

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DEN MECHANISMUS DER INDUKTION LYSOGENER BAKTERIEN

X. DER EINFLUSS VON RNS-SYNTHESE-HEMMERN AUF DIE INDUKTION *

E. GEISSLER und K. ISSERSTEDT

Institut für Krebsforschung,
Experimenteller Bereich, der Deutschen Akademie der Wissenschaften zu Berlin

Eingegangen am 27. Januar 1966

Einleitung

Bei unseren Versuchen über die Wirkung halogener Uracil-Analoga auf *Escherichia coli* K12 (λ)-Zellen hatten wir unter anderem gefunden, daß 5-Fluoruracil¹ sowohl induziert (GEISSLER, 1963) als auch induktionshemmend wirkt (GEISSLER, 1964). Auf die Frage der Induktion durch FU und andere RNS-Synthese-Hemmer wurde inzwischen an anderer Stelle näher eingegangen (GEISSLER, 1966 b). Dabei wurde die Hypothese vorgeschlagen, daß die Induktion durch RNS-Synthese-Hemmer über eine Hemmung der Synthese der Phagen-Repressoren erfolgt.

Im folgenden soll untersucht werden, ob neben FU weitere RNS-Synthese-Hemmer induktionshemmend wirken, worauf eine derartige Wirkung zurückgeführt werden kann, und ob es sich dabei um eine Verhinderung oder Aufhebung der Induktion handelt.

Material und Methoden

Die methodischen Einzelheiten wurden größtenteils bereits an anderer Stelle mitgeteilt (vgl. GEISSLER, 1966 a). 5-Fluoruracil und 5-Fluoruridin wurden freundlicherweise von der Deutschen Hoffmann-La Roche AG, Grenzach, zur Verfügung gestellt. Proflavin wurde uns dankenswerterweise von Professor STARLINGER, Köln, und 6-Azauracil von Dozent SKODA, Praha, überlassen. 8-Azaguanin wurde von der Firma Chemapol, Praha, Actinomycin D von Merck, Sharp und Dohme Research Laboratories, Rahway, N. J., bezogen.

Zur Behandlung mit Actinomycin D wurden die *E. coli* K12 (λ)-Zellen mit der von LEIVE (1965) vorgeschlagenen, von uns leicht modifizierten Methode (vgl. Legende zu Abb. 6) sensibilisiert.

In den UV-Versuchen wurden gewaschene Bakterien-Populationen in Saline mit dem UV-Brenner S 375 vom VEB Berliner Glühlampenwerk im Abstand von 1 m mit einer Dosisleistung von $2,4 \times 10^4$ erg/cm² sec behandelt.

Ergebnisse

Von vornherein war zu erwarten, daß die Induktionshemmung durch FU nicht die Folge einer Hemmung der DNS-Synthese sein kann, da dieser Effekt zuerst beim Arbeiten mit einer lysogenen Thymin-Mangel-Mutante beobachtet worden war, wo 5-Fluordesoxyuridylsäure (als mit der DNS-Synthese interferierendes FU-Derivat) keinen Angriffspunkt findet. Deshalb sollte auch das entsprechende Ribosid mit der Thymin-Mangel-Induktion interferieren.

* Veränderte Fassung eines auf der 2. Tagung der Federation of European Biochemical Societies im April 1965 in Wien gehaltenen Vortrages.

¹ Abkürzungen: FU, 5-Fluoruracil; FUR, 5-Fluoruridin.

Tatsächlich zeigt sich, daß die Wirkung von 5 µg/ml FUR auf die Thymin-Mangel-Induktion viel ausgeprägter ist als die von FU (Abb. 1) (obwohl die doppelte FUR-Dosis hätte appliziert werden müssen, wollte man mit äquimolaren Mengen arbeiten). Erwartungsgemäß kann die FUR-Wirkung durch gleichzeitige Gabe von 200 µg/ml Uracil weitgehend vermieden werden (Abb. 2), so daß wieder fast alle Zellen durch den Thymin-Mangel induziert werden.

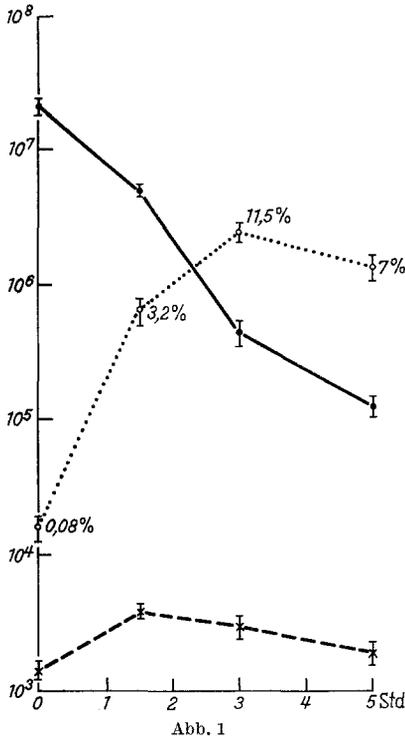


Abb. 1

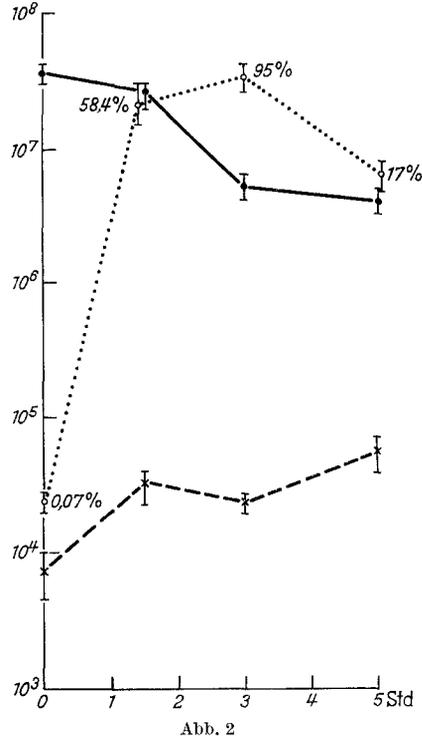


Abb. 2

Abb. 1. Viabilität von *E. coli* K 12 (λ) thy⁻(E 70)-Zellen (●—●), Titer freier λ -Phagen (x -- x) und induzierte E 70-Zellen (o . . . o) in thyminfreiem SS-Medium in Gegenwart von 5 µg/ml 5-Fluoruridin. Vertikale Linien: Streuungen der Mittelwerte

Abb. 2. Viabilität von E 70-Zellen, Titer freier λ -Phagen und induzierte E 70-Zellen in thyminfreiem SS-Medium in Gegenwart von 5 µg/ml 5-Fluoruridin und 200 µg/ml Uracil

Ist der Hemmeffekt nun darauf zurückzuführen, daß FU-Derivate in die messenger-RNS oder in eine andere RNS-Komponente inkorporiert werden und dann Transcriptions- oder Translationsfehler verursachen oder interferieren sie unspezifisch mit der Synthese der Gesamt-RNS oder mit einer spezifischen RNS-Fraktion? Im ersteren Fall dürfte neben FU nur noch 8-Azaguanin die Induktion hemmen. Dieses Analogon wird wie FU in die RNS inkorporiert und verursacht wie FU Störungen bei Informationstransfer (phänotypische Reversionen) (BARNETT und BROCKMANN, 1962). Im anderen Fall dagegen wäre von allen RNS-Synthese-Hemmern ein Effekt zu erwarten — gleichgültig, ob sie in die RNS inkorporiert werden und auf welchem Wege sie die RNS-Synthese hemmen.

Tatsächlich kann die Thymin-Mangel-Induktion auch durch 200 µg/ml Azaguanin gehemmt werden (Abb. 3). Diese Hemmung ist zwar verhältnismäßig

schwach. Sie ist aber vor allem deshalb bemerkenswert, weil die gleiche Azaguanin-Dosis innerhalb von 5 Std auf lysogene Wildtyp-Populationen keinen Einfluß hat. Besonders eigenartig ist deshalb die Tatsache, daß Azaguanin bei den E 70-Zellen im Beobachtungszeitraum die Phagenproduktion vollständig hemmt.

Die Thymin-Mangel-Induktion wird andererseits aber auch — wie bereits angedeutet worden war (GEISLER, 1964) — durch 10 µg/ml 6-Azauracil signifikant gehemmt, durch eine Substanz also, die mit der RNS-Synthese interferiert, aber nicht in die RNS eingebaut wird (Abb. 4).

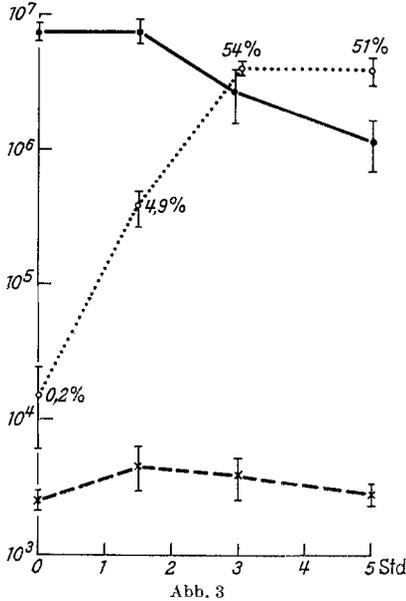


Abb. 3

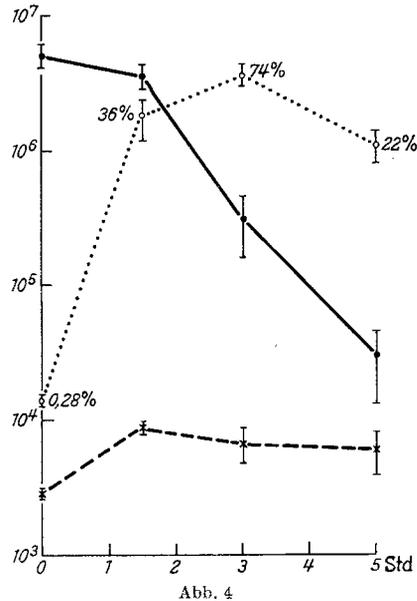


Abb. 4

Abb. 3. Viabilität von E 70-Zellen, Titer freier λ-Phagen und induzierte E 70-Zellen in thyminfreiem SS-Medium in Gegenwart von 200 µg/ml 8-Azaguanin

Abb. 4. Viabilität von E 70-Zellen, Titer freier λ-Phagen und induzierte E 70-Zellen in thyminfreiem SS-Medium in Gegenwart von 10 µg/ml Azauracil

Den weitaus stärksten Effekt auf die Thymin-Mangel-Induktion zeigen die Transcriptionshemmer Proflavin (3,6-Diaminoacridin) und Actinomycin D. 50 µg/ml Proflavin (Abb. 5) und 10 µg/ml Actinomycin D (Abb. 6) hemmen die Induktion jeweils vollständig.

Auf die Frage, ob es sich bei der Hemmung der Induktion um eine Verhinderung oder um eine Aufhebung (Reaktivierung) handelt, sollten UV-Versuche Auskunft geben, in denen Zellen bestrahlt wurden, die in Gegenwart von 0,5 µg/ml FU gezüchtet worden waren. Zellen, die 3 Std in FU-Gegenwart inkubiert worden waren, erwiesen sich als kaum induzierbar (Tabelle, Expt. 3). Dabei handelt es sich aber vermutlich um einen unspezifischen Effekt, der sich auch darin andeutet, daß diese Zellen sehr viel schwächer UV-inaktiviert werden als die Kontrollzellen. Offenbar liegt hier eine Herabsetzung der Aptitude vor, wie es schon von LWOFF, SIMINOVITCH und KJELDGAARD (1950) bei in Mangelmedium angezüchteten lysogenen Zellen gefunden worden war. Sicherlich können aber die Ergebnisse der Experimente 1 und 2 in der Tabelle miteinander verglichen werden, da in beiden Fällen etwa gleich viel Bakterien etwa gleich stark inaktiviert wurden. Deutlich

Tabelle. *UV-Induktion FU-behandelter Zellen*

E. coli K12 (λ) Hfr A'-Zellen wurden 3 Std in SS-Medium (Experiment 1) bzw. 3 Std in SS-Medium und anschließend 30 min in SS-Medium mit $0,5 \mu\text{g/ml}$ FU (Experiment 2) bzw. 3 Std in SS-Medium mit $0,5 \mu\text{g/ml}$ FU (Experiment 3) bei 37°C belüftet, dreimal gewaschen und in Saline 10 sec UV-bestrahlt.

	Unbestrahlt		Bestrahlt	
	Bakterien	% induzierte	überlebende Bakterien	% induzierte
Experiment 1	$5,2 \times 10^7 \pm 0,7$	$0,72 \pm 0,2$	$3,7 \times 10^6 \pm 1,1$	50 ± 18
Experiment 2	$5,8 \times 10^7 \pm 0,4$	$0,39 \pm 0,1$	$1,8 \times 10^6 \pm 0,1$	$22,4 \pm 3,2$
Experiment 3	$1,9 \times 10^5 \pm 0,3$	$1,2 \pm 0,2$	$3,9 \times 10^4 \pm 0,7$	$3,0 \pm 0,9$

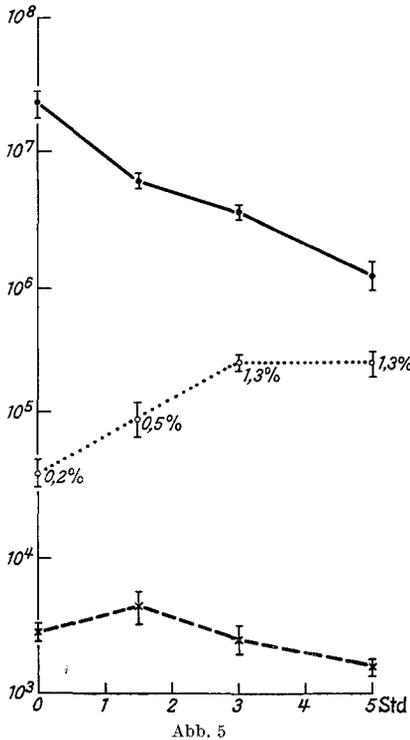


Abb. 5

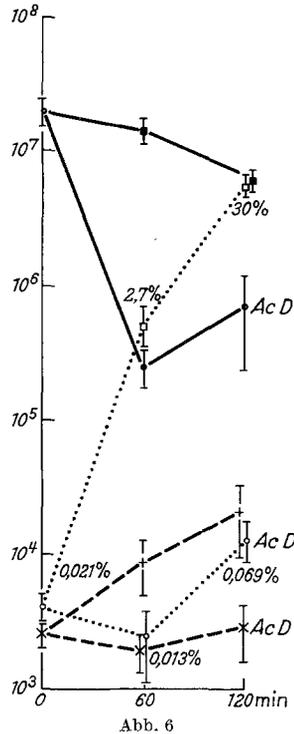


Abb. 6

Abb. 5. Viabilität von E 70-Zellen, Titer freier λ -Phagen und induzierte E 70-Zellen in thyminfreiem SS-Medium in Gegenwart von $50 \mu\text{g/ml}$ Proflavin

Abb. 6. Viabilität von E 70-Zellen, Titer freier λ -Phagen und induzierte E 70-Zellen in Thymin-freiem SS-Medium in Gegenwart von $10 \mu\text{g/ml}$ Actinomycin D. Die Kulturen waren vorher zweimal mit Tris-HCl, pH 8, gewaschen worden, wurden im Verhältnis 10:1 in Tris-HCl aufgenommen und mit EDTA (Endkonz. 2×10^{-4} M) versetzt. Nach 2 min wurde 1:10 in SS-Medium verdünnt

ergibt sich eine wesentlich geringere Induktion der Zellen, die vor der Bestrahlung 30 min mit $0,5 \mu\text{g/ml}$ FU behandelt worden waren.

Diskussion

Eine der eingangs gestellten Fragen kann an Hand der beschriebenen Ergebnisse eindeutig beantwortet werden: Da sämtliche geprüften RNS-Synthese-Hemmer die Induktion unabhängig von ihrem Angriffspunkt hemmen und unab-

hängig davon, ob sie in RNS-Komponenten inkorporiert werden oder nicht, scheint es sich um eine unspezifische Interferenz mit der RNS-Synthese zu handeln und nicht um irgendwelche Störungen beim Informationstransfer.

Über den eigentlichen Mechanismus der Hemmung der Induktion durch RNS-Synthese-Hemmer kann man dabei vorerst nur spekulieren. So könnte man annehmen, daß alle entsprechend aktiven Substanzen mit der Synthese jener Komponente interferieren, die sich unter Thymin-Mangel-Bedingungen anreichern soll (MAALØE, 1963) und die sowohl für den Thymin-Mangel-Tod als auch für die Thymin-Mangel-Induktion verantwortlich gemacht wird (vgl. GEISSLER, 1966a). So konnten ja von HANAWALT (1963) Hinweise dafür erbracht werden, daß zur Manifestierung des Thymin-Mangel-Todes die Synthese von (messenger-)RNS notwendig ist. In diesem Zusammenhang ist interessant, daß in Gegenwart von 50 µg/ml Proflavin kaum Thymin-Mangel-Tod stattfindet (Abb. 7).

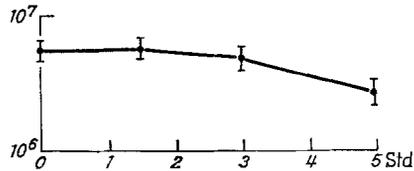


Abb. 7. Viabilität von *E. coli* CR 34 thy⁻-Zellen bei Incubation in thyminfreiem SS-Medium in Gegenwart von 50 µg/ml Proflavin

Allerdings würde diese Hypothese nicht erklären, warum auch die UV-Induktion zumindest durch FU gehemmt werden kann — ein Befund, der auch von BEN-GURION (1965) erhoben werden konnte. Nach unseren Ergebnissen scheint es sich dabei um eine Verhinderung der Induktion zu handeln, während von BEN-GURION angegeben wird, die UV-Induktion könne auch durch eine sich unmittelbar an die Bestrahlung anschließende Nachbehandlung mit FU gehemmt werden. Für diese Fälle könnte man gegebenenfalls eine Interferenz des FU mit der Produktion oder Wirkung des induzierenden UV-Produktes vermuten.

Summary

The presence of the inhibitors of RNA synthesis 5-fluorouracil, 5-fluorouridine, 6-azauracil, 8-azaguanine, proflavine, and actinomycin D interferes with thymineless prophage induction. This interference is believed to be a consequence of the inhibition of RNA synthesis, and not of the incorporation of the inhibitors leading to disturbances in information transfer. It is proposed that the substances tested interfere with the production of a toxic metabolite responsible for thymineless death and thymineless induction. Experiments performed with ultraviolet light indicate the interference with induction to be a prevention rather than a reversal of the induction process.

Erl. A. SCHÜTT danken wir für ihre fleißige und sorgfältige Mitarbeit bei einem Teil der Versuche.

Literatur

- BARNETT, W. E., and H. E. BROCKMANN: Induced phenotypic reversion by 8-azaguanine and 5-fluorouracil. *Biochim. biophys. Res. Commun.* **7**, 199—203 (1962).
 BEN-GURION, R.: Induction of colicines. *Zbl. Bakt., I. Abt. Orig.* **196**, 183—192 (1965).

- GEISSLER, E.: Untersuchungen über den Mechanismus der Induktion. I. Die Wirkung einiger Basen-Analoga auf lysogene Bakterien. *Acta biol. med. germ.* **10**, 417—421 (1963).
- Untersuchungen über den Mechanismus der Induktion. VIII. Der Einfluß von 5-Fluoruracil auf die Induktion durch Thymin-Mangel. *Acta biol. med. germ.* **12**, 719—722 (1964).
- Untersuchungen über den Mechanismus der Induktion. IX. Die Temperaturabhängigkeit der Induktion durch Thymin-Mangel und Mitomycin C. *Biochim. biophys. Acta* (Amst.) **114**, 116—126 (1966a).
- Investigations on the disturbance of lysogenic regulation. *Proc. Symp. Mutat. Process*, Praha (im Druck) (1966b).
- HANAWALT, P. C.: Involvement of synthesis of RNA in thymineless death. *Nature* (Lond.) **198**, 286 (1963).
- LEIVE, L.: Actinomycin sensibility in *Escherichia coli* produced by EDTA. *Biochem. biophys. Res. Commun.* **18**, 13—17 (1965).
- LWOFF, A., L. SIMINOVITCH et N. KJELDGAARD: Induction de la production de bacteriophages chez une bacterie lysogène. *Ann. Inst. Pasteur* **79**, 815—859 (1950).
- MAALØE, O.: Role of protein synthesis in the DNA replication cycle of bacteria. *J. cell. comp. Physiol.* **62**, Suppl. I, 31—44 (1963).

ERHARD GEISSLER

Institut für Mikrobengenetik der Universität Rostock
25 Rostock, Universitätsplatz 5