 5-азаС-ДНК с С5 и N4 метилазами образует прочные комплексы и ингибирует их активность [3-4]. Об этом свидетельствовали и наши исследования ингибирующего действия 5-азаС-ДНК на активность метилаз,

выделенных из различных бактерий, в том числе *E.coli* и *C.freundii* (см. табл.4). 5-аза С-ДНК *E.coli* В834, содержащая 8 моль % 5-азаС, ингибировала активность метилаз из *E.coli* и *C.freundii* от 61,2 % (Cfr 1) до 91,7% (Cfr 10). Схожие результаты мы наблюдали и у всех остальных метилаз в независимости от того метилируют ли они 5 или 4 метилцитозин. Именно образование прочных комплексов с ДНК метилазами и может объяснить наблюдаемое нами проявление чувствительности к 5-азаС в отсутствии в исследуемом штамме рестриктазной активности.

Таблица 3. Чувствительность штаммов *Citrobacter freundii* к 5-азацитидину

No пп	Штамм <i>C.freundii</i>	Концентрация 5-азацитидина, мкг/мл Чувствительный штамм (-)						Возможное при- сутствие фер- ментов Р-М ДНК	Активность рестриктазы (+)
		0	0,5	1	3	5	8		
1	1/2797	+	+	+	+	+	+	-	-
2	10/275	+	+	+	+	+	+	-	-
3	51/5	+	+	+	+	+	+	-	-
4	60/27	+	+	+	-	-	-	+	+
5	69/46	+	+	+	+	-	-	+	-
6	70/50	+	+	+	+	+	-	+	+
7	73/928	+	+	-	-	-	-	+	-
8	92/1313	+	+	+	+	+	+	-	-
9	164/307	+	+	+	+	+	+	-	-
10	178/249	+	+	+	-	-	-	+	-
11	544	+	+	+	+	+	+	-	-
12	3806	+	+	+	-	-	-	+	-
13	3808	+	-	-	-	-	-	+	-
14	C-488	+	+	+	-	-	-	+	-
15	C-554	+	+	+	+	+	+	-	-

Таблица 4. Ингибирующее действие 5-азаС-ДНК на активность ДНК-метилаз

Метилаза	Метилируемая последовательность	Ингибирование, %
Eco RII	Cm ⁵ C(A/T)GG	91,4
Cfr I	PyGGm ⁵ CCPu	61,2
Cfr 6	CAGm ⁴ CTG	77,0
Cfr 9	Cm ⁴ CCGGG	83,9
Cfr 10	Pum ⁵ CCGGPy	91,7
Alu I	AGm ⁵ CT	97,9
Bcn I	Cm ⁴ C(C/G)GG	77,5
Mva I	Cm ⁴ C (A/T)GG	91,5
Pvu I	CGATm ⁴ CG	60,9
Pvu II	CAGm ⁴ CTG	87,3
Sau 3A	GATm ⁵ C	93,5

Используемая методика определения чувствительности бактерий к 5-азаС позволяет проводить предварительный отбор штаммов, содержащих системы ферментов рестрикции-модификации ДНК, из очень больших коллекций без необходимости определения ферментативной активности в каждом из исследованных штаммов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Jones P.A. (1985). Cell. **40**, 485.
2. Cedar H., Razin A. (1990). Biochim.Biophys.Acta., **1049**, 1-8.
3. Friedman S. (1981) Molecular Pharmacology. **19**, 314-320.
4. Веножинскис М.Т., Нестеренко В.Ф., Канопкайте С.И., Бурьянов Я.И. (1985) Биохимия, **50**, 749-754.
5. Maniatis T., Fritsch E.E., Sambrook J. (1982). Molecular Cloning. A laboratory Manual.
6. Лебенка А.Ю., Рачкус Ю.А. (1989). Биохимия, **54**, 1009-1014.
7. Roberts R.J., Macelis D.(1997). Nucleic Acids Res., **25**, 248-262.

Поступила 10.04.00

THE SENSITIVITY OF *E.COLI* AND *C.FREUNDII* STRAINS TO 5-AZACYTIDINE

A.YU. LEBENKA, V.I.MELDIDAS

Laboratory of Genetics, Institute of Botany, Vilnius, Lithuania,
tel/fax: (22)729950.

The sensitivity of *E.coli* and *C.freundii* strains to 5-azacytidine and restrictase activity of partially purified cell-free extracts were investigated. Restrictase activity was found only in 5-azacytidine-sensitive strains. In the 5-azacytidine-resistant strains restrictase activity was not detected.

Key words: 5-azacytidine, restriction endonucleases, *E.coli*, *C.freundii*