

УДК 551.464.611.02:579.25:577.222:57.083.1

## ВЛИЯНИЕ ДЕЙТЕРИЯ НА ЭКСПРЕССИЮ ИНДУЦИБЕЛЬНЫХ ГЕНОВ У *Escherichia coli*

© 2019 г. С. К. Абилов<sup>1,2,\*</sup>, Е. В. Игонина<sup>1</sup>, С. В. Смирнова<sup>1</sup>, А. В. Рубанович<sup>1</sup><sup>1</sup> Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, Россия<sup>2</sup> Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

\* E-mail: abilev@vigg.ru

Поступила в редакцию 23.07.2018 г.

Впервые показано, что предварительное дейтерирование бактерий *Escherichia coli* оксидом дейтерия ( $D_2O$ ) в концентрациях от 2.5 до 10% в среде приводит к усилению экспрессии гена *recA*, индуцированной  $H_2O_2$  в концентрациях 2.2–8.8 ммоль/л. Для сравнительного изучения индукции *recA*-гена в дейтерированных и недейтерированных (контрольных) культурах использовали биосенсор на основе штамма *E. coli* K12 MG1655 (*pRecA-lux*), люминесцирующий в результате активации промотора гена *recA* в ответ на повреждения ДНК, вызванные  $H_2O_2$ . Концентрации  $D_2O$  5.0 и 7.5% были наиболее эффективными. Для объяснения выявленного феномена была изучена экспрессия гена каталазы в дейтерированных и недейтерированных культурах биосенсора *E. coli* K12 MG1655 (*pKatA-lux*). Люминесценция этого биосенсора происходит в результате активации промотора гена *katA* в ответ на увеличение концентрации  $H_2O_2$  в клетке. Выявлено, что  $D_2O$  снижает уровень экспрессии гена *katA*, что может привести к накоплению  $H_2O_2$ , и соответственно возрастанию уровня повреждений ДНК, регистрируемого по увеличению экспрессии гена *recA*.

**Ключевые слова:** оксид дейтерия, перекись водорода, *Escherichia coli*, экспрессия гена *recA*, экспрессия гена *katA*, биосенсоры

DOI: 10.1134/S0869803119030032

Дейтерий (D), тяжелый изотоп водорода – против (H), был открыт в 1932 г. [1]. Дейтерий находится в природе в незначительных количествах и составляет 0.0156% от общего количества водорода в природе. Наиболее распространенным его соединением является оксид дейтерия ( $D_2O$ ), который в 1933 г. был получен в концентрированном виде и получил название “тяжелая вода”. В ядерных реакторах  $D_2O$  используется как замедлитель нейтронов. Способность  $D_2O$  регулировать ядерные реакции привела к появлению промышленного производства этого соединения.  $D_2O$  в физике элементарных частиц используется для детектирования нейтрино, в химии и биологии – в качестве изотопного индикатора [2, 3]. Распространение в природе соединений, меченных дейтерием, позволяет проводить разнообразные экологические, геоморфологические, палеонтологические и другие исследования, в том числе связанные с проблемой происхождения Вселенной и Земли [4].

Изучение влияния  $D_2O$  на самые разные живые организмы началось сразу после получения этого соединения в значительных количествах. К настоящему времени накоплен большой объем информации по данному вопросу. Ранние исследова-

ния показали, что  $D_2O$  в больших концентрациях у живых организмов замедляет метаболизм, вызывает снижение уровней синтеза белков и нуклеиновых кислот, ингибирует митоз в стадии профазы, что приводит к нарушению процесса клеточного деления и морфологическим изменениям, понижает скорости ферментативных реакций [3, 5, 6]. Клетки животных способны выдерживать водные растворы с концентрацией  $D_2O$  до 30%, растений – 50%, микроводорослей – 70%, а клетки простейших и бактерий – 95% [5, 7]. Биологическая адаптация микроорганизмов к  $D_2O$  открывает большие возможности для получения меченого дейтерием биологического материала для диагностических и биомедицинских целей [7–9].

В экспериментах *in vitro* и *in vivo*  $D_2O$  подавлял рост как культивируемых *in vitro*, так и перевиваемых *in vivo* опухолевых клеток [10–13]. При комбинированном воздействии  $D_2O$  усиливал действие цитостатика гемцитабина (2',2'-дифтор-2'-дезоксцитидин) на опухолевые клеточные линии поджелудочной железы человека [14], 5-фторурацила и блеомицина на инокулированные подкожно мышам клетки плоскоклеточной карциномы человека [15].

Несмотря на многочисленные работы по изучению токсического действия  $D_2O$  на уровне целого организма и влияния его на физиологические и биохимические процессы в клетке, исследования его влияния на генетические механизмы немногочисленны. Ранее было показано, что предварительное дейтерирование культуры мышечных лейкемических клеток L5178Y в течение 3 ч  $D_2O$  в концентрации 45% в среде усиливает мутагенное действие  $\gamma$ -лучей в низких дозах или тритийсодержащей воды ( $\beta$ -лучей) при мощностях доз от 0.025 до 0.4 Гр/ч, регистрируемое по индукции мутаций устойчивости к 6-тиоганину [16]. Нами впервые было показано, что предварительное культивирование клеток *E. coli* в среде с концентрацией  $D_2O$  не более 10% усиливает SOS-ответ, индуцированный 4-нитрохинолин-1-оксидом, N-нитрозо-N-метилмочевинной (НММ) и митомицином С [17], а также экспрессию гена *alkA*, индуцированную алкилирующими соединениями метилметансульфонатом и нитрозометилмочевинной [18]. Это является свидетельством того, что в случае индукции генотоксичными агентами повреждений ДНК дейтерирование усиливает экспрессию генов, относящихся к системам SOS-репарации ДНК и адаптивного ответа.

В настоящей работе изучали влияние предварительного культивирования клеток *E. coli* в среде с  $D_2O$  на индуцированный перекисью водорода экспрессию генов *recA*, входящего в SOS-регулон, а также гена каталазы *katG*, разрушающей перекись  $H_2O_2$ , являясь нейтральной молекулой, в результате ферментативных процессов в клетке с участием металлов переменной валентности, может образовать высокорекреационный гидроксильный радикал [19]. Это позволяет использовать его в качестве имитатора ионизирующего излучения.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА

В работе использованы генетически модифицированные штаммы *E. coli*, содержащие плазмиды, несущие оперон *luxCDABE* почвенной фотобактерии *Photobacterium luminescens*, поставленный под контроль промоторов генов *recA* и каталазы (*katG*): *E. coli* MG1655 (*pRecA-lux*) и *E. coli* MG1655 (*pKatG-lux*). Оперон *luxCDABE* отвечает за работу люциферазы и обеспечивает биолюминесценцию, используемую в данном тесте в качестве репортерной функции. Штаммы любезно предоставлены Г.Б. Завильгельским и А.В. Мануховым (НИЦ “Курчатовский институт” – ГосНИИГенетика, Москва). Генотипы штаммов и конструкции рекомбинантных плазмид приведены в работе [20].

Культуры клеток *E. coli* выращивали на полноценной среде Луриа–Бертани (LB). Как в жид-

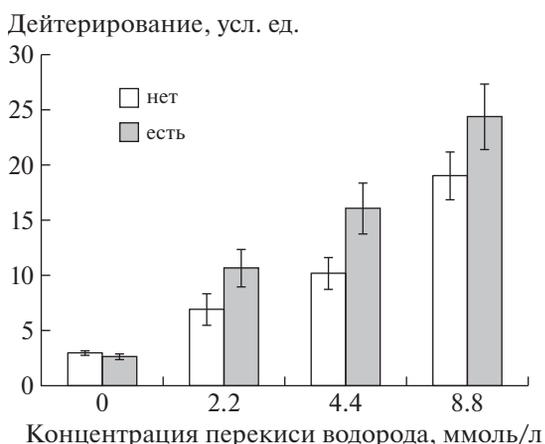
кую, так и твердую среды добавляли антибиотик ампициллин (100,0 мкг/мл). Культивирование бактерий в жидкой питательной среде проводили при 37°C до ранней или средней логарифмической фазы. Ночную культуру разбавляли свежей средой до плотности 0.01–0.1 единица Мак-Фарланда (концентрация  $3 \times 10^6$ – $3 \times 10^7$  кл./мл). Измерения проводили при помощи денситометра DEN-1B (“Biosan”). Затем суспензию подращивали в течение 2 ч при 37°C при 200 об./мин до ранней логарифмической фазы. Аликвоты этой культуры (по 180 мкл) переносили в стерильные ячейки (находящиеся в стрипах планшета) и добавляли в них, в зависимости от варианта эксперимента, по 20 мкл  $H_2O_2$ . В контрольные ячейки добавляли 20 мкл дистиллированной воды.

Через 60 и 90 мин после завершения описанных процедур проводили измерения люминесценции на микропланшетном ридере StatFax 4400, Awareness Technology Inc (США). Интенсивность биолюминесценции выражали в относительных единицах светового потока (relative light units – RLU). Статистическую обработку данных проводили в надстройке “Анализ данных” Microsoft Excel, StatPlus и WINPEPI (PEPI-for-Windows) Во всех случаях на графиках представлены средние значения и ошибки среднего. Значимость эффектов оценивалась с помощью многомерного регрессионного анализа (SPSS 20.0.0.).

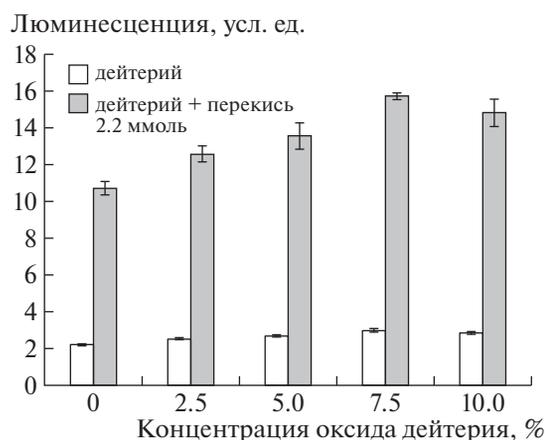
## РЕЗУЛЬТАТЫ

Известно, что  $H_2O_2$  является генотоксикантом и индуцирует SOS-ответ в клетках *E. coli* [21, 22]. В индукции SOS-ответа важную роль играют продукты генов *lexA* и *recA*, а также наличие однонитевых разрывов в ДНК, которые возникают как при прямой индукции разрывов, так и при блокировании синтеза повреждающими ДНК агентами [23–26].

Для изучения влияния дейтерирования на индукцию SOS-ответа в клетках *E. coli* MG1655 (*pRecA-lux*) перекисью нами были использованы  $D_2O$  в концентрации 7.5% в растущей культуре и 45-минутная экспозиция предварительного дейтерирования. Перекись водорода использовали в концентрациях 0.6–8.8 ммоль/л. Выбор данного диапазона обусловлен тем, что в предварительных экспериментах это соединение в более высоких концентрациях подавляло люминесценцию бактерий, что свидетельствовало о его токсичности. Из рис. 1 следует, что предварительное дейтерирование бактерий штамма *E. coli* MG1655 (*pRecA-lux*) усиливает экспрессию гена *recA*, индуцированной  $H_2O_2$ . Различие между уровнями экспрессии гена *recA* у недеитерированных и дей-



**Рис. 1.** Экспрессия гена *recA* при различных концентрациях H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и фиксированном уровне дейтерирования.



**Рис. 2.** Экспрессия гена *recA* при фиксированной концентрации H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и дейтерировании бактерий D<sub>2</sub>O в различных концентрациях.

терированных бактерий достигало максимума при концентрации перекиси 8.8 ммоль/л.

В табл. 1 представлены параметры линейной модели с двумя предикторами (множественный регрессионный анализ):

$$\text{Люминесценция} \sim \text{Концентрация H}_2\text{O}_2 + \text{Дейтерирование.}$$

Видно, что дейтерирование приводит к существенному повышению интенсивности люминесценции ( $p = 0.005$ ) при воздействии перекиси водорода. При этом, в отсутствие этого соединения, уровни экспрессии гена *recA* в чистом контроле и при дейтерировании значимо не различались (левая пара столбиков на рис. 1):  $p = 0.581$ .

Для подтверждения влияния дейтерия на индукцию SOS-ответа в бактериальных клетках были проведены эксперименты с различными концентрациями D<sub>2</sub>O в восьми повторностях. Для этого в растущие культуры бактерий добавляли D<sub>2</sub>O до конечных концентраций от 2.5 до 10% в среде и инкубировали в течение 60 мин при 37°C. Затем в эти культуры вносили перекись в концентрации 2.2 ммоль/л. Инкубировали 45 мин. Полученные результаты представлены на рис. 2. Само

дейтерирование бактерий приводило к небольшому, но значимому изменению экспрессии гена *recA* по отношению к таковой у бактерий, не подвергнутых воздействию перекиси ( $FC = 1.2-1.3$ ). Зависимость люминесценции от концентрации D<sub>2</sub>O значимо описывалась линейным уравнением вида:

$$Y = (22\,265 \pm 501) + (772 \pm 82)X;$$

$$R = 0.84; \quad p = 1.7E - 11,$$

где  $Y$  – уровень люминесценции,  $X$  – концентрация D<sub>2</sub>O в инкубационной среде, в %.

В присутствии H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> наблюдалась иная картина. Предварительное дейтерирование бактерий D<sub>2</sub>O в концентрациях от 2.5 до 10% в среде приводило к резкому усилению экспрессии гена *recA*, индуцированной H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Концентрации D<sub>2</sub>O 5,0 и 7.5% были наиболее эффективными, что согласуется с ранее полученными нами данными [17].

Известно, что в присутствии дейтерия химические и биохимические реакции происходят медленнее [3, 6]. В этой связи мы предположили, что он может снижать уровень каталазной активности в бактериальной клетке, разрушающей перекись, что привело бы к увеличению концентрации по-

**Таблица 1.** Влияние дейтерирования на экспрессию гена *recA* у биосенсора *E. coli* MG1655 (pRecA-lux)

Модель	Нестандартизованные коэффициенты		Стандартизованные коэффициенты	<i>t</i>	<i>p</i>
	<i>B</i>	<i>SE</i>	$\beta$		
(Константа)	15283.7	11577.5		1.320	0.193
Дейтерирование	36827.0	12557.6	0.223	2.933	0.005
Перекись	21082.4	1929.6	0.831	10.925	3.0E-14

Общие показатели модели:  $R^2 = 0.74$ ;  $p = 7.0E-14$ .

**Таблица 2.** Влияние дейтерирования на экспрессию гена каталазы у биосенсора *E. coli* MG1655 (pKatG-lux)

Модель	Нестандартизованные коэффициенты		Стандартизованные коэффициенты	<i>t</i>	<i>p</i>
	<i>B</i>	<i>SE</i>	$\beta$		
(Константа)	30982.5	1735.6		17.8	0.000
Перекись	6571.8	346.2	0.642	19.0	6.1E-61
Дейтерирование	-7323.8	2051.6	-0.121	-3.570	3.9E-4

Общие показатели модели:  $R^2 = 0.426$ ;  $p = 3.4E-61$ .

следней. Для проверки этого предположения были проведены эксперименты с использованием биосенсора *E. coli* MG1655 (pKatG-lux), дейтерированного в среде с 7.5% D<sub>2</sub>O. В ответ на действие перекиси у *E. coli* экспрессируются около 30 генов, девять из которых относятся к OxyR – регулону. Среди них *katG* (гидропероксидаза), *gorA* (глутатионредуктаза) и другие [27–29]. Поэтому интенсивность люминесценции бактерий *E. coli* MG1655(pKatG-lux) является показателем уровня экспрессии генов, входящих OxyR – регулон. Из рис. 2. видно, что интенсивность люминесценции бактерий растет линейно с увеличением концентрации H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. При этом люминесценция у дейтерированных бактерий ниже, чем у недейтерированных.

Выполнен множественный регрессионный анализ данных, полученных в 16 независимых экспериментах, каждый из которых проводился в восьми повторностях. В табл. 2 приведены параметры полученной линейной регрессионной модели с двумя предикторами:

Интенсивность люминесценции ~

~ Концентрация H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + Дейтерирование.

Корреляция между люминесценцией и дейтерированием при фиксированной концентрации перекиси (частная корреляция) равна -0.157 при  $p = 0.0004$ . Это означает, что дейтерирование значимо понижает люминесценцию биосенсора *E. coli* MG1655 (pKatG-lux). Этот эффект обусловлен снижением уровня каталазы в бактериальных клетках ( $p = 0.0004$ ).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Перекись водорода не является в прямом смысле свободным радикалом, однако обладает способностью инициировать свободнорадикальное окисление, поэтому является цитотоксическим соединением. В результате реакции Фентона между ионами металлов переменной валентности, в первую очередь ионами 2-валентного железа, образуется гидроксильный радикал:  $H_2O_2 + Fe^{2+} > Fe^{3+} + OH^- + OH^\bullet$  [30].

Важность ионов железа объясняется тем, что они входят в большом количестве в состав крови (гемоглобин, миоглобин и пр.), где они находятся в связанной форме с трансферрином. Гидроксильные радикалы чрезвычайно активны и оказывают разрушающее действие на различные молекулы, включая ДНК и РНК, вызывают мутации и гибель клеток [31–33]. Цитотоксическое и канцерогенное действие ионизирующих излучений на живые организмы напрямую связывают с генерацией  $OH^\bullet$  в процессе радиолиза воды. Генотоксичность H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> показана как для прокариотических, так и для эукариотических клеток [34–36]. Будучи главным медиатором окислительного стресса, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> может косвенно приводить к повреждению генома вследствие индукции деградации хроматина [37], индуцировать разрывы ДНК в клетках млекопитающих как соматического, так и генеративного ряда [34, 36]. Повреждения ДНК в выживших клетках могут быть причиной соматических мутаций с неопластическим потенциалом.

Биологические эффекты D<sub>2</sub>O объясняют разницей ядерных масс пары H/D, т.е. изотопными эффектами. Показано, что химические реакции в D<sub>2</sub>O протекают медленнее, чем в H<sub>2</sub>O; D<sub>2</sub>O слабее ионизирована, чем H<sub>2</sub>O; водородные связи с участием дейтерия прочнее обычных [3]. Наше предположение, что предварительное дейтерирование может снижать уровень активности каталазы в бактериальной клетке, разрушающей H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, что привело бы к увеличению концентрации последней и соответственно усилению индукции SOS-ответа, получило экспериментальное подтверждение (рис. 3). Дейтерирование приводило к снижению уровня каталазной активности и в бактериях, не подвергнутых воздействию перекиси. Данный феномен является предметом специального исследования.

Каталаза – это гемсодержащий фермент, катализирует реакцию  $2H_2O_2 = 2H_2O + O_2$ . Каталазная активность обнаруживается во всех растениях и микроорганизмах, за исключением облигатных анаэробов [36]. Наряду с каталазой, реакцию расщепления H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> может катализировать и глутатионпероксидаза:  $2GSH + H_2O_2 = GSSG + 2H_2O$ .

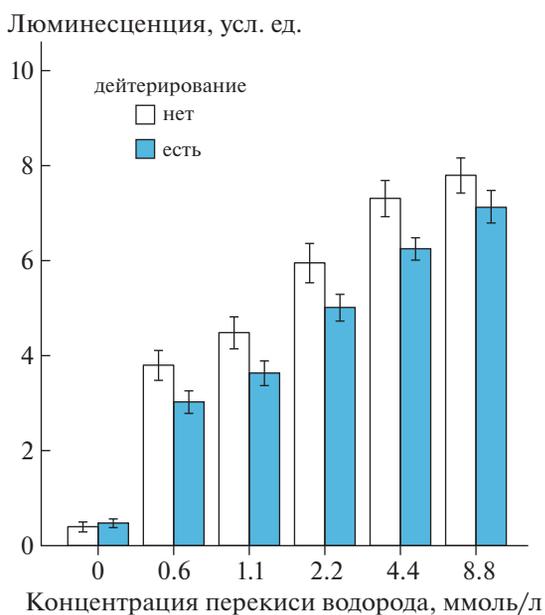


Рис. 3. Экспрессия гена *katG*, индуцированная  $H_2O_2$  у бактерий, дейтерированных 7.5%  $D_2O$ .

При этом образуется окисленный глутатион (GSSG), восстановление которого осуществляется с участием глутатионредуктазы (1.6.4.2) и систем восстановления НАДФ<sup>+</sup> [27, 28].

Ген каталазы активируется белком ОхуR. Под действием  $H_2O_2$  у белка ОхуR происходит образование внутримолекулярной дисульфидной связи между Cys199 и Cys208, ведущее к конформационному изменению в регуляторном домене ОхуR и активации гена каталазы [27].

Известно, что образование из  $H_2O_2$  реакционноспособных соединений в клетке является результатом целого комплекса ферментативных реакций. Используемая нами система биосенсоров может свидетельствовать только о выраженности последствий присутствия  $H_2O_2$  в клетке, к которым можно отнести индукцию SOS-ответа в результате образования гидроксильного радикала и индукцию экспрессии гена *katG* (гидропероксидаза), зависящую от концентрации  $H_2O_2$ . Дейтерирование, по-видимому, оказывает влияние на регистрируемые эффекты  $H_2O_2$  через изменение активностей целого ряда ферментов, начиная от ферментов, расщепляющих  $H_2O_2$ , до ферментов SOS-репарации повреждений ДНК. Снижение экспрессии гена каталазы под действием дейтерия, в конечном итоге, способствует увеличению пула гидроксильных радикалов, индуцирующих однонитевые разрывы в ДНК. Последнее обстоятельство приводит к индукции SOS-репарации ДНК в бактериальной клетке.

## БЛАГОДАРНОСТИ

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Urey H.C., Brickwedde F.G., Murphy G. A hydrogen isotope of mass 2 // Phys. Rev. 1932. V. 39. P. 164.
2. Андреев Б.М., Зельвенский Я.Д., Котальников С.Г. Тяжелые изотопы водорода в ядерной технике. М.: Энергоатомиздат, 1987. 455 с.
3. Лобышев В.И., Калиниченко Л.П. Изотопные эффекты  $D_2O$  в биологических системах. М.: Наука, 1978. 215 с.
4. Blake G.A., Qi C., Hogerheijde M.R. et al. Sublimation from icy jets as a probe of the interstellar volatile content of comets // Nature. 1999. V. 398. № 6724. P. 213–16.5.
5. 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.
6. Денко Е.И. Действие тяжелой воды ( $D_2O$ ) на клетки животных, растений и микроорганизмы // Успехи совр. биол. 1973. Т. 70. № 4. С. 41–49.
7. Katz J.J., Crespi H.L. Deuterated organisms: Cultivation and uses // Science. 1966. V. 151. P. 1187–1194.
8. Kushner D.J., Baker A., Dunstall T.G. Pharmacological uses and perspectives of heavy water and deuterated compounds // Can. J. Physiol. Pharmacol. 1999. V. 77. № 2. P. 79–88.
9. Мосин О.В., Складнев Д.А., Швеи В.И. Включение дейтерированных ароматических аминокислот в молекулу бактериородопсина *Halobacterium halobium* // Прикл. биохим. микробиол. 1999. Т. 35. № 1. С. 34–42.
10. Takeda H., Nio Y., Omori H., Uegaki K. et al. Mechanisms of cytotoxic effects of heavy water (deuterium oxide:  $D_2O$ ) on cancer cells // Anticancer Drugs. 1998. V. 9. № 8. P. 715–725.
11. Altermatt H.J., Gebbers J.O., Laissue J.A. et al. Heavy water delays growth of human carcinoma in nude mice // Cancer. 1988. V. 62. № 3. P. 462–466.
12. Hartmann J., Bader Y., Horvath Z. et al. Effects of heavy water ( $D_2O$ ) on human pancreatic tumor cells // Anticancer Res. 2005. V. 25. № 5. P. 3407–3411.
13. Uemura T., Moritake K., Akiyama Y. et al. Experimental validation of deuterium oxide-mediated antitumoral activity as it relates to apoptosis in murine malignant astrocytoma cells // J. Neurosurg. 2002. V. 96. P. 900–908.
14. Bader Y., Hartmann J., Horvath Z. et al. Synergistic effects of deuterium oxide and gemcitabine in human pancreatic cancer cell lines // Cancer Letters. 2008. V. 259. P. 231–239.
15. Altermatt H.J., Gebbers J.O., Laissue J.A. Heavy water enhances the antineoplastic effect of 5-fluoro-uracil and bleomycin in nude mice bearing human carcinoma // Int. J. Cancer. 1990. V. 45. № 3. P. 475–480.
16. Furuno-Fukushi I., Matsudaira H. Mutation Induction by Tritiated Water and Effects of Deuterium Oxide in

- Cultured Mouse Leukemia Source // *Radiat. Res.* 1985. V. 103. № 3. P. 466–470.
17. 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. 239–243.
  18. 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. 1–7.
  19. Владимиров Ю.А., Азизова О.А., Деев А.И. и др. Свободные радикалы в живых системах // *Итоги науки и техники. Биофизика.* 1992. Т. 29. 250 с.
  20. Котова В.Ю., Манухов И.В., Завигельский Г.Б. Лух-биосенсоры для детекции SOS-ответа, теплового шока и окислительного стресса // *Биотехнология.* 2009. № 6. С. 16–25.
  21. Goerlich O., Quillardet P., Hofnung M. Induction of the SOS response by hydrogen peroxide in various *Escherichia coli* mutants with altered protection against oxidative DNA damage // *J. Bacteriol.* 1989. V. 171. № 11. P. 6141–6147.
  22. Игонина Е.В., Марсова М.В., Абилев С.К. Лух-биосенсоры: скрининг биологически активных соединений на генотоксичность // *Экол. генетика.* 2016. № 4. С. 52–62.
  23. Ушаков В.Ю. SOS-система репарации ДНК у бактерий (обзор) // *Вестн. Пермского ун-та.* 2010. № 2. С. 19–30.
  24. Завигельский Г.Б. SOS-репарации 60 лет // *Молек. биол.* 2013. Т. 47. № 5. С. 699–706.
  25. Goodman M.F. Error-prone repair DNA polymerases in prokaryotes and eukaryotes // *Annu. Rev. Biochem.* 2002. V. 71. P. 17–50.
  26. Baharoglu Z., Mazel D. SOS, the formidable strategy of bacteria against aggressions // *FEMS Microbiol. Rev.* 2014. V. 38. P. 1126–1145.
  27. Aslund F., Zheng M., Beckwith J., Storz G. Regulation of the OxyR transcription factor by hydrogen peroxide and the cellular thiol-disulfide status // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1999. V. 96. P. 6161–6165.
  28. Aslund F., Ehn B., Miranda-Vizuete A. et al. Two additional glutaredoxins exist in *Escherichia coli*: Glutaredoxin 3 is a hydrogen donor for ribonucleotide reductase in a thioredoxin/glutaredoxin 1 double mutant // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1994. V. 91. P. 9813–9817.
  29. Choi H.J., Kim S.J., Mukhopadhyay P. et al. Structural basis of the redox switch in the OxyR transcription factor // *Cell.* 2001. V. 105. № 1. P. 103–113.
  30. Imlay J.A., Chin S.M., Linn S. Toxic DNA damage by hydrogen peroxide through the Fenton reaction in vivo and in vitro // *Science.* 1988. V. 240. P. 640–642.
  31. Cadet J.D., Douki T., Gasparutto T. et al. Hydroxyl radicals and DNA base damage // *Mutat. Res.* 1999. V. 424. P. 9–12.
  32. Cadet J., Douki T., Ravanat J.-L. Oxidatively generated base damage to cellular DNA // *Free Radical Biol. Med.* 2010. V. 49. № 1. P. 9–21.
  33. Cadet J., Ravanat J.-L., TavernaPorro M. et al. Oxidatively generated complex DNA damage: Tandem and clustered lesions // *Cancer Lett.* 2012. V. 327. № 1–2. P. 5–10.
  34. Berthelot-Ricou A., Perrin J., Di Giorgio C. et al. Comet assay on mouse oocytes: an improved technique to evaluate genotoxic risk on female germ cells // *Fertility and Sterility.* 2011. V. 95. № 4. P. 1197–1534.
  35. Benhusein G.M., Mulch E., Aburawi S., Williams F.M. Genotoxic effect induced by hydrogen peroxide in human hepatoma cells using comet assay // *Libyan. J. Med.* 2010. V. 5. P. 4637–4642.
  36. Asad N.R., Asad L.M.B.O., Almeida C.E.B. et al. Several pathways of hydrogen peroxide action that damage the *E. coli* genome // *Gen. Mol. Biol.* 2004. V. 27. № 2. P. 291–303.
  37. Konat G.W. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced higher order chromatin degradation: A novel mechanism of oxidative genotoxicity // *J. Biosci.* 2003. V. 28. P. 57–60.
  38. Mongkolsuk S., Helmann J.D. Regulation of inducible peroxide stress responses // *Mol. Microbiol.* 2002. V. 45. № 1. P. 9–15.

## The Effect of Deuterium on the Expression of Inducible Genes *Escherichia coli*

S. K. Abilev<sup>a,b,#</sup>, E. V. Igonina<sup>a</sup>, S. V. Smirnova<sup>a</sup>, and A. V. Rubanovich<sup>a</sup>

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

<sup>b</sup> Faculty of Biology, Moscow State University, Moscow, Russia

<sup>#</sup> E-mail: abilev@vigg.ru

It has been shown for the first time that preliminary treatment of bacteria with deuterium (D<sub>2</sub>O) at concentrations from 2.5 to 10% in the medium leads to an increase in the expression of the *recA* gene induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at concentrations of 2.2–8.8 mmol/l. A biosensor based on the strain *E. coli* K12 MG1655 (pRecA–lux), luminescing as a result of activation of the promoter of the *recA* gene in response to DNA damage caused by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, was used to compare the induction of *recA* in deuterated and non-deuterated (control) cultures. D<sub>2</sub>O concentrations of 5.0 and 7.5% were most effective. To explain the phenomenon, expression of the catalase gene in deuterated and non-deuterated cultures of *E. coli* K12 MG1655 (pKatA–lux) biosensor was studied. The luminescence of this biosensor results from the activation of the promoter of the *kata* gene in response to an increase in the concentration of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the cell. It has been found that D<sub>2</sub>O reduces the level of expression of the *kata* gene, which can lead to the accumulation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and, correspondingly, an increase in the level of DNA damage recorded by an increase in the expression of the *recA* gene.

**Keywords:** deuterium oxide, hydrogen peroxide, *Escherichia coli*, *recA* gene expression, *kata* gene expression, biosensors