

**УСИЛЕНИЕ ОКСИДОМ ДЕЙТЕРИЯ ЭКСПРЕССИИ
ГЕНОВ *ada*, *alkA* И *luxA* *Escherichia coli*,
ИНДУЦИРОВАННЫХ МЕТИЛМЕТАНСУЛЬФОНАТОМ**

© 2022 г. Д. А. Свиридова¹, С. В. Смирнова¹, С. К. Абилев^{1, 2, *}

¹Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119234 Россия

*e-mail: abilev@vigg.ru

Поступила в редакцию 23.11.2021 г.

После доработки 29.11.2021 г.

Принята к публикации 30.11.2021 г.

Изучали экспрессию генов *ada* и *alkA* *E. coli*, и гена *luxA* *lux*-оперона в составе плазмиды и находящегося под контролем промотора гена *alkA*, индуцированную метилметансульфонатом (ММС) в клетках дейтерированных и недейтерированных бактерий биосенсора *E. coli* K12 MG1655 (pAlkA–*lux*) с помощью метода ОТ-ПЦР. В качестве референсного был использован ген *rrsA* 16S РНК рибосомы, экспрессирующийся конститутивно. Дейтерирование бактериальной культуры проводили в среде, содержащей 7.5% оксида дейтерия (D₂O). Показатели числа циклов ПЦР в клетках дейтерированных и недейтерированных бактерий отличались – при дейтерировании выход кривой зависимости уровня экспрессии исследуемых генов от числа циклов ПЦР на экспоненту происходил раньше, чем у недейтерированных бактерий. Эта разница в числе циклов (*Ct*) составила 4, 6 и 9, для генов *luxA*, *alkA* и *ada* соответственно.

Ключевые слова: оксид дейтерия, дейтерирование бактерий, биосенсоры, *E. coli*, метилметансульфонат, ОТ-ПЦР, экспрессия генов.

DOI: 10.31857/S0016675822040130

Начиная со времени открытия тяжелой воды (1932 г.) началось изучение влияния больших концентраций ее на биологические объекты. Концентрированная тяжелая вода, в которой все атомы водорода заменены на дейтерий, отличается по своим физическим свойствам от обычной воды, в которой присутствие небольшого количества (0.0149%) тяжелой воды практически не влияет на ее физические свойства. Различаются соединения с обычным и тяжелым водородом и по химическим свойствам. Замена обычного водорода на тяжелый ведет прежде всего к снижению скоростей химических реакций (в 3–10 раз). Естественно, что замена в живом организме значительной части атомов водорода на атомы дейтерия поведет к замедлению многих химических реакций, определяющих сложные биологические процессы в клетках, тканях и в организме в целом. Таким исследованиям посвящена обширная литература [1–5].

Ранее нами были проведены исследования влияния оксида дейтерия (D₂O) на индуцибельные процессы в бактериальной клетке с использованием *lux*-биосенсоров на основе штамма *E. coli* K12 MG1655. Биосенсоры содержат ги-

бридную плазмиду, несущую *luxCDABE*-оперон фотобактерии *Photobacterium luminescens*, поставленный под контроль промотора генов *recA*, *colD* и *alkA*. Биосенсоры люминесцируют в результате активации указанных промоторов в ответ на повреждение ДНК химическими генотоксикантами и мутагенами [6–8]. Было показано, что предварительное культивирование клеток *E. coli* в среде с D₂O усиливает активацию SOS-регулона, индуцированную 4-нитрохиолин-1-оксидом, N-нитрозо-N-метилмочевинной (НММ) и митомицином С [7], а также *ada*-регулона, индуцированную алкилирующими соединениями нитрозометилмочевинной и метилметансульфонатом (ММС) [8]. В этой связи возникает вопрос о механизме влияния D₂O на процессы активации индуцибельных регулонов в клетках *E. coli*. Возможной причиной в случае SOS-регулона может быть усиление ковалентных связей типа N–H, а также усиление связи генотоксикантов с ДНК в результате изотопного замещения легкого (против) на тяжелый изотоп (дейтерий). В активации *ada*-регулона важную роль в качестве регулятора транскрипции играет алкилированный белок Ada. Показано, что метилирование N-домена белка Ada приводит к повышению аффинности к промо-

Таблица 1. Показатели экспрессии генов *ada*-регулона *E. coli*, индуцированных ММС, число циклов ПЦР (*Ct*)

| Ген | Кол-во экспериментов | Варианты экспериментов, число циклов ПЦР (<i>Ct</i>) | | |
|-------------|----------------------|--|-------------------|-----------------------------|
| | | без дейтерирования | с дейтерированием | *референсный ген <i>rss</i> |
| <i>luxA</i> | 5 | 36 ± 0.40 | 32 ± 1.27 | 22 ± 0.17 |
| <i>alkA</i> | 5 | 36.6 ± 0.32 | 30.8 ± 0.05 | 24 ± 0.27 |
| <i>ada</i> | 3 | 39 ± 0.33 | 30.3 ± 0.95 | 24.3 ± 0.13 |

* – экспрессия референсного гена *rss* не зависела от дейтерирования бактерий *E. coli*.

торным участкам *ada*-регулона и превращает его в сильный транскрипционный активатор [9–11]. Замена протия на дейтерий в этих последовательностях ДНК или в самом белке может быть одним из главных факторов стабилизации связи между промотором и алкилированным белком, следовательно, существенным фактором в изотопном эффекте D₂O.

В настоящей работе с целью получения дополнительного доказательства влияния D₂O на транскрипцию *ada*-регулона проведено исследование экспрессии хромосомных генов *alkA* и *ada*, входящих в *ada*-регулон *E. coli*, и плазмидного гена *luxA*, находящегося под контролем промотора гена *alkA*, с помощью метода ОТ-ПЦР.

Для сравнительного изучения индукции *ada*-регулона в дейтерированных и в недейтерированных (контрольных) культурах *E. coli* использовали биосенсор *E. coli* K12 MG1655 (pAlkA-lux), люминесцирующий в результате активации промотора гена *alkA* в ответ на алкилирование ДНК [12]. Дейтерирование бактериальной культуры проводили в среде с D₂O (концентрация 7.5%) в течение 90 мин. Затем в контрольную и дейтерированную культуры добавляли ММС в концентрации 0.5 ммоль/л и инкубировали в течение 20 мин. Далее образцы центрифугировали, отбирали супернатант и осадок растворяли в 1 мл реагента для выделения РНК (ExtractRNA, Евроген). После ряда процедур, проведенных в соответствии с рекомендациями производителя реагента ExtractRNA, полученную РНК обрабатывали ДНКазой (Thermo Fisher Sci., США). Очищенные образцы РНК далее использовали для синтеза кДНК с помощью набора QuantiTect Rev. Transcription Kit (Qiagen, США). Брали до 100 нг очищенной от ДНК РНК, добавляли 1 мкл RT-Transferase, 1 мкл Primermix, 4 мкл буфера и доводили до 20 мкл RNA free водой. Смеси образцов инкубировали 17 мин при 42°C, далее – 3 мин при 95°C в амплификаторе QuantStudio 5 Real-Time PCR (Thermo Fisher Sci., США). Полученную кДНК использовали для ОТ-ПЦР с помощью набора SYBR Green PCR mix (Евроген, РФ) и праймеров:

Forward *rssA* CAACGAGCGCAACCCTTATC
 Revers *rssA* AGGGCCATGATGACTTGACG
 Forward *luxA* TGTTCTTCCCACCGCTCATC

Revers *luxA* CCGTACCAGCACTCCGTTAA
 Forward *alkA* GCACAGCTTTATGGCGAACG
 Revers *alkA* TTTCATCGCCTGCTCCACAT
 Forward *ada* GACGATCAACGCTGGCAATC
 Revers *ada* CGCTGGCATTGTCGTTAGAAG

Результаты изучения экспрессии генов *ada* и *alkA* *E. coli*, и гена *luxA* lux-оперона в составе плазмиды биосенсора и находящегося под контролем промотора гена *alkA*, индуцированных ММС в клетках дейтерированных и недейтерированных бактерий биосенсора *E. coli* K12 MG1655 (pAlkA-lux) представлены в табл. 1. В качестве референсного был использован ген *rssA* 16S РНК рибосомы, экспрессирующийся конститутивно. Показатели числа циклов ПЦР в клетках дейтерированных и недейтерированных бактерий отличались – при дейтерировании выход кривой зависимости уровня экспрессии исследуемых генов от числа циклов ПЦР на экспоненту происходил раньше, чем у недейтерированных бактерий. Эта разница в числе циклов (*Ct*) составила 4, 6 и 9, для генов *luxA*, *alkA* и *ada* соответственно (табл. 1).

Для наглядности первичные данные по всем вариантам экспериментов были подвергнуты анализу с помощью диаграмм “ящик с усами” (BoxPlot). Данный подход анализа данных экспрессии генов был использован в работах [13, 14]. На рис. 1 представлены распределения числовых значений показателя “циклы ПЦР, *Ct*” для трех исследуемых генов *luxA*, *alkA* и *ada* и одного референсного гена *rss* в дейтерированных и недейтерированных клетках бактерий *E. coli*.

Диаграмма отображает диапазон данных, находящийся между первым и третьим квартилем, а медиана делит эту коробку на две части (межквартильный диапазон). Усы отображают данные первого квартиля – от второго квартиля до минимального значения, и четвертого квартиля – от третьего до максимального значения. Из рис. 1 видно, что референсный ген *rss* начинает экспрессироваться на 22–25 циклах, тогда как исследуемые гены – на 30–35 циклах, в случае дейтерированных, и на 35–39 циклах в случае недейтерированных бактерий. Все эти данные указывают на усиливающее действие дейтерия (7.5% D₂O) на экспрессию генов *ada*-регулона *E. coli*, индуцированную алкилирующим агентом ММС.

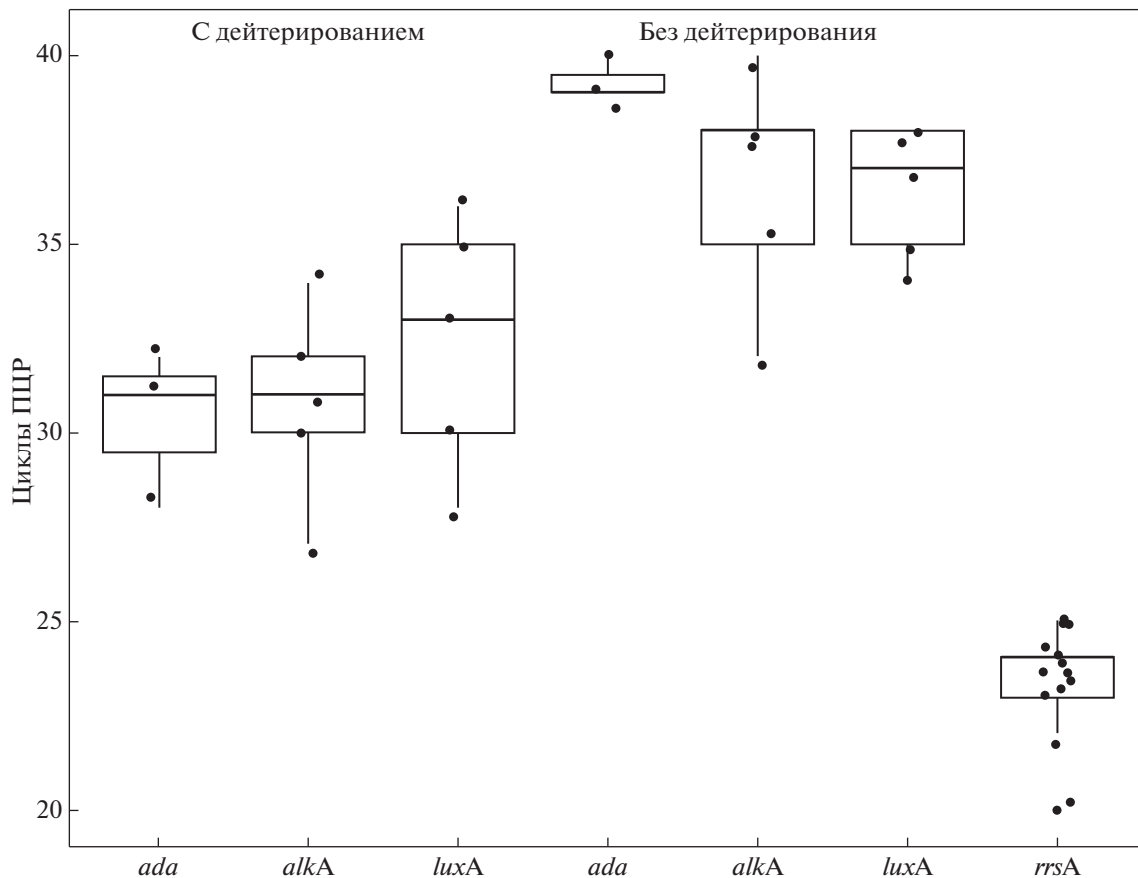


Рис. 1. Распределение показателей экспрессии генов *luxA*, *alkA* и *ada* в клетках дейтерированных и недейтерированных бактерий *E. coli*, индуцированных ММС.

Вопрос изучения молекулярного механизма влияния дейтерия на экспрессию генов является актуальной задачей. В нашем случае в качестве модели изначально были выбраны бактериальные биосенсоры, позволяющие по интенсивности их люминесценции регистрировать экспрессию индуцибельных генов *E. coli*.

Ранее усиливающее действие дейтерия на SOS-ответ бактерий *E. coli* на ДНК-повреждающее действие химических генотоксикантов (таких как: 4-нитрохинолин-1-оксид, N-нитрозо-N-метилмочевина и митомицин С) мы объясняли возможной повышенной прочностью связи генотоксикант–ДНК в дейтерированных участках взаимодействующих молекул и, соответственно, сдвигом баланса между скоростью накопления повреждений и скоростью восстановления исходной структуры ДНК ферментами репарационной системы [7, 9]. Для объяснения влияния дейтерия на активность алкилирующих агентов нитрозо-метил мочевины и ММС мы опирались на данные о вероятном механизме транскрипции генов *ada*-регулона *E. coli* и роли в этом алкилированного белка Ada в качестве транскрипционного фактора [9–11]. Метилирование алкилирующим агентом

N-домена белка Ada приводит к повышению аффинности к промоторным участкам *ada*-регулона. Следовательно, наличие дейтерированных оснований на промоторных последовательностях ДНК или в самом белке может быть одной из главных причин стабилизации связи между промоторами и алкилированным белком Ada, что может быть существенным фактором, при наблюдаемом нами эффекте дейтерия.

В изотопном эффекте дейтерия при изучении ДНК-повреждающего действия генотоксикантов, по-видимому, немаловажную роль играет не только усиление репарационных процессов, но ингибирование ряда ферментных систем, участвующих в биотрансформации генотоксикантов в клетке. Например было показано, что предварительное дейтерирование бактерий биосенсора *E. coli* (pRecA–lux) приводит к усилению экспрессии гена *recA*, индуцированной H₂O₂. Для объяснения выявленного феномена была изучена экспрессия гена каталазы в дейтерированных и недейтерированных культурах биосенсора *E. coli* (pKatA–lux). Люминесценция этого биосенсора происходит в результате активации промотора гена *kata* в ответ на увеличение концентрации H₂O₂.

в клетке. Выявлено, что D₂O снижает уровень экспрессии гена *katA*, что может привести к накоплению H₂O₂, и, соответственно, увеличению уровня повреждений ДНК, регистрируемых по увеличению экспрессии гена *recA* [15].

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (№ 19-04-00200/21).

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. Czajka D.M., Finkel A.J., Fischer C.S., Katz J.J. Physiological effects of deuterium on dogs // *Am. J. Physiol.* 1961. V. 201. P. 357–362. <https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1961.201.2.357>
2. Денько Е.И. Действие тяжелой воды (D₂O) на клетки животных, растений и микроорганизмы // *Успехи соврем. биологии.* 1973. Т. 70. № 4. С. 41–49.
3. Лобышев В.Н., Калинин Л.П. Изотопные эффекты D₂O в биологических системах. М.: Наука, 1978. 215 с.
4. Takeda H., Nio Y., Omori H. et al. Mechanisms of cytotoxic effects of heavy water (deuterium oxide: D₂O) on cancer cells // *Anticancer Drugs.* 1998. V. 9. № 8. P. 715–725.
5. Altermatt H.J., Gebbers J.O., Laissue J.A. Heavy water delays growth of human carcinoma in nude mice // *Cancer.* 1988. V. 62. № 3. P. 462–466.
6. Котова В.Ю., Манухов И.В., Завильгельский Г.Б. Лух-биосенсоры для детекции SOS-ответа, теплового шока и окислительного стресса // *Биотехнология.* 2009. № 6. С. 16–25. <https://doi.org/10.1134/S0003683810080089>
7. Абилев С.К., Смирнова С.В., Игонина Е.В. и др. Оксид дейтерия усиливает SOS-ответ клеток *Escherichia coli*, индуцированный генотоксикантами // *ДАН.* 2018. Т. 480. № 2. С. 1–5.
8. Смирнова С.В., Абилев С.К., Игонина Е.В. и др. Влияние дейтерия на индукцию *ada*-регулона алкилирующими веществами в клетках *Escherichia coli* // *Генетика.* 2018. Т. 54. № 8. С. 915–921. <https://doi.org/10.1134/S001667581808012X>
9. Sakumi K., Igarashi K., Sekiguchi M., Ishihama A. The Ada protein is a class I transcription factor of *Escherichia coli* // *J. Bacteriol.* 1993. V. 175. P. 2455–2457.
10. Landini P., Volkert M.R. Regulatory responses of the adaptive response to alkylation damage: A simple regulon with complex regulatory features // *J. Bacteriol.* 2000. V. 182. № 23. P. 6543–6549. <https://doi.org/10.1128/JB.182.23.6543-6549.2000>
11. Mielecki D., Wrzesin'ski M., Grzesiuk E. Inducible repair of alkylated DNA in microorganisms // *Mutat. Res.* 2015. V. 763. P. 294–305. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2014.12.001>
12. Горянин И.И., Котова В.Ю., Краснопеева Е.Д. и др. Определение генотоксического действия 1,1-диметилгидразина алкилирующими соединениями, возникающими при его окислении, и перекисью водорода // *Тр. МФТИ.* 2013. Т. 5. № 1. С. 103–110.
13. Bai B., Ren J., Bai F., Hao L. Selection and validation of reference genes for gene expression studies in *Pseudomonas brassicacearum* GS20 using real-time quantitative reverse transcription PCR // *PLoS One.* 2020. V. 15(1). e0227927. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227927>
14. Peng S., Stephan R., Hummerjohann J., Tasara T. Evaluation of three reference genes of *Escherichia coli* for mRNA expression level normalization in view of salt and organic acid stress exposure in food // *FEMS Microbiol. Lett.* 2014. V. 355. P. 78–82. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12447>
15. Абилев С.К., Игонина Е.В., Смирнова С.В., Рубанович А.В. Влияние дейтерия на экспрессию индуцибельных генов у *Escherichia coli* // *Рад. биол. радиоэкология.* 2019. Т. 59. № 3. С. 305–310.

Deuterium Oxide Enhances of Expression of Genes *ada*, *alkA* and *luxA* *Escherichia coli* Induced by Methylmethanesulphonate

D. A. Sviridova^a, S. V. Smirnova^a, and S. K. Abilev^{a, b, *}

^aVavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

^bMoscow State University, Moscow, 119234 Russia

*e-mail: abilev@vigg.ru

We studied the expression of the *E. coli* *ada* and *alkA* genes, and the *luxA* lux-operon gene in the plasmid and under the control of the *alkA* gene promoter methyl methanesulphonate (MMS) in the cells of deuterated and non-deuterated bacteria of the *E. coli* K12 MG1655 biosensor (pAlkA-lux) with using the RT-PCR method. The *rrs* 16S ribosome RNA gene, expressed constitutively, was used as a reference. Deuteration of the bacterial culture was carried out in a medium containing 7.5% deuterium oxide (D₂O). The indices of the number of PCR cycles in the cells of deuterated and non-deuterated bacteria were different; the exponential emergence of the curve of the dependence of the expression level of the studied genes on the number of PCR cycles occurred earlier during deuteration than in non-deuterated bacteria. This difference in the number of cycles (*Ct*) was 4, 6, and 9 for the *luxA*, *alkA*, and *ada* genes, respectively.

Keywords: deuterium oxide, biosensors, *E. coli*, methyl methanesulphonate, RT-PCR, gene expression.