

## СООТНОШЕНИЕ ЛЕТАЛЬНЫХ И МУТАГЕННЫХ ПОВРЕЖДЕНИЙ В ДНК ПЛАЗМИД И БАКТЕРИОФАГОВ, ИНДУЦИРОВАННЫХ 8-МЕТОКСИПСОРАЛЕНОМ + УФ ( $\lambda \geq 320$ нм)

© 2021 г. В. Ю. Котова<sup>1,3,\*</sup>, С. К. Абишев<sup>2</sup>, Г. Б. Завильгельский<sup>1,3,\*\*</sup>

<sup>1</sup>Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов  
Национального исследовательского центра “Курчатовский институт”, Москва, 117545 Россия

<sup>2</sup>Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

<sup>3</sup>Научно-исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, 123098 Россия

\*e-mail: v-kotova@mail.ru

\*\*e-mail: zavilgel@mail.ru

Поступила в редакцию 03.12.2020 г.

После доработки 12.01.2021 г.

Принята к публикации 13.01.2021 г.

Проведено измерение  $K$ -соотношения количеств диаддуктов ( $D$ ) и моноаддуктов ( $M$ ), индуцированных 8-метоксипсораленом (8-МОП) в ДНК, упакованной в головке бактериофага  $\lambda$  и в ДНК плазмиды pBR322 при УФ-облучении ( $\lambda \geq 320$  нм). Определены вероятности  $P$  UVR-эксцизионной репарации моноаддуктов 8-МОП, а также  $S$  и  $S_m$  SOS-репарации диаддуктов и моноаддуктов 8-МОП. Измерение  $P$  проводилось с использованием ангулярного производного ангелицина. Показано, что  $P = 0.86$ . Для определения  $S$  и  $S_m$  использовали бактериофаг  $\lambda_{11}$ , обработанный 8-МОП + УФ ( $\lambda \geq 320$  нм) или 8-МОП + УФ ( $\lambda \geq 380$  нм), и высеянный или на предварительно облученные коротковолновым УФ ( $\lambda = 254$  нм) бактерии, или на бактерии с конститутивным синтезом генов SOS-регулона, а также на бактерии, содержащие плазмиду pKM101. У бактериофага  $\lambda_{11}$  определяли степень W-реактивации ( $\alpha$ ) и частоту W-мутагенеза cleag-мутаций ( $m$ ). Показано, что диаддукты (“сшивки”) 8-МОП репарируются бактериальной SOS-системой с вероятностью  $S = 0.28–0.29$ , а моноаддукты 8-МОП репарируются бактериальной SOS-системой с вероятностью  $S_m = 0.41$  лишь при участии фермента MucA<sub>2</sub>B, гены которого расположены в конъюгативной плазмиде pKM101.

**Ключевые слова:** 8-метоксипсорален, ДНК, диаддукт, моноаддукт, плазида, бактериофаг, UVR-репарация, SOS-репарация, W-реактивация, W-мутагенез.

**DOI:** 10.31857/S0016675821070092

При фотосенсибилизации бактерий и бактериофагов при помощи 8-метоксипсоралена (8-МОП) плюс УФ ( $\lambda \geq 320$  нм) в ДНК образуются два типа фотопродуктов: моноаддукты (молекула 8-МОП ковалентно связана с одним пиримидиновым основанием) и диаддукты, или межнитевые “сшивки” (молекула 8-МОП ковалентно связана с двумя пиримидиновыми основаниями из комплементарных нитей) [1–4].

Принципиальное значение при анализе действия 8-МОП на ДНК имеет величина  $K$ , характеризующая соотношение моноаддуктов и диаддуктов:

$$M = K \times D,$$

где  $M$  – число моноаддуктов,  $D$  – число диаддуктов.

Величина  $K$  зависит от ряда факторов. Во-первых,  $K$  зависит от длины волны УФ, используемого при освещении раствора с 8-МОП. Например при использовании УФ с длиной волны больше

380 нм в ДНК образуются практически исключительно моноаддукты 8-МОП, т.к. для вторичной реакции, сшивающей моноаддукт с комплементарной нитью, требуется значительно более короткая длина волны УФ (320–350 нм) [5]. Во-вторых,  $K$  зависит от состояния ДНК. Например, ДНК, упакованная внутри головки бактериофагов, характеризуется меньшей величиной  $K$  по сравнению со свободной ДНК [6].

Необходимо также учитывать возможности репарации моноаддуктов и диаддуктов в бактериальной клетке. Так как моноаддукты и диаддукты 8-МОП блокируют процесс репликации, проводимый ДНК-полимеразой III, то естественно считать, что при высеивании плазмид, обработанных 8-МОП, и фага на УФ-необлученных бактериях *E. coli*  $\Delta$ uvr $\Delta$ recA в связи с отсутствием систем эксцизионной репарации (UVR) и пострепликативной репарации (RecA) каждый моноаддукт и

диаддукт в ДНК носят летальный характер. В *E. coli uvr+recA+* моноаддукты 8-МОП репарируются ферментами эксцизионной репарации UVR с такой же эффективностью  $P$  ( $P$  – вероятность эксцизионной репарации моноаддуктов и циклобутановых пиримидиновых димеров), как и циклобутановые димеры пиримидинов [7]. Но моноаддукты 8-МОП в ДНК фагов и плазмид не способны репарироваться пострепликативной рекомбинационной системой (RecA). Это связано с необходимостью наличия в клетке второй копии неповрежденного в этом локусе гомологичного генома, так как фаги и плазмиды инфицируют клетку, как правило, в одном экземпляре (в опыте используется низкая, много меньше единицы, множественность инфекции).

Диаддукты (“сшивки”) в ДНК фагов и плазмид при их высеве на УФ-необлученных штаммах *E. coli ΔuvrΔrecA* и *E. coli Δuvr* летальны на 100%, т.к. блокируют репликацию и не репарируются. Для репарации “сшивки” требуются выщепление “плеча” сшивки из одной из комплементарных нитей, проводимое ферментами эксцизионной репарации UVR, и последующее заполнение образуемой “бреши”. Диаддукты 8-МОП в ДНК фагов и плазмид при их высеве на необлученных бактериях *uvr+recA+*, т.е. при отсутствии в клетке активной системы SOS-репарации, также 100%-но летальны, т.к. несмотря на выщепление “плеча” сшивки ферментами UVR, заполнить “брешь” система пострепликативной RecA-рекомбинационной репарации не способна из-за отсутствия в клетке второй копии генома фага или плазмиды. В работе [8] это было экспериментально подтверждено: в ДНК фага  $\lambda$ , высеянного на необлученных бактериях *E. coli uvr+recA+*, формирование одного диаддукта в ДНК соответствует примерно одному летальному удару, в то время как моноаддукты 8-МОП с высокой эффективностью репарируются ферментами UVR.

При УФ-облучении в бактериях индуцируется SOS-система репарации ДНК, регуляция которой определяется двумя белками – репрессором LexA и белком RecA [9, 10]. В бактериях *E. coli* в составе SOS-регулона расположены гены *umuC* и *umuD* [11], кодирующие субъединицы полимеразы PolV (UmuD<sub>2</sub>C), которая преодолевает блок репликации, вызванный летальным дефектом в ДНК, вставляя напротив поврежденного нуклеотида, как правило, некомплементарный нуклеотид [12–14]. В результате процесса, который получил наименование “translesion synthesis”, одновременно увеличивается выживаемость бактерий и индуцируются мутации [15]. Показано, что в этом процессе помимо полимеразы PolV важную роль играет активированный белок RecA\* (звездочка обозначает активированное состояние белка) [16, 17]. Активация RecA происходит в результате образования связи RecA с односторонней ДНК, которая

образуется в значительном количестве в УФ-облученных бактериях в процессе репликации и ее блокирования летальными повреждениями. Белки системы SOS-репарации способны репарировать и вызывать мутации не только в хромосоме бактерии, но также в плаزمиде и ДНК бактериофагов, особенно эффективно у умеренных бактериофагов (например фаг  $\lambda$ ), в меньшей степени – у условно летальных бактериофагов, например, фаги T1, T3, T7 [18], и не способна репарировать активно летальные фаги типа T2, T4, которые убивают клетку и ингибируют основные внутриклеточные процессы уже практически в момент адсорбции [19]. Феномен возрастания выживаемости и частоты мутаций у фагов и плазмид, высеянных на бактериях с предварительно индуцируемой SOS-системой, в честь первооткрывателя эффекта J. Weigle (1953 г.) носит название W-реактивации и W-мутационеза [9].

В настоящей работе проведено измерение  $K$ -соотношения количеств диаддуктов ( $D$ ) и моноаддуктов ( $M$ ) в ДНК, упакованной в головке бактериофага  $\lambda$ , и в ДНК плазмиды. Определены вероятности  $P$  эксцизионной репарации моноаддуктов и  $S$  и  $S_m$  (по [20]) SOS-репарации диаддуктов и моноаддуктов 8-МОП. Измерение  $P$  проводилось с использованием ангулярного производного ангелицина, который в силу структурных особенностей, способен образовывать лишь моноаддукты и не способен формировать диаддукты [20]. Для определения  $S$  и  $S_m$  использовали бактериофаг  $\lambda_{11}$ , обработанный 8-МОП + УФ ( $\lambda \geq 320$  нм) или 8-МОП + УФ ( $\lambda \geq 380$  нм), и высеянный или на предварительно облученные коротковолновым УФ ( $\lambda = 254$  нм) бактерии, или на бактерии с конститутивным синтезом генов SOS-регулона, а также на бактерии, содержащие плазмиду pKM101.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Бактериальные штаммы, бактериофаги и плазмиды

Бактериальные штаммы *Escherichia coli* K12: AB1157 F<sup>-</sup> *thr-1 leu-6 proA2 his-4 thi-1 argE3 lacY1 galK2 ara14 xyl-5 mtl-1 tsx-33 rpsL31 supE44*; AB1886 *uvrA6*, AB2480 *uvrA6 recA13*, остальные маркеры – как у AB1157 (штаммы получены от проф. Р. Howland-Flanders, США), *Escherichia coli* DM1187 *recA441 lexA51 sfiA11 arg+*, остальные маркеры – как у AB1157 (штамм получен от проф. В.А. Ланцова, СПб государственный университет). Штаммы ТК603 *arg+ilvuvrA6*, остальные маркеры – как у AB1157; GW514 = ТК603 (pKM101 *mucAB+*) – получены от проф. G.C. Walker, США.

Бактериофаг  $\lambda_{11}$  ( $\lambda v2v3$ ) получен от R. Devoret (Франция). Плазмиды pBR322.

### Среды и условия роста бактерий

LB-среда: 1%-ный триптон, 0.5%-ный дрожжевой экстракт, 0.5%-ный NaCl; для верхнего и нижнего слоев чашек Петри использовали 0.7 и 1.8%-ный LB-агар. Бактерии растили в LB или LB плюс 100 мкг/мл ампициллина при постоянном перемешивании до средней экспоненциальной фазы при 30°C. Трансформацию бактериальных клеток, обработанных ионами  $\text{Ca}^{2+}$ , проводили согласно [21].

### Буферы и реактивы

Трис-буфер: 0.05 М трис-HCl, 0.01 М NaCl, pH 7.5; ТМ-буфер: 0.05 М трис-HCl, 0.01 М NaCl, 0.001 М  $\text{MgSO}_4$ , pH 7.8. 8-Метоксипсорален (8-МОП) – фирмы “Sigma”. Ангелицин получен от проф. G. Rodighiero (Италия).

### Облучение бактерий, бактериофага и плазмид

Раствор ДНК в трис-буфере и суспензию фага в ТМ-буфере, содержащих 40 мкг/мл 8-МОП или 200 мкг/мл ангелицина, облучали при 4°C в пирексовых кюветах. Источником света  $\lambda \geq 320$  нм служила ртутная лампа высокого давления СВД-120А с фильтром УФС-6. Лампу СВД-120А с фильтром ЖС-4 использовали в качестве источника света с  $\lambda \geq 380$  нм. Расстояние лампы до образца – 20 см. Суспензию бактерий в ТМ-буфере облучали коротковолновым УФ (254 нм), источником которого служила ртутная лампа низкого давления БУВ-15. Дозу УФ-света измеряли дозиметром УФД-4 с магниевым фотоэлементом.

### W-реактивация и W-мутация

Бактерии в экспоненциальной фазе дважды отмывали ТМ-буфером, концентрировали в пять раз в том же буфере и облучали при 20°C лампой БУВ-15 (254 нм) различными дозами. Адсорбцию фага  $\lambda$  на необлученных и УФ-облученных клетках проводили в течение 15 мин в ТМ-буфере при 37°C. Посев комплекса фаг-бактерия проводили двухслойным методом с добавлением индикаторной культуры АВ2480. Для учета cleag-мутантов использовали фаг  $\lambda_{11}$ , который способен формировать две одноступенчатые мутации – cleag и vir. Спонтанный фон cleag-мутаций для различных препаратов фага равнялся:  $8 \times 10^{-4}$ – $1 \times 10^{-3}$ . У фага, обработанного 8-МОП + УФ ( $\lambda \geq 320$  нм), определяли частоту cleag-мутаций среди выживших. Степень W-мутации определяли как отношение частоты мутаций при высеве фага на УФ (254 нм)-облученных клетках к частоте мутаций при высеве фага на необлученных клетках. Множественность инфекции не превышала 0.01.

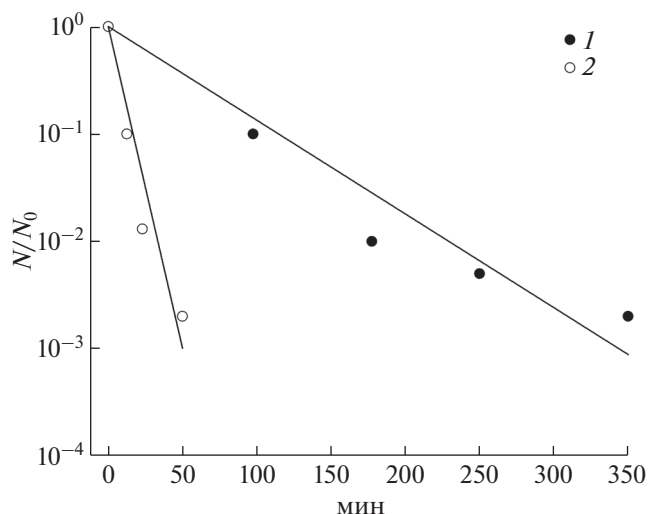


Рис. 1. Кинетические кривые инактивации плазмиды pBR322, обработанной ангелицином + УФ ( $\lambda \geq 320$  нм) при трансформации штаммов *E. coli* K12. 1 – АВ1157 *uvr+recA+*, 2 – АВ2480 *uvrA6 recA13*. По оси абсцисс отложено время облучения плазмидной ДНК (мин), по оси ординат – степень выживаемости плазмиды  $N/N_0$ .

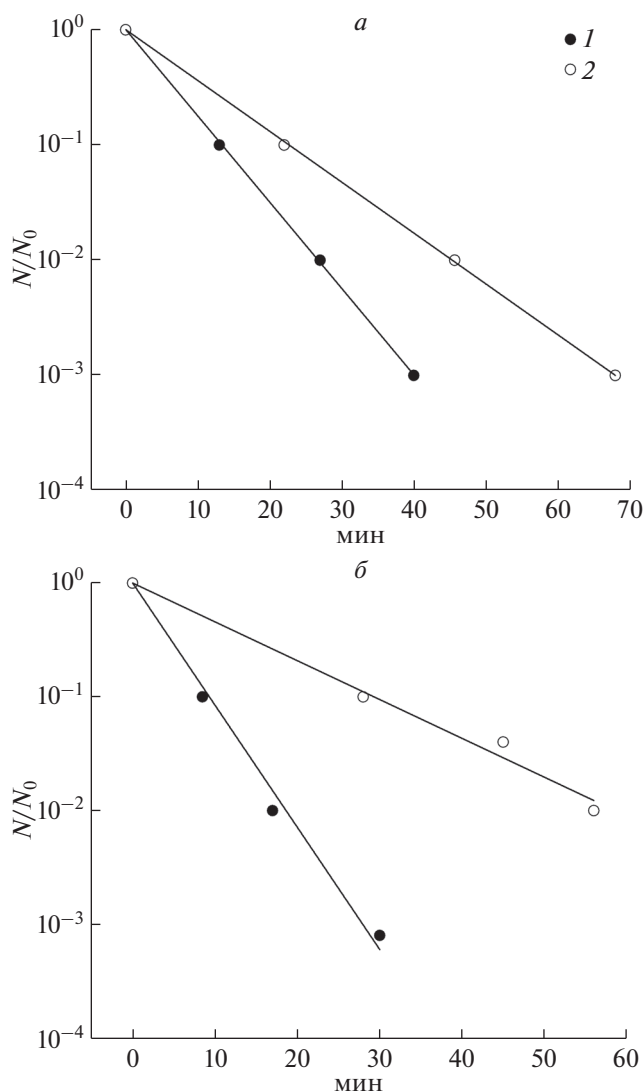
Для измерения W-реактивации у плазмиды pBR322 клетки обрабатывали ионами  $\text{Ca}^{2+}$ , а затем облучали разными дозами УФ (254 нм). Степень W-реактивации ( $\alpha$ ) для фага и плазмиды определяли по формуле:  $\alpha = N_{nn}N_{oo}/N_{on}N_{no}$ , где  $N_{nn}$  – титр необлученных фага и плазмиды на необлученных бактериях,  $N_{oo}$  – титр облученных фага и плазмиды на облученных бактериях,  $N_{on}$  – титр облученных фага и плазмиды на необлученных бактериях,  $N_{no}$  – титр необлученных фага и плазмиды на облученных бактериях.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### Высев фагов и плазмид на необлученных бактериях

В настоящей работе измерение  $P$  (вероятность эксцизионной репарации UVR) проводилось с использованием ангулярного производного ангелицина, который в силу структурных особенностей, способен образовывать лишь моноаддукты и не способен формировать диаддукты. Были получены кинетические кривые инактивации плазмиды pBR322, обработанной с помощью ангелицина + УФ ( $\lambda \geq 320$  нм) при трансформации необлученных штаммов *E. coli* АВ1157 *uvr+recA+* и АВ2480  $\Delta uvr \Delta recA$  (рис. 1), которые описываются следующими формулами:

$N/N_0 = e^{-M}$  – для штамма АВ2480, т.к. каждый моноаддукт летален,



**Рис. 2.** Кинетические кривые инактивации обработанных 8-МОП + УФ ( $\lambda \geq 320$  нм) бактериофага  $\lambda$  (а) и плазмиды pBR322 (б) при инфекции или трансформации штаммов *E. coli* K12: 1 – AB1157 *uvr+recA+*; 2 – AB2480 *uvrA6 recA13*. По оси ординат отложена выживаемость  $N/N_0$ , по оси абсцисс время облучения препарата (мин).

$N/N_0 = e^{-(1-P)M}$  – для штамма AB1157, т.к. летален только каждый нерепарированный моноаддукт.

Из полученного соотношения наклонов кинетических кривых инактивации,  $\sigma^{AB1157}/\sigma^{AB2480} = 0.14$ , получаем:  $M \times (1 - P)/M = (1 - P) = 0.14$ , и вероятность эксцизионной репарации моноаддуктов  $P = 0.86$ .

Для измерения величины  $K$  ( $M = KD$ ) были определены кинетические кривые 8-МОП + UV ( $\lambda \geq 320$  нм) инактивации плазмиды pBR322 и бактериофага  $\lambda$  при высеве на необлученных бактериях AB2480 и AB1157 (рис. 2):

$N/N_0 = e^{-D(1+K)}$  – для штамма AB2480, т.к. каждые моноаддукт и диаддукт летальны;

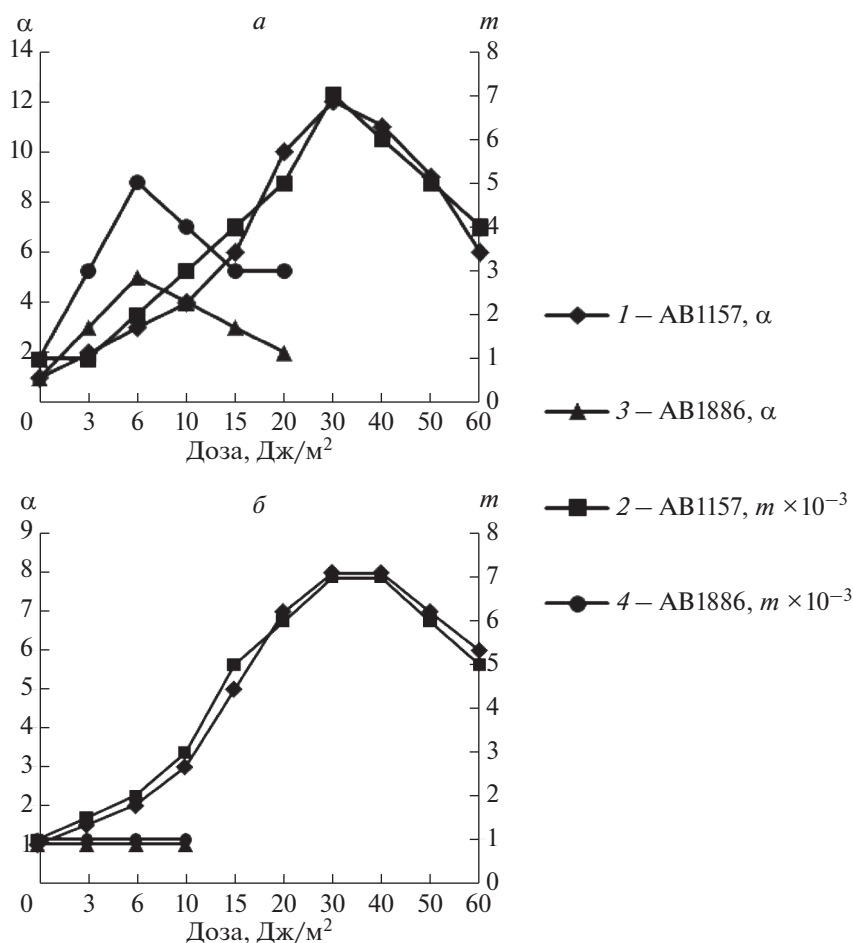
$N/N_0 = e^{-D[1 + K(1 - P)]}$  – для штамма AB1157, т.к. каждый диаддукт летален, а моноаддукт летален с вероятностью  $(1 - P)$ . Из полученного соотношения наклонов, равных  $\sigma^{AB2480}/\sigma^{AB1157} = 1.7$  для бактериофага, и  $= 3.3$  для плазмиды и с учетом полученного ранее значения  $P = 0.86$ , определяем величины  $K$ :

$\sigma^{AB2480}/\sigma^{AB1157} = (1 + K)/[1 + (1 - P)K]$ .  $K = 0.92$  – для бактериофага  $\lambda$ , т.е. на один диаддукт образуется в среднем один моноаддукт, и  $K = 4.3$  для плазмидной ДНК, т.е. на один диаддукт образуется в среднем примерно 4.5 моноаддуктов.

*Высев фагов и плазмид на УФ-облученные бактерии AB1157 и AB1886 и на необлученные бактерии штамма DM1187*

Вначале нами были определены оптимальные дозы УФ (254 нм)-облучения для бактерий AB1157 и AB1886 *uvrA6*, при которых в клетках максимальной индуцируется система SOS-репарации. На рис. 3 и 4 представлены данные по возрастанию выживаемости фага  $\lambda_{11}$  (далее обозначен  $\lambda$ ) (рис. 3) и плазмиды pBR322 (рис. 4), облученных или коротковолновым УФ (254 нм), индуцирующим в качестве основных, блокирующих репликацию, летальных дефектов ДНК циклобутановые пиримидиновые димеры, или УФ-светом с  $\lambda \geq 320$  нм в присутствии 8-МОП. У бактериофага  $\lambda_{11}$  определяли одновременно частоту “clear” мутаций. Доза УФ для облучения препаратов фага и плазмиды выбиралась таким образом, чтобы уровень инактивации объектов при высеве на необлученных бактериях равнялся примерно  $10^{-3}$ . Бактерии AB1157 и AB1886 *uvrA6* облучали разными дозами коротковолнового УФ (254 нм). Степень W-реактивации  $\alpha$  для фагов и плазмид определяется по формуле:  $\alpha = N_{nn}N_{oo}/N_{on}N_{no}$  (см. Материалы и методы).

Как видно из рис. 3 и 4, выживаемость фага и плазмид увеличивается, одновременно у фага  $\lambda_{11}$  растет частота “clear” мутаций в связи с активностью системы SOS-репарации в предварительно УФ (254 нм)-облученных разными дозами бактериях. В случае УФ (254 нм)-облученного фага (рис. 3,а) и плазмиды (рис. 4), содержащих в ДНК циклобутановые димеры пиримидинов, максимальные значения  $\alpha$  и частоты мутаций  $m$  достигаются при УФ-дозе на бактерии около 30 Дж/м<sup>2</sup> для штамма AB1157, и около 6 Дж/м<sup>2</sup> для штамма AB1886 *uvrA6*. Аналогичный результат был получен и для 8-МОП + УФ ( $\lambda \geq 320$  нм) – инактивированных фага  $\lambda_{11}$  и плазмиды, однако только при использовании в качестве хозяина бактерий AB1157, т.к. при использовании бактерий AB1886 *uvrA6* SOS-репарация и индукция “clear” мутаций



**Рис. 3.** W-реактивация и W-мутagenез бактериофага  $\lambda_{11}$ , облученного УФ (254 нм) (а) и обработанного 8-МОП + УФ ( $\lambda \geq 320$  нм) (б) при инфекции штаммов *E. coli* K12 AB1157 *uvr+recA+* (1, 2) и AB1886 *uvrA6* (3, 4). Бактерии облучались разными дозами УФ (254 нм). 1 и 3 – кривые W-реактивации, 2 и 4 – кривые W-мутagenеза. По оси абсцисс отложены дозы УФ (254 нм) на бактерии, в Дж/м<sup>2</sup>. По осям ординат отложены  $\alpha$ -степень W-реактивации и  $m$  – частота cleag-мутаций среди выживших. Доза УФ (254 нм) на фаг при высева на AB1157 равнялась 140 Дж/м<sup>2</sup>, выживаемость фага на необлученных бактериях AB1157 равнялась  $1.2 \times 10^{-3}$ . Доза УФ (254 нм) на фаг при высева на AB1886 равнялась 20 Дж/м<sup>2</sup>, выживаемость фага на необлученных бактериях AB1886 равнялась  $1.1 \times 10^{-3}$ . Время облучения фага с 8-МОП + УФ ( $\lambda \geq 320$  нм) при высева на AB1157 равно 55 мин, выживаемость фага на необлученной культуре равно  $1.7 \times 10^{-3}$ , а на AB1886 – 45 мин, выживаемость фага на необлученных бактериях AB1886 равна  $1.4 \times 10^{-3}$ . Частота cleag-мутаций фага на необлученных бактериях AB1886 и AB1157 равна  $1.0 \times 10^{-3}$ .

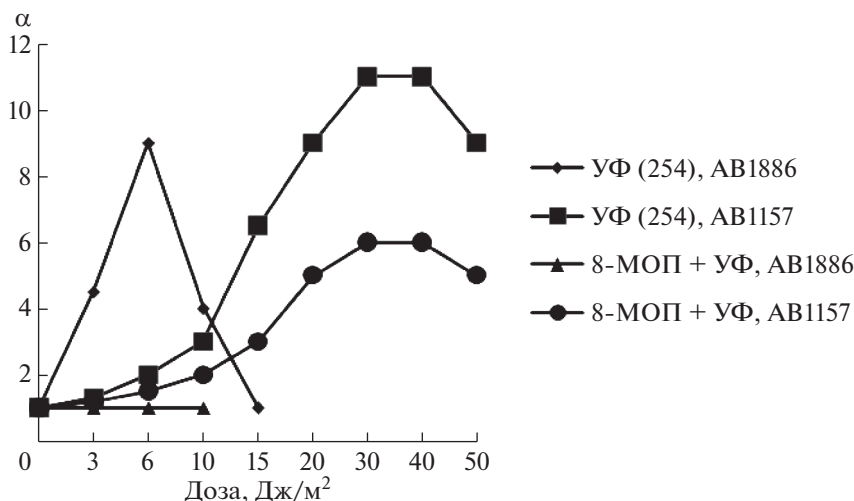
у фага  $\lambda_{11}$  и SOS-репарация у плазмиды не наблюдались (рис. 3, б и рис. 4).

При высева 8-МОП + УФ ( $\lambda \geq 320$  нм)-обработанных разными дозами фагов и плазмид на предварительно УФ (254 нм)-облученных бактериях необходимо учитывать SOS-репарацию моноаддуктов и диаддуктов в ДНК. В этой серии опытов мы использовали лишь штамм AB1157 и не использовали мутантный штамм AB1886 *uvrA6*, так как диаддукты 8-МОП не репарируются в связи с отсутствием UVR-ферментов, выщепляющих “плечо” сшивки, а моноаддукты 8-МОП (но не моноаддукты ангелицина) не репарируются SOS-системой бактерии, т.к. фермент PolV не способен

преодолевать блок репликации, вызываемый интеркалированной в ДНК молекулой 8-МОП [22].

На рис. 5, а представлены кинетические кривые 8-МОП + УФ ( $\lambda \geq 320$  нм)-инактивации фага  $\lambda$  при высева на необлученных и УФ (254 нм)-облученных оптимальной дозой (30 Дж/м<sup>2</sup>) бактериях AB1157. Зависимости  $N/N_0$  от количества диаддуктов  $D$ , образующихся в ДНК, выглядят следующим образом:

$$N/N_0 = e^{-D[1 + K(1-P)]}$$
 – бактерии необлучены (каждый диаддукт летален, и летальны не репарированные UVR-ферментами моноаддукты (см. формулы выше)).



**Рис. 4.** W-реактивация плазмиды pBR322, облученной УФ (254 нм) и обработанной 8-МОП + УФ ( $\lambda \geq 320$  нм) при инфекции штаммов *E. coli* K12 AB1157 *uvr+recA+* и AB1886 *uvrA6*. Дозы УФ (254 нм) облучения плазмиды равны 50 Дж/м<sup>2</sup> (AB1886) и 210 Дж/м<sup>2</sup> (AB1157), выживаемости на необлученных клетках равны соответственно  $1.5 \times 10^{-3}$  и  $1.3 \times 10^{-3}$ . Периоды времени облучения плазмиды УФ ( $\lambda \geq 320$  нм) + МОП равны: 50 мин (AB1886 *uvrA6*) и 90 мин (AB1157), показатели выживаемости плазмиды на необлученных бактериях равны:  $1.2 \times 10^{-3}$  (AB1886) и  $1.4 \times 10^{-3}$  (AB1157). Бактерии облучали разными дозами УФ (254 нм). По оси абсцисс отложены дозы УФ (254 нм) на бактерии в Дж/м<sup>2</sup>, по оси ординат —  $\alpha$ -степень W-реактивации.

$N/N_0 = e^{-D[(1-S) + K(1-P)]}$  — бактерии УФ (254 нм) облучены оптимальной дозой 30 Дж/м<sup>2</sup>. В этом варианте учтено, что диаддукты репарируются ферментами SOS-системы с вероятностью *S*, а моноаддукты репарируются ферментами эксцизионной репарации UVR с вероятностью *P*, но не репарируются ферментом PolV бактериальной системы SOS (согласно [22]).

Отношение наклонов кривых инактивации  $\sigma^-/\sigma^+$  на необлученных и облученных бактериях равно 1.42 (рис. 5,а). Тогда:

$$D[(1-S) + K(1-P)]/D[1 + K(1-P)] = [(1-S) + K(1-P)]/[1 + K(1-P)] = 1/1.42, \text{ или:}$$

$$S = [1 + K(1-P)] \times (1 - 1/1.42) = (1 + 0.9 \times 0.14) \times (1 - 1/1.42) = 1.026 \times 0.42/1.42 = 0.29.$$

Следовательно, вероятность репарации диаддукта 8-МОП ферментами SOS-системы и одновременного формирования мутации в ДНК бактериофага  $\lambda$  равняется 0.29, и, соответственно, вероятность летального действия диаддукта 8-МОП на бактериофаг  $\lambda$  равна  $1 - 0.29 = 0.71$ .

В следующей серии опытов для высева фага  $\lambda$  был использован мутантный штамм *E. coli* DM1187 *recA441 sfiA11 lexA51arg<sup>+</sup>*, остальные маркеры как у AB1157. В этом штамме осуществляется конститутивный синтез всех белков SOS-системы — мутация *lexA51* [23], а белок RecA (RecA441) активируется при повышенной температуре (42°C) при наличии в среде аденина (100 мкг/мл) [24]. Мутация *sfiA11* обеспечивает жизнеспособность штамма

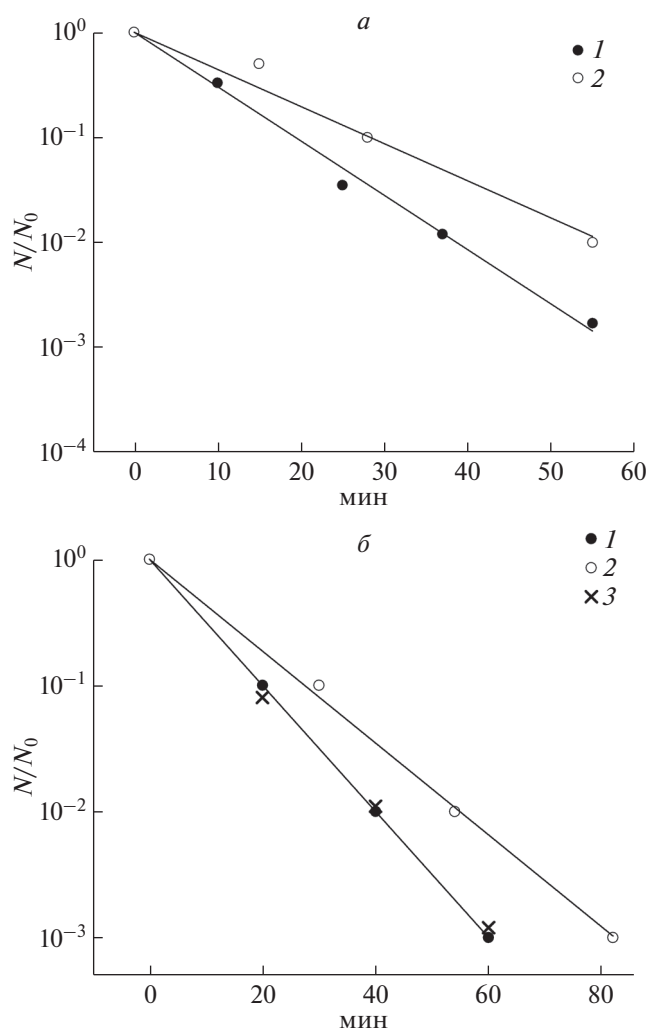
при условии конститутивного синтеза SOS-регулона. Вначале была проведена проверка уровня индукции SOS-системы. Для этой цели клетки штаммов DM1187 и AB1157 (контрольный штамм с закрытой SOS-системой) были трансформированы плазмидой pColD и определены сравнительные интенсивности люминесценции клеток. Штамм DM1187 характеризуется интенсивностью люминесценции, примерно в 100 раз превышающей таковую штамма AB1157, что указывает на открытость системы SOS в штамме DM1187.

На рис. 5,б приведены кинетические кривые 8-МОП + УФ ( $\lambda \geq 320$  нм)-инактивации фага  $\lambda$  при высева на штаммах AB1157 и DM1187 без предварительного УФ (254 нм)-облучения. Чашки Петри с DM1187, содержащие в верхнем слое аденин (100 мкг/мл), инкубировали при 42°C. Зависимости  $N/N_0$  от количества диаддуктов *D*, образующихся в ДНК, выглядят следующим образом:

$$N/N_0 = e^{-D[1 + K(1-P)]}$$
 — бактерии AB1157 (каждый диаддукт летален, и летальны нерепарированные UVR-ферментами моноаддукты),

$$N/N_0 = e^{-D[(1-S) + K(1-P)]}$$
 — бактерии DM1187 (летальны нерепарированные UVR-ферментами моноаддукты и нерепарированные SOS-системой диаддукты).

Отношение наклонов кинетических кривых  $\sigma^{AB1157}/\sigma^{DM1187} = 1.38$ . Тогда:  $S = 1.026 \times 0.38/1.38 = 0.28$ . Следовательно,  $S = 0.28$ , что практически совпадает с результатом для предварительно УФ (254 нм)-облученных бактерий AB1157 (рис. 5,а).



**Рис. 5.** Кинетические кривые инактивации обработанного 8-МОП + УФ ( $\lambda \geq 320$  нм) бактериофага  $\lambda$  при высеве (а) на необлученных и УФ (254 нм)-облученных оптимальной дозой (30 Дж/м<sup>2</sup>) бактериях АВ1157 *uvr+recA+* и (б) на необлученных бактериях АВ1157 *uvr+recA+* (1) и необлученных бактериях DM1187 *recA441 lexA51 sfiA11 arg+*. Посев инфицированных фагом бактерий DM1187 на чашки Петри при 30°C (без аденина) (3) и при 42°C (+аденин) (2). По оси ординат отложена выживаемость  $N/N_0$ , по оси абсцисс – время облучения препарата фага (мин).

Сравнение наклонов кинетических кривых 8-МОП + УФ ( $\lambda \geq 320$  нм)-инактивации фага  $\lambda$ , полученных при высевах инфицированных фагом бактерий DM1187 на чашки Петри при 30°C (без аденина) и при 42°C (+аденин) позволяет оценить вклад активированного RecA\* в процесс SOS-репарации диаддуктов 8-МОП. Как видно из рис. 5, б, отношение этих наклонов, равное  $\sigma^{30}/\sigma^{42}$ , практически равно отношению наклонов  $\sigma^{AB1157}/\sigma^{42} = 1.38$ . Следовательно можно считать, что активированный белок RecA\* абсолютно необходим для SOS-репарации диаддуктов 8-МОП.

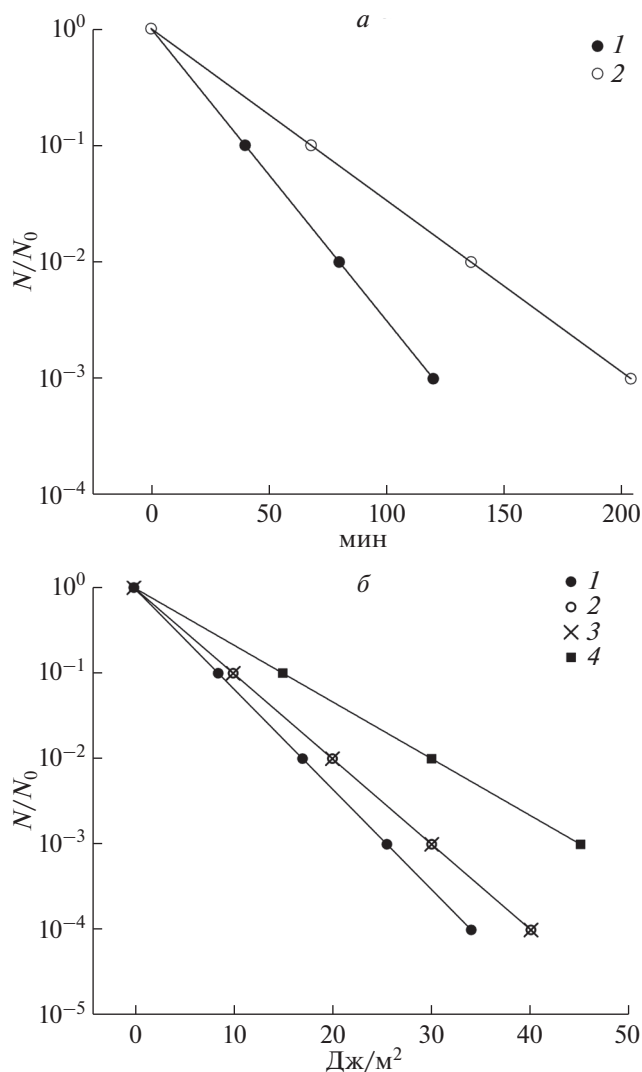
*W-реактивация моноаддуктов 8-МОП  
с помощью полимеразы MucA<sub>2</sub>B*

В следующей серии опытов для высева фага  $\lambda$  были использованы штаммы *E. coli* ТК603 *uvrA6* и

GW514 *uvrA6*, содержащий плазмиду pKM101 *mucAB*<sup>+</sup> [25, 26].

Препарат бактериофага был облучен УФ (254 нм) или обработан 8-МОП + УФ ( $\lambda \geq 380$  нм), и содержал в ДНК, соответственно, циклобутановые пиримидиновые димеры или в основном моноаддукты 8-МОП [5]. На рис. 6 представлены кинетические кривые 8-МОП + УФ ( $\lambda \geq 380$  нм)-инактивации (а) и УФ (254 нм)-инактивации (б) фага  $\lambda$  при высеве на необлученных и предварительно УФ (254 нм)-облученных оптимальной дозой (6 Дж/м<sup>2</sup>) бактериях GW514. Зависимости  $N/N_0$  от количества моноаддуктов  $M$ , образующихся в ДНК фага (рис. 6, а), выглядят следующим образом:

$N/N_0 = e^{-M}$  – бактерии необлучены (каждый моноаддукт летален),



**Рис. 6.** Кинетические кривые инактивации обработанного 8-МОП + УФ ( $\lambda \geq 380$  нм) (а) и облученного УФ (254 нм) (б) бактериофага  $\lambda$  при высеве на необлученных и УФ (254 нм)-облученных оптимальной дозой (6 Дж/м<sup>2</sup>) бактериях GW514 и ТК603 *uvrA6*. а: 1 – высев на необлученных бактериях GW514, 2 – высев на УФ (254 нм)-облученных дозой 6 Дж/м<sup>2</sup> бактериях GW514. б: 1 – высев на необлученных бактериях ТК603 *uvrA6*, 2 – высев на УФ (254 нм)-облученных дозой 6 Дж/м<sup>2</sup> бактериях ТК603 *uvrA6*, 3 – высев на необлученных бактериях GW514, 4 – высев на облученных дозой 6 Дж/м<sup>2</sup> бактериях GW514. По оси ординат отложена выживаемость  $N/N_0$ , по оси абсцисс – время облучения препарата фага (мин) (а) и доза УФ (254 нм), Дж/м<sup>2</sup> (б).

$N/N_0 = e^{-M(1-S_m)}$  – бактерии УФ (254 нм)-облучены оптимальной дозой 6 Дж/м<sup>2</sup>. В этом варианте учтено, что моноаддукты репарируются ферментом  $MucA^2B$  с вероятностью  $S_m$ , но не репарируются ферментом PolV ( $UmuD^2C$ ) бактериальной системы SOS (при высеве 8-МОП + УФ ( $\lambda \geq 380$  нм)-облученного фага на штамме *E. coli* ТК603 *uvrA6* эффекты W-реактивации и W-мутагенеза отсутствуют). Кроме того, при наличии в ДНК бактериофага моноаддуктов 8-МОП при высеве на необлученных бактериях GW514 отсутствует феномен так называемой “Р-реактивации”, т.е. выживаемости фага на GW514 и ТК603 равны. От-

ношение наклонов кривых инактивации  $\sigma^-/\sigma^+$  на необлученных и УФ (254 нм)-облученных бактериях GW514 равно 1.7 (рис. 6,а). Тогда:  $(1 - S_m) = 1/1.7$ , и, следовательно, вероятность SOS-репарации моноаддукта 8-МОП с участием полимеразы  $MucA^2B$   $S_m = 1 - 1/1.7 = 0.41$ , и, соответственно, вероятность летального действия моноаддукта равна  $1 - 0.41 = 0.59$ .

Несколько иначе выглядят кинетические кривые УФ (254 нм)-инактивации фага, ДНК которого содержит летальные циклобутановые пиримидиновые димеры (рис. 6,б). В этом случае имеет место феномен “Р-реактивации”: выживаемость УФ (254 нм)-облученного фага на необлученных УФ



(254) бактериях GW514, содержащих плазмиду рКМ101 *musAB*<sup>+</sup>, превышает выживаемость этого фага на необлученных бактериях ТК603 *uvrA6*. Следовательно полимеразы MusA<sub>2</sub>B способна преодолевать блок репликации, вызываемый циклобутановыми пиримидиновыми димерами (а также моноаддуктами ангелицина – данные не представлены), даже при условии отсутствия в клетке SOS-индукции, но не способна преодолевать блок репликации, вызываемый моноаддуктами 8-МОП без дополнительного участия ферментов бактериальной SOS-системы. Предварительное УФ (254 нм)-облучение бактерий GW514 лишь значительно усиливает W-реактивацию УФ (254 нм)-облученного фага, в частности, в связи с нарастанием экспрессии генов *musA* и *musB* [27]. Поэтому на рис. 6,б изображены четыре кинетические кривые инактивации УФ (254 нм)-облученного фага: на штамме GW514-необлученном и предварительно облученном дозой УФ (254 нм) 6 Дж/м<sup>2</sup>, а также на ТК603 *uvrA6*-необлученном и предварительно облученном оптимальной дозой УФ (254 нм) 6 Дж/м<sup>2</sup>.

## ОБСУЖДЕНИЕ

На основании данных, представленных в настоящей работе, при определении относительных вкладов моноаддуктов и диаддуктов 8-МОП в качестве летальных и мутагенных дефектов в ДНК бактериофагов и плазмид, необходимо учитывать, во-первых, неспособность бактериальной SOS-системы, в состав которой входит полимеразы PolV, преодолевать блок репликации, вызываемый моноаддуктами 8-МОП, и, во-вторых, неспособность плазмидной полимеразы MusA<sub>2</sub>B преодолевать блок репликации, вызываемый моноаддуктами 8-МОП (отсутствие “Р-реактивации”), без дополнительной помощи клеточной SOS-системы.

Необходимо отметить, что в работе [28], в которой впервые было показано, что именно диаддукты (“сшивки”) 8-МОП определяют формирование мутаций у бактериофага λ в процессе SOS-репарации, была допущена неточность относительно предполагаемой роли моноаддуктов 8-МОП в SOS-мутагенезе. В работе [28] было показано, что ангелицин, формирующий исключительно моноаддукты, с высокой эффективностью индуцирует SOS-мутагенез при высеве фага на предварительно УФ-облученных бактериях. На этом основании было высказано предположение, что и моноаддукты 8-МОП также должны индуцировать в бактериофагах SOS-мутагенез. Однако, как нами показано в настоящей работе, моноаддукты 8-МОП индуцируют SOS-мутагенез лишь при использовании плазмидной (рКМ101) полимера-

зы MusA<sub>2</sub>B, но не бактериальной полимеразы PolV (UmuD<sub>2</sub>C).

Представленные в настоящей работе данные о различной способности полимераз MusA<sub>2</sub>B и UmuD<sub>2</sub>C преодолевать блоки репликации, создаваемые “слабым интеркалятором” ангелицином или “сильным интеркалятором” моноаддуктом 8-МОП, представляют интересный, но не единственный пример влияния степени перекрытия ароматического кольца плоских интеркаляторов с азотистыми основаниями в ДНК на SOS-процесс формирования мутаций в бактериях. В частности показано, что карциноген N-2-ацетиламинофлуорен, плоская молекула которого встраивается внутрь двойной спирали ДНК, при SOS-репарации индуцирует в хромосоме бактерии формирование фрейм-шифт мутаций в последовательности 5'-GGCGCC, частота которых не зависит от полимеразы UmuD<sub>2</sub>C, но значительно возрастает при наличии полимеразы MusA<sub>2</sub>B [29].

Остается нерешенным вопрос об относительном вкладе моноаддуктов и диаддуктов в летальное и мутагенное действия 8-МОП + УФ (λ ≥ 320 нм) на бактериальные клетки. Задача в данном случае усложнена в связи с наличием в бактериальной клетке второго генома и эффективным процессом пострепликативной рекомбинационной репарации, зависящей от значительной группы генов (*RecA*, *RecBC*, *RecE* и др.). В частности, можно предположить, что полимеразы PolV при участии белков системы рекомбинационной репарации, возможно, в той или иной степени способна преодолевать блок репликации, вызываемый моноаддуктами 8-МОП.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием в качестве объекта животных.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием в качестве объекта людей.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Dall'Acqua F., Marciani S., Rodighiero G.* Inter-strand cross-linkages occurring in the photoreactions between psoralen and DNA // *FEBS Lett.* 1970. V. 9. P. 121–123.  
[https://doi.org/10.1016/0014-5793\(70\)80330-1](https://doi.org/10.1016/0014-5793(70)80330-1)
2. *Cole R.S.* Psoralen monoadducts and interstrand cross-links in DNA // *Biochim. Biophys. Acta.* 1971. V. 254. P. 30–39.  
[https://doi.org/10.1016/0005-2787\(71\)90111-0](https://doi.org/10.1016/0005-2787(71)90111-0)
3. *Dall'Acqua F., Marciani S., Ciavatta G., Rodighiero G.* Formation of interstrand cross-linkings in the photoreactions between fluorecoumarins and DNA // *Z. Naturforsch.* 1971. V. 26b. P. 561–565.  
<https://doi.org/10.1515/znb-1971-0613>

4. *Rodighiero G., Dall'Acqua F.* Biochemical and medical aspect of psoralens // *Photochem. Photobiol.* 1976. V. 24. P. 647–653.  
<https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1976.tb06887.x>
5. *Chatterjee P.K., Cantor C.R.* Photochemical production of psoralen DNA monoadducts capable of subsequent photocross-linking // *Nucl. Acids Res.* 1978. V. 5. P. 3619–3633.  
<https://doi.org/10.1093/nar/5.10.3619>
6. *Hradechna Z., Kittler L.* Photobiology of furocoumarins. Various types of cross-linking with DNA and their interference with the development of lambda phage // *Acta Virol.* 1982. V. 26. P. 305–311.
7. *Белогуров А.А., Зувев А.В., Завильгельский Г.Б.* Репарация моноаддуктов и диаддуктов 8-метоксипсоралена у бактериофагов и бактерий // *Мол. биология.* 1976. Т. 10(4). С. 857–867.
8. *Cassuto E., Gross N., Bardwell E., Howard-Flanders P.* Genetic effects of photoadducts and photocross-links in the DNA of phage  $\lambda$  exposed to 360 nm light and trimethyl-psoralen or khellin // *Biochim. Biophys. Acta.* 1977. V. 475. P. 589–600.  
[https://doi.org/10.1016/0005-2787\(77\)90319-7](https://doi.org/10.1016/0005-2787(77)90319-7)
9. *Weigle J.J.* Induction of mutation in bacterial virus // *PNAS.* 1953. V. 39. P. 628–636.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.39.7.628>
10. *Radman M.* SOS repair hypothesis: phenomenology of an inducible DNA repair which is accompanied by mutagenesis // *Mol. Mech. for Repair of DNA* / Eds. Hanawalt P., Setlow R.B. N.Y.: Plenum Publ. Corp., 1975. Pt. A. P. 355–367.  
[https://doi.org/10.1007/978-1-4684-2895-7\\_48](https://doi.org/10.1007/978-1-4684-2895-7_48)
11. *Kato T., Shinoura Y.* Isolation and characterization of mutants of *Escherichia coli* deficient in induction of mutations by ultraviolet light // *Mol. Gen. Genet.* 1977. V. 156. P. 121–131.  
<https://doi.org/10.1007/BF00283484>
12. *Tang M., Bruck L., Eritja R., Tarner J. et al.* Biochemical basis of SOS-induced mutagenesis in *Escherichia coli*: Reconstitution of *in vitro* lesion bypass dependent on the UmuD<sup>'</sup><sub>2</sub>C mutagenic complex and RecA protein // *PNAS.* 1998. V. 95. P. 9755–9760.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.95.17.9755>
13. *Tang M., Shen X., Frank E.G., Woodgate R. et al.* UmuD<sup>'</sup><sub>2</sub>C is an error-prone DNA polymerase // *PNAS.* 1999. V. 96. P. 8919–8924.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.96.16.8919>
14. *Reuven N.B., Arad G., Maor-Shoshani A., Livneh Z.* The mutagenesis protein UmuC is a DNA polymerase activated by UmuD<sup>'</sup>, RecA, and SSB, and is specialized for translesion replication // *J. Biol. Chem.* 1999. V. 274. P. 31763–31766.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.274.45.31763>
15. *Defais M., Lesca C., Monsarrat B., Hanavalt P.* Translesion synthesis is the main component of SOS repair in bacteriophage lambda DNA // *J. Bacteriol.* 1989. V. 171. P. 4938–4944.  
<https://doi.org/10.1128/jb.171.9.4938-4944.1989>
16. *Jiang Q., Karata K., Woodgate R., Cox M.M. et al.* The active form of DNA polymerase V is UmuD<sup>'</sup><sub>2</sub>C-RecA\*-ATP // *Nature.* 2009. V. 460. P. 359–363.  
<https://doi.org/10.1038/nature08178>
17. *Patel M., Jiang Q., Woodgate R., Cox M.M. et al.* A new model for SOS-induced mutagenesis: How RecA protein activates DNA polymerase V // *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 2010. V. 45. P. 171–184.  
<https://doi.org/10.3109/10409238.2010.480968>
18. *Завильгельский Г.Б., Белогуров А.А., Крюгер Д.Н.* W-реактивация и W-мутационез у бактериофагов  $\lambda$  и T7: сравнительный анализ действия ультрафиолетового излучения (254 нм) и фотосенсибилизаторов 8-метоксипсоралена и ангелицина // *Генетика.* 1982. Т. 18. № 1. С. 24–34.
19. *Krivisky A.S., Esipova V.V., Zuev A.V.* Induction of mutations and repair in bacteriophages after photosensitizing action of 8-methoxypsoralen // *Biologisches Zentralblatt.* 1979. V. 98. P. 175–183.
20. *Ashwood M.J., Grant F.* Conversion of psoralen DNA monoadducts in *Escherichia coli* to interstrand DNA cross-links by near UV light (320–360 nm): Inability of angelicin to form crosslinks *in vivo* // *Experientia.* 1977. V. 33. P. 384–386.  
<https://doi.org/10.1007/BF02002841>
21. *Sambrook J., Fritsch E.P., Maniatis T.* *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* 2nd ed. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Lab. Press., 1989. 1626 pp.
22. *Завильгельский Г.Б., Котова В.Ю.* SOS-репарация моноаддуктов 8-метоксипсоралена в ДНК бактериофага  $\lambda$  и плазмид осуществляется полимеразой MucA<sup>'</sup><sub>2</sub>B, но не UmuD<sup>'</sup><sub>2</sub>C (PolV) // *Генетика.* 2013. Т. 49. № 12. С. 1370–1375.  
<https://doi.org/10.7868/S001667581312014X>
23. *Pacelli L., Edmiston S., Mount D.* Isolation and characterization of amber mutation in the *lexA* gene of *Escherichia coli* K12 // *J. Bacteriology.* 1979. V. 137. P. 568–573.  
<https://doi.org/10.1128/JB.137.1.568-573.1979.573>
24. *George J., Buttin G.* Prophage induction and cell division in *Escherichia coli*. I. Further characterization of the thermosensitive mutation tif-1 whose expression mimics the effect of the UV-irradiation // *Mol. Gen. Genetics.* 1972. V. 119. P. 139–152.  
<https://doi.org/10.1007/BF00269133>
25. *Dobson P.P., Walker G.C.* Plasmid pKM101 mediated W-reactivation in *Escherichia coli* K12 and *Salmonella typhimurium* LT: Genetic dependence, kinetics of induction and effect of chloramphenicol // *Mutation Res.* 1980. V. 71. P. 25–41.  
[https://doi.org/10.1016/0027-5107\(80\)90004-4](https://doi.org/10.1016/0027-5107(80)90004-4)
26. *Hauser J., Levine A.S., Ennis D.G., Chumakov K.M. et al.* The enhanced mutagenic potential of the MucAB proteins correlates with the highly efficient processing of the MucA protein // *J. Bacteriol.* 1992. V. 174. P. 6844–6851.  
<https://doi.org/10.1128/jb.174.21.6844-6851.1992>
27. *Elledge S.J., Walker G.C.* The *muc* genes of pKM101 are induced by DNA damage // *J. Bacteriol.* 1983. V. 155. P. 1306–1315.  
<https://doi.org/10.1128/JB.155.3.1306-1315.1983>
28. *Belogurov A.A., Zavilgelsky G.B.* Mutagenic effect of furocoumarin monoadducts and cross-links on bacteriophage lambda // *Mutation Res.* 1981. V. 84. P. 11–15.  
[https://doi.org/10.1016/0027-5107\(81\)90045-2](https://doi.org/10.1016/0027-5107(81)90045-2)

29. Janel-Bintz R., Maenhaut-Michel G., Fuchs R.P. MucAB but not UmuDC proteins enhance (-2) frame shift mutagenesis induced by N-2-acetylaminofluo-

rene at alternating GC sequences // Mol. Gen. Genet. 1994. V. 245. P. 279–285.  
<https://doi.org/10.1007/BF00290107>

## The Ratio of Lethal and Mutagenic Damages in DNA of Plasmids and Bacteriophages after 8-Methoxypsoralen Plus Light ( $\lambda \geq 320$ nm) Treatment

V. Yu. Kotova<sup>a, c, \*</sup>, S. K. Abilev<sup>b</sup>, and G. B. Zavilgelsky<sup>a, c, \*\*</sup>

<sup>a</sup>State Research Institute for Genetics and Selection of Industrial Microorganisms of the National Research Center “Kurchatov Institute,” Moscow, 117545 Russia

<sup>b</sup>Vavilov Institute of General Genetics Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

<sup>c</sup>National Research Center “Kurchatov Institute,” Moscow, 123098 Russia

\*e-mail: v-kotova@mail.ru

\*\*e-mail: zavilgel@mail.ru

The K-ratio of diadducts (D) and monoadducts (M) of 8-methoxypsoralen (8-MOP) in the DNA, packed inside the head of the  $\lambda$  bacteriophage, and in the DNA of the pBR322 plasmid under UV irradiation ( $\lambda \geq 320$  nm) was measured. The probabilities of P-UVR-excision repair of 8-MOP monoadducts and S and  $S_m$  – SOS repair of 8-MOP diadducts and monoadducts were determined. The measurement of P was performed using an angular derivative of angelicin. P is shown to have the value of 0.86. To determine S and  $S_m$  we used bacteriophage  $\lambda_{11}$ , treated with 8-MOP + UV ( $\lambda \geq 320$  nm) or 8-MOP + UV ( $\lambda \geq 380$  nm), and seeded either on pre-irradiated by short-wave UV ( $\lambda = 254$  nm) bacteria, or on bacteria with constitutive synthesis of SOS-regulon genes, as well as on bacteria containing the pKM101 plasmid. The degree of W-reactivation ( $\alpha$ ) and the frequency of W-mutagenesis of clear mutations ( $m$ ) were determined in bacteriophage  $\lambda_{11}$ . We show that diadducts (“crosslinks”) of 8-MOP are repaired by the bacterial SOS system with a probability of S = 0.28–0.29, and monoadducts of 8-MOP are repaired by the bacterial SOS system with a probability  $S_m = 0.41$  only with the participation of the MucA<sub>2</sub>B enzyme, whose genes are located in the pKM101 conjugative plasmid.

**Keywords:** 8-methoxypsoralen, DNA, diadduct, monoadduct, plasmid, bacteriophage, UVR-repair, SOS-repair, W-reactivation, W-mutagenesis.