

ФОТОРЕАКТИВИРУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ БИОЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ: РЕПАРАЦИЯ УФ-ПОВРЕЖДЕНИЙ ДНК *Escherichia coli* С УЧАСТИЕМ *lux*-ГЕНОВ МОРСКИХ БАКТЕРИЙ

© 2015 г. Г.Б. Завильгельский*, О.Е. Мелькина*, В.Ю. Котова*,
М.Н. Коноплева**, И.В. Манухов* **, К.С. Пустовойт*

*Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов
(«ГосНИИгенетика»), 117545, Москва, 1-й Дорожный проезд, 1;

**Московский физико-технический институт (государственный университет),
141700, Долгопрудный Московской области, Институтский пер., 9

E-mail: zavilgel@genetika.ru

Поступила в редакцию 20.05.15 г.

УФ-резистентность люминесцирующих бактерий *Escherichia coli* AB1886 *uvrA6* (pLeo1), содержащих плазмиду с генами *luxCDABE* морской бактерии *Photobacterium leiognathi*, примерно в два раза превышает УФ-резистентность несветящихся бактерий *E. coli* AB1886 *uvrA6*. Введение в геном *E. coli* AB1886 *uvrA6* (pLeo1) мутации *phr::kan^r* (дефект функциональной активности фотолиазы) полностью снимает повышенную УФ-резистентность клеток. Следовательно, основной вклад в индуцируемую биолюминесценцией репарацию ДНК вносит бактериальная фотолиаза, осуществляющая фотореактивацию. Показано, что фотореактивирующая активность биолюминесценции *Photobacterium leiognathi* примерно в 2,5 раза ниже по сравнению таковой, индуцируемой источником света с $\lambda > 385$ нм. Показано, что индуцируемое УФ-излучением в бактериальных клетках *E. coli* с плазмидами, содержащими гены *luxCDABE* под *RecA-LexA*-регулируемыми промоторами, нарастание интенсивности биолюминесценции происходит лишь через 25–30 мин после УФ-облучения клеток и не способствует репарации ДНК. Quorum sensing регуляция также не способствует репарации ДНК с помощью фотолиазы.

Ключевые слова: биолюминесценция, фотолиаза, фотореактивация, SOS-индукция, quorum sensing.

Происхождение бактериальной биолюминесценции остается загадкой. В настоящее время рассматриваются несколько концепций происхождения и роли бактериального свечения в экологии современной морской фауны: 1) бактериальные люциферазы могут быть включены в процессы детоксификации активных форм кислорода (АФК), что определяло защиту бактерий от АФК особенно на ранних стадиях эволюции при низких концентрациях кислорода в атмосфере [1–3], 2) биолюминесценция способствует репарации ДНК, что дает клеткам дополнительную защиту от летального действия коротковолнового солнечного ультрафиолетового (УФ) света [4–6], 3) свечение бактерий в комплексе с питательными веществами служит приманкой и способствует более эффективному использованию продуктов питания в качестве пищи эукариотическим организмам (зоопланктон, рыбы), так называемая «bait hypothesis»

[7–10]. В работе [11] было показано, что морские бактерии различных видов (*Vibrio harveyi*, *Aliivibrio fischeri*, *Photobacterium leiognathi*, *Photobacterium phosphoreum*) более чувствительны к УФ-облучению по сравнению с клетками дикого типа, если содержат мутации в генах *lux*-оперона. Было предположено, что биолюминесценция активирует фотореактивирующий фермент (фотолиазу), которая мономеризует циклобутановые пиримидиновые димеры в ДНК. Однако в работе [12], проведенной на морских бактериях *Aliivibrio fischeri* ES114, содержащих мутацию в гене *phr* (кодирует фотолиазу) или делецию генов *luxCDABEG*, показано, что биолюминесценция не активирует фотолиазу, а добавление к дикому штамму аутоиндуктора N-3-оксогексаноил гомосерин лактона (3-охо-С6-HSL), повышая УФ-резистентность клеток, не зависит как от наличия активной фотолиазы, так и от интенсивности свечения.

Вызывает сомнение важность в процессе эволюции свечения у морских бактерий участия

Сокращения: АФК – активные формы кислорода, УФ – ультрафиолетовый.

биолюминесценции в репарации ДНК в связи с низкой интенсивностью свечения при концентрациях бактерий, характерных для планктона и не превышающих критическую концентрацию, при которой срабатывает система Quorum Sensing (QS) [13]. В работе [5] было предположено, что коротковолновой УФ (200–300 нм), индуцируя в клетках планктона, содержащих *lux*-гены, кодирующие люциферазу, SOS-ответ и усиление интенсивности биолюминесценции, в результате активирует фотолиазу. Однако доказательств участия SOS-индуцируемой биолюминесценции в репарации ДНК в работе [5] представлено не было.

Поэтому мы в настоящей работе провели анализ влияния интенсивности биолюминесценции на репарацию ДНК на модели бактерий *Escherichia coli* с использованием гибридных плазмид, содержащих гены *lux*-оперонов различных светящихся бактерий, расположенных как под промотором системы QS, так и под УФ-индуцируемыми SOS-промоторами. В работе использовали, наравне с диким штаммом *E. coli*, штаммы, содержащие мутации в генах *uvrABC* (дефект темновой эксцизионной репарации), *lexA*, *recA* (дефект SOS-индукции), *phr* (отсутствие активной фотолиазы), а также в гене *lonA* (дефектная протеаза La (Lon)). Мутант *E. coli lonA* характеризуется значительным усилением экспрессии *lux*-генов в связи с отсутствием деградации белка LuxR, активатора транскрипции системы QS [14,15].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Бактериальные штаммы и плазмиды. Использовали штаммы *Escherichia coli* K-12: AB1157 F⁻ *thr-1*, *leu-6*, *proA2*, *his-4*, *thi-1*, *argE3*, *lacY1*, *galK2*, *ara14*, *xyl-5*, *mtl-1*, *tsx-33*, *rpsL31*, *supE44*; AB1886 *uvrA6*, AB2494 *lexA1*, AB2463 *recA1* (остальные маркеры у штаммов AB1886, AB2494, AB2463, как у AB1157) – все штаммы получены из коллекции «ГосНИИгенетика».

E. coli AB1886 *uvrA6 phr::kan* (перенесен с помощью P1 трансдукции из генома *E. coli* JW0698 Δ (*araD-araB*)567 Δ*lacZ*4787 (::rrnB-3) Δ*phr*-758 ::*kan* л *rph-1* Δ (*rhaD-rhaB*)568 *hsdR514* (Keio collection).

В работе использовали плазмиды: pLeo1, pLeo3, pXen7, pOM, pF1, pColD::lux:

– pLeo1 – вектор pUC18 содержит гены *luxCDABE* *P. leiognathi*, расположенные как под собственным промотором, так и под *lac*-промотором вектора pUC18;

– pLeo3 – вектор pUC18 содержит под *lac*-промотором гены *luxABE* *P. leiognathi* [16];

– pXen7 – содержит в векторе pUC18 гены *luxCDABE* *Photobacterium luminescens*, расположенные под собственным нативным промотором [17];

– pColD::lux – содержит гены *luxCDABE* *Photobacterium luminescens*, расположенные под SOS-промотором гена *cda* из плазмиды pColD-CA23 [18];

– pOM Cm^r– содержит в векторе pACYC184 встроенный BamHI/NruI фрагмент ДНК *A. fischeri* из плазмиды pF1 (*luxICDABEG*) под промотором P_r и регуляторную область ДНК между генами *luxR* и *luxI* (без гена *luxR*) [19];

– pF1 – содержит в векторе pBR322 встроенный по сайтам BamHI полный *lux*-регулон *luxRIABCDE* морских бактерий *Aliivibrio fischeri* (ранее *Vibrio fischeri*) [20].

Трансформацию бактериальных клеток проводили с помощью электропорации.

Среды, ферменты, реактивы. Для роста бактерий использовали L-бульон и L-агар плюс антибиотики: ампициллин (100 мкг/мл), канамицин (40 мкг/мл), хлорамфеникол (20 мкг/мл). Митомидин С и аутоиндуктор N-3-оксогексаиноил гомосерин лактон получены от Sigma Chemical Co (США).

Ферменты для работы с ДНК получены от Fermentas (Литва).

УФ-облучение и фотореактивация бактерий. Бактерии, выросшие с аэрацией до OD = 0,2–0,3, дважды отмывали 0,02 М трис-НСl-буфером (0,02 М трис-НСl, 0,01 М NaCl, pH 7,8), переводили в фосфатный буфер и облучали при комнатной температуре различными дозами УФ-света (λ = 254 нм). Источником коротковолнового УФ-света служила бактерицидная лампа БУВ-30. Дозу УФ-света измеряли при помощи УФ-дозиметра с магниевым фотоэлементом (УФД-4). Выживаемость бактерий определяли путем посева на чашках Петри двуслойным методом: для верхнего и нижнего слоев чашек Петри использовали 1,8%-й и 0,7%-й LB-агар.

Источником фотореактивирующего света служила ртутная лампа высокого давления СВД-120А с фильтром ЖС-4, пропускающим свет с λ > 385 нм. Фотореактивацию бактерий проводили в фосфатном буфере в течение 20 мин при 37°C.

Измерение SOS-ответа. Гибридные плазмиды pXen7, pColD::lux и pOM вводили трансформацией в клетки штаммов *E. coli* AB1157 *uvr⁺* и AB1886 *uvrA6*. Бактерии *E. coli* AB1157 *uvr⁺* и AB1886 *uvrA6*, содержащие плазмиды pXen7, pColD::lux или pOM, выращивали с аэрацией при 30°C 18 ч.

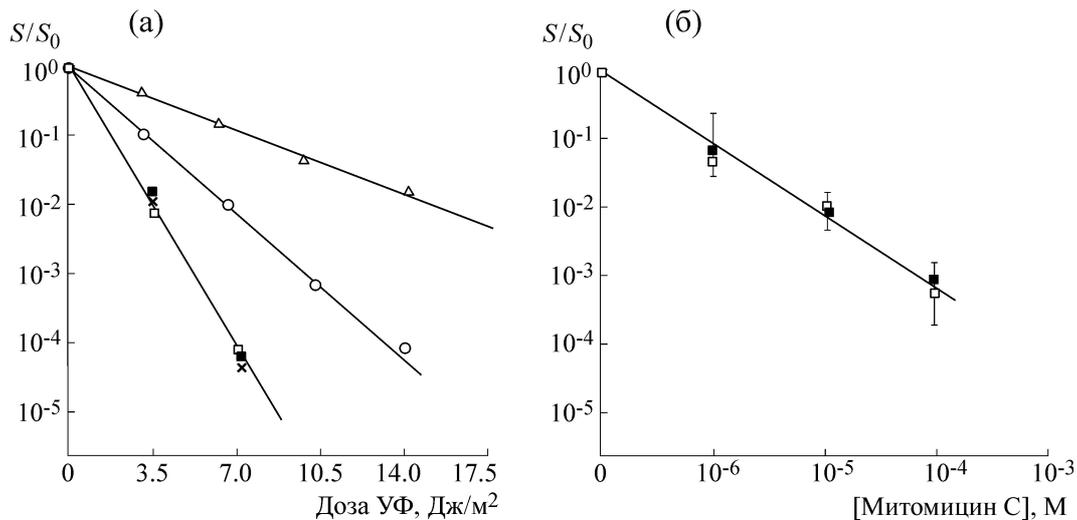


Рис. 1. (а) – Кривые выживаемости бактерий *E. coli* AB1886 *uvrA6* (темновой вариант) и AB1886 *uvrA6* (pLeo1) (световой вариант) в зависимости от дозы УФ-облучения (254 нм). На рис. 1а также представлены кривые выживаемости бактерий при УФ-облучении штаммов *E. coli* AB1886 *uvrA6* (pLeo3), *E. coli* AB1886 *uvrA6* *phr::kan^r* (pLeo1), а также штамма *E. coli* AB1886 *uvrA6*, которые после УФ-облучения были фотореактивируемые при помощи света ($\lambda > 385$ нм). Темные квадраты – *E. coli* AB1886 *uvrA6* (темновой вариант); светлые квадраты – *E. coli* AB1886 *uvrA6* (pLeo1) (световой вариант); светлые квадраты – *E. coli* AB1886 *uvrA6* (pLeo3); крестики – *E. coli* AB1886 *uvrA6* *phr::kan^r* (pLeo1); треугольники – *E. coli* AB1886 *uvrA6* + освещение фотореактивирующей лампы СВД-120А с фильтром ЖС-4. Фотореактивацию проводили в фосфатном буфере 20 мин при 37°C. (б) – Кривые выживаемости бактерий *E. coli* AB1886 *uvrA6* (темновой вариант) и AB1886 *uvrA6* (pLeo1) (световой вариант) при обработке бактерий митоминином С, который индуцирует в ДНК нефотореактивируемые моноаддукты. Штаммы AB1886 и AB1886 (pLeo1) характеризуются равными параметрами чувствительности к митоминину С. Темные квадраты – AB1886; светлые квадраты – AB1886(pLeo1).

Затем ночную культуру разводили до концентрации 10^7 кл/мл свежей LB и выращивали с аэрацией при 30° 2–3 ч до $OD = 0,2 - 0,3$. После УФ-облучения пробы из фосфатного буфера переводили в LB и по 200 мкл переносили в кюветы, одна из которых содержала необлученные клетки и служила контролем, и располагали перед фотоумножителем в люминометре LMAO1 (Beckman, США) при комнатной температуре. Через определенные интервалы времени у образцов измеряли интенсивность биолюминесценции.

Индукция QS-системы. Для измерения влияния активности системы QS на УФ-защитное действие биолюминесценции в работе использовали штамм *E. coli* AB1899 *lonA1* (с дефектной протеазой La (Lon)) и гибридную плазмиду pF1, содержащую в векторе pBR322 встроенный по сайтам BamHI полный *lux*-регулон *luxRI-ABCDE* морских бактерий *Aliivibrio fischeri* [20].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Влияние *lux*-генов *P. leiognathi* на выживаемость бактерий *E. coli* при УФ-облучении (254 нм). На рис. 1а представлены кривые выживаемости бактерий *E. coli* AB1886 *uvrA6* (темновой вариант) и AB1886 *uvrA6* (pLeo1) (све-

товой вариант) в зависимости от дозы УФ (254 нм). В плазмиде pLeo1 гены *luxCDABE* *P. leiognathi* расположены как под собственным промотором, так и под *lac*-промотором вектора pUC18. Интенсивность биолюминесценции суспензии клеток при этих условиях достигает максимума (около $5 \cdot 10^5$ мкВ/200 мкл) и в расчете на клетку составляет примерно $2 \cdot 10^5$ квант/с. Как видим, наличие в клетках плазмиды pLeo1 увеличивает резистентность клеток к УФ-облучению примерно в два раза (по разности наклонов кривых выживаемости). Однако при обработке бактерий митоминином С, который индуцирует в ДНК нефотореактивируемые моноаддукты, штаммы AB1886 и AB1886 (pLeo1) характеризуются равными параметрами чувствительности (рис. 1б).

Защитный эффект pLeo1 от УФ-облучения определяется именно биолюминесценцией, так как УФ-чувствительность несветящегося штамма AB1886 (pLeo3) (плазмиды pLeo3 содержит под *lac*-промотором гены *luxABE* *P. leiognathi*) совпадает с таковой исходного темного штамма AB1886.

Из данных, представленных на рис. 1, следует также, что эффект pLeo1-индуцируемой фотозащиты определяется процессом фотореак-

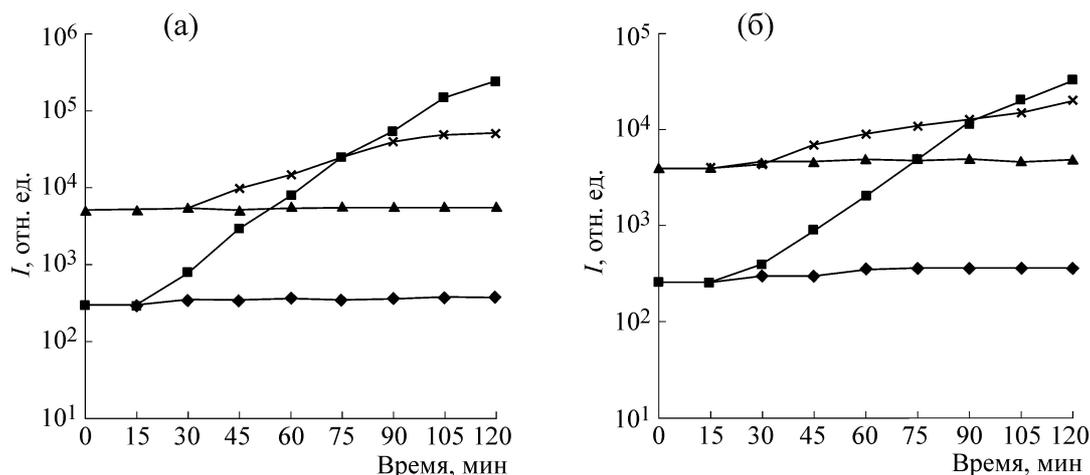


Рис. 2. Зависимости интенсивности биолюминесценции бактерий *E. coli* от времени инкубации при комнатной температуре в среде LB. (а) – Необлученные (ромбы) и УФ-облученные (квадраты) клетки *E. coli* AB1157 (pColD::lux), необлученные (треугольники) и УФ-облученные (крестики) клетки *E. coli* AB1157 (pXen7); (б) – необлученные (ромбы) и УФ-облученные (квадраты) клетки *E. coli* AB1886 (pColD::lux), необлученные (треугольники) и УФ-облученные (крестики) клетки *E. coli* AB1886 (pXen7). Дозы УФ-облучения: AB1886 – 4 Дж/м², AB1157 – 25 Дж/м².

тивации, так как УФ-чувствительность двойного мутанта AB1886 *uvrA6 phr::kan* (с неактивной фотолизой) соответствует примерно таковой темного штамма AB1886 *uvrA6*.

Необходимо отметить, что фотореактивирующая активность биолюминесценции значительно уступает таковой, измеренной с использованием света лампы СВД120А. Фактор уменьшения дозы УФ при фотореактивации, индуцируемой лампой СВД-120А + фильтр ЖС-4, для бактерий AB1886 составляет примерно 4,5, в то время как фактор уменьшения дозы УФ для бактерий AB1157 (pLeo1) равен 2 (рис. 1а).

В отличие от мутанта AB1886 *uvrA6* с дефектной системой темновой эксцизионной репарации в штамме AB1157 *uvr+* плаزمида pLeo1 практически не способствует защите клеток от УФ-облучения (данные не представлены). Наличие в клетках AB1157 эффективной системы UvrABC эксцизионной репарации циклобутановых пиримидиновых димеров в ДНК маскирует дополнительный эффект фотолизы. Измерение степени фотореактивации у УФ-облученных бактерий AB1157, проведенного при освещении лампой СВД-120А + фильтр ЖС-4, дало значение фактора увеличения дозы 1,3, что значительно уступает значению 4,5, характерному для мутантного штамма AB1886 *uvrA6*.

Влияние индуцируемого в процессе SOS-ответа усиления биолюминесценции на УФ-чувствительность бактерий *E. coli*. В данной серии опытов были использованы гибридные плазмиды: pXen7 (гены *luxCDABE P. luminescens* расположены под SOS-индуцируемым нативным

промотором), pColD::lux (гены *luxCDABE P. luminescens* встроены под одним из наиболее сильных индуцируемых SOS-промоторов, расположенным в плазмиде pColD-CA23 перед геном *cda* (кодирует колицин ColD)) и pOM, в которой гены *luxICDABEG A. fischeri* расположены под нативным промотором P_r . Для измерения степени SOS-ответа использовали штаммы *E. coli* AB1157 *uvr+* и AB1886 *uvrA6*, содержащие плазмиды pXen7, pColD::lux или pOM.

На рис. 2 приведены кривые зависимости интенсивности биолюминесценции бактерий *E. coli* AB1157 и *E. coli* AB1886, содержащих гибридные плазмиды pXen7 (а) или pColD::lux (б).

Как видим, усиление интенсивности биолюминесценции в УФ-облученных клетках начинается примерно через 25–30 мин после завершения УФ-облучения и переноса клеток из фосфатного буфера в питательную среду LB. Максимальное значение интенсивности биолюминесценции фиксируется примерно через 80 мин и превышает таковую контрольных препаратов в 800 раз – для штамма AB1157 (pColD::lux) и в 130 раз – для штамма AB1886 (pColD::lux) (рис. 2б).

В варианте с плазмидой pXen7, в которой гены *luxCDABE P. luminescens* расположены под собственным нативным SOS-регулируемым промотором (рис. 2а), усиление биолюминесценции после УФ-облучения также имеет место, но амплитуда ответа составляет лишь 10–15 – для штамма AB1157 и 5–7 – для штамма AB1886. В варианте с плазмидой pOM усиление био-

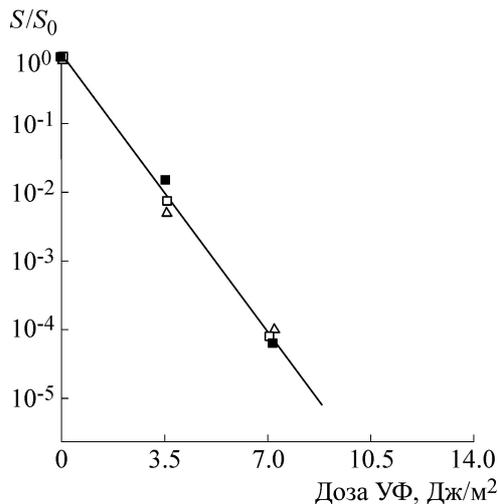


Рис. 3. Кривая выживаемости бактерий *E. coli* AB1886 *uvrA6* (темновой вариант), AB1886 *uvrA6* (pXen7) и AB1886 *uvrA6* (pColD::lux) (SOS-индуцируемый световой вариант) в зависимости от дозы УФ-облучения (254 нм). Штаммы AB1886, AB1886 (pXen7) и AB1886 (pColD::lux) характеризуются равными параметрами УФ-чувствительности. Темные квадраты – AB1886; светлые квадраты – AB1886(pXen7); треугольники – AB1886(pColD).

люминесценции при УФ-облучении клеток не превышает пяти (данные не представлены).

Наблюдаемое усиление биолюминесценции у УФ-облученных бактерий определяется регуляторной SOS(RecA-LexA)-системой, так как при использовании бактериальных штаммов *E. coli*, содержащих мутации в генах-регуляторах *recA13* (AB2463) и *lexA1* (AB2494) эффекты

усиления биолюминесценции при содержании в клетках как плазмиды pXen7, так и плазмиды pColD::lux отсутствуют (данные не представлены).

На рис. 3 представлены кривые выживаемости бактерий *E. coli* AB1886 *uvrA6* (темновой вариант), AB1886 *uvrA6* (pXen7) и AB1886 *uvrA6* (pColD::lux) (SOS-индуцируемый световой вариант) в зависимости от дозы УФ (254 нм). Как видим, штаммы AB1886, AB1886 (pXen7) и AB1886 (pColD::lux) характеризуются равными параметрами УФ-чувствительности. Следовательно, индуцируемое УФ-светом усиление биолюминесценции неспособно защитить клетки от УФ-повреждений ДНК. Также отрицательный результат был получен при использовании в опыте штамма *E. coli* AB1157 *uvr+* (данные не представлены).

Влияние системы QS на УФ-чувствительность бактерий *E. coli*. Для анализа влияния QS-системы регуляции экспрессии *lux*-генов в настоящей работе используется мутантный штамм *E. coli* AB1899 *lonA1*, содержащий гибридную плазмиду pF1. Плазмида pF1 содержит полный *lux*-регулон *luxRIABCDE Aliivibrio fischeri*. В связи с отсутствием в клетках этого штамма активной протеазы Lon, участвующей в деградации белка LuxR – активатора транскрипции *lux*-генов, QS-индуцируемая активация экспрессии *lux*-генов происходит при сравнительно низких концентрациях клеток и быстро достигает максимального уровня биолюминесценции [14,15]. На рис. 4 представлена зависи-

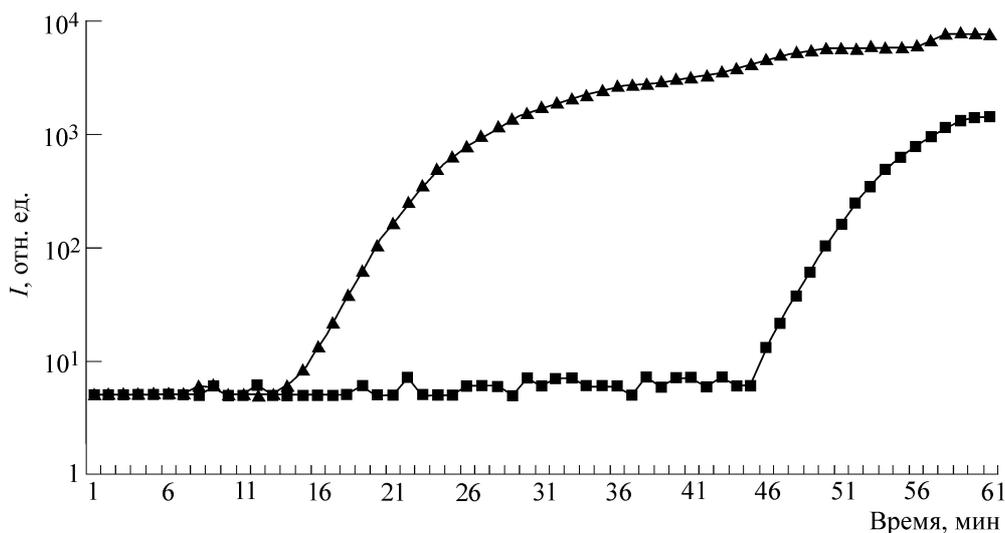


Рис. 4. Зависимости интенсивности биолюминесценции суспензии клеток AB1899 (pF1) от времени инкубации в среде LB при комнатной температуре. Для ускорения и усиления работы системы QS к клеткам был добавлен аутоиндуктор N-3-оксогексаноил гомосерин лактон. Треугольники – AB1899 (pF1) + аутоиндуктор; квадраты – AB1899 (pF1).

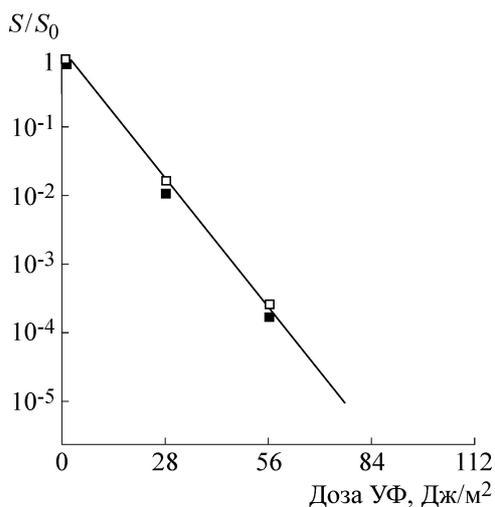


Рис. 5. Зависимость УФ-выживаемости бактерий AB1899 (темновой вариант) и AB1899 (pF1) (световой вариант). УФ-облучение клеток проводили через 40 мин после добавления в среду аутоиндуктора N-3-оксогексаноил гомосерин лактона. Темные квадраты – *E. coli* AB1899; светлые квадраты – *E. coli* AB1899 (pF1).

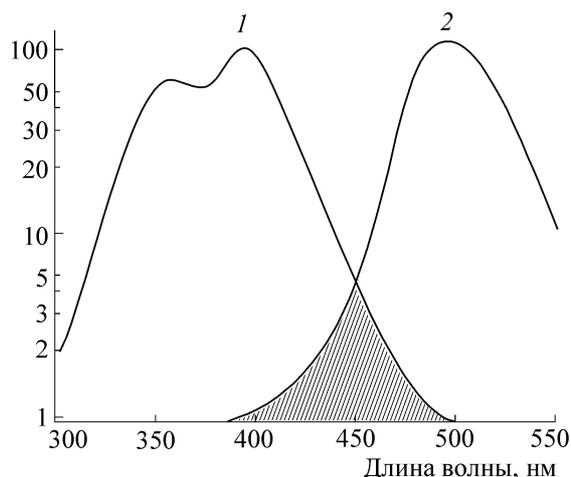


Рис. 6. Спектры действия фотолиазы *E. coli* (1) и люминесценции люциферазы *P. leiognathi* (2). Спектр действия фотолиазы представляет собой широкую полосу в интервале (300–500 нм) с двумя максимумами: 355 и 385 нм. Максимум спектра люминесценции люциферазы *P. leiognathi* расположен при 495 нм. В интервале длин волн 400–500 нм имеет место перекрывание спектров действия фотолиазы и люминесценции люциферазы *P. leiognathi* (область перекрывания заштрихована).

мость интенсивности биолюминесценции суспензии клеток AB1899 (pF1) от времени инкубации в среде LB при комнатной температуре. Для ускорения и усиления работы системы QS к клеткам был добавлен аутоиндуктор N-3-оксогексаноил гомосерин лактон. Как видим, усиление сигнала биолюминесценции фиксируется уже через 10–15 мин после добавления аутоиндуктора и через 40–50 мин достигает максимума, превышая базовую интенсивность биолюминесценции примерно на 2,5–3,0 порядка.

На рис. 5 представлены кривые УФ-выживаемости бактерий AB1899 (темновой вариант) и AB1899 (pF1) (световой вариант). УФ-облучение клеток проводили через 40 мин после добавления в среду аутоиндуктора.

Как видим, кривые УФ-инактивации бактерий в темновом и световом вариантах практически не различаются. Следовательно, система QS не обеспечивает фотозащиту от УФ-повреждений ДНК. Однако необходимо отметить, что штамм AB1899 *lonA1* содержит активную систему темновой эксцизионной репарации Uv-gABC, которая способна маскировать активное действие фотолиазы.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Необходимо отметить, что основные результаты по сравнению УФ-чувствительности светящихся и несветящихся штаммов были полу-

чены на морских бактериях *Vibrio harveyi* и др. [4]. Базовые УФ-чувствительности природных светящихся морских бактерий выше по сравнению с бактериями *E. coli* [4,5], что позволяет предполагать в морских бактериях пониженную эффективность системы темновой эксцизионной репарации. В результате влияние фотореактивирующей активности биолюминесценции на УФ-выживаемость клеток должно соответственно возрастать.

В бактериях *E. coli* фотолиаза содержится в небольшом количестве (10–20 молекул на клетку) [21]. В качестве кофакторов, поглощающих свет и участвующих в репарации ДНК, в бактериальной люциферазе используются FADH₂ и птерин [22]. Спектр действия бактериальной люциферазы представлен на рис. 6. Он представляет собой широкую полосу в интервале (300–500 нм) с двумя максимумами (355 и 385 нм) [22,23]. Показано, что в процессе темновой стадии фотолиаза формирует тесный комплекс с циклобутановыми пиримидиновыми димерами в ДНК. При последующем поглощении кванта света происходит мономеризация димеров пиримидинов в результате разрыва циклобутанового кольца [24]. На рис. 6 также представлен спектр люминесценции люциферазы *P. leiognathi* с максимумом при 495 нм [25]. В интервале длин волн (400–500 нм) имеет место

перекрывание спектров действия фототлизы и люминесценции люциферазы *P. leiognathi*. По-видимому, в результате данного перекрывания и происходит фотореактивация УФ-повреждений в бактериальной ДНК биоллюминесцентным светом, наблюдаемая нами и представленная на рис. 1а.

Относительно эволюционного значения биоллюминесценции как репарирующего фактора на основании наших данных об отсутствии защитных эффектов биоллюминесценции при SOS-ответе и при QS можно предполагать, что хотя фотореактивирующая активность биоллюминесценции имеет место как у морских бактерий, так и у *E. coli*, однако ее роль в эволюции светящихся бактерий вторична. Скорее необходимо предполагать активное участие люцифераз в процессах детоксификации АФК, особенно на ранних стадиях эволюционного цикла при небольших концентрациях кислорода в атмосфере [1,2]. Тем более что в модельных опытах было показано, что люциферазы эффективно защищают клетки морских бактерий от окислительного стресса, индуцируемого АФК [3,26].

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 гг.» (Соглашение № 14.576.21.0011 от 17.06.2014 г., уникальный идентификатор исследований RFMEF157614X0011).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. J.-F. Rees, B. De Wergifosse., O. Noiser, et al., J. Exp. Biol. **201**, 1211 (1998).
2. G. S. Timmins., S. K. Jackson, and H. M. Swartz, J. Mol. Evol. **52**, 321 (2001).
3. H. Szpilewska, A. Czyz, and G. Wegrzyn, Curr. Microbiol. **47**, 379 (2003).
4. A. Czyz, B. Wrobel, and G. Wegrzyn, Microbiology **146**, 283 (2000).
5. G. Wegrzyn, A. Czyz, and K. Olzewska, Current Trends in Microbiology **1**, 43 (2004).
6. K. L. Cutter, H. M. Alloush, and V. C. Salisbury, Luminescence **22**, 177 (2007).
7. J. W. Hastings and K. H. Nealson, Annu. Rev. Microbiol. **31**, 549 (1977).
8. K. H. Nealson and J. W. Hastings, Microbiol Rev. **43**, 496 (1979).
9. M. Zarubin, S. Belkin, M. Ionescu, and A. Genin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **109**, 853 (2012).
10. K. L. Visick and E. G. Ruby, Curr. Opin. Microbiol. **9**, 632 (2006).
11. J. Kozakiewicz, M. Gajewska, R. Lyzen, et al. FEMS Microbiol. Lett. **250**, 105 (2005).
12. E. L. Walker, J. L. Bose, and E. V. Stabb, Appl. Environ. Microbiol. **72**, 6600 (2006).
13. Z. Li and S. K. Nair, Prot. Sci. **21**, 1403 (2012).
14. Г. Б. Завильгельский и И. В. Манухов, Генетика **30** (3), 337 (1994).
15. О. Е. Мелькина, И. В. Манухов и Г. Б. Завильгельский, Генетика **46**, 1050 (2010).
16. Г. Б. Завильгельский, В. Ю. Котова и И. В. Манухов, Молекуляр. биология **37**, 704 (2003).
17. Г. Б. Завильгельский, А. П. Зарубина и И. В. Манухов, Молекуляр. биология **36**, 792 (2002).
18. В. Ю. Котова, И. В. Манухов и Г. Б. Завильгельский, Прикл. биохимия и микробиология **46** (8), 35 (2010).
19. I. V. Manukhov, O. E. Melkina, I. I. Goryanin, et al., J. Bacteriol. **192**, 5549 (2010).
20. Т. А. Чернова и Г. Б. Завильгельский, Биотехнология, № 3, 17 (1991).
21. A. Sancar, F. W. Smith, and G. B. Sancar, J. Biol. Chem. **259**, 6028 (1984).
22. G. B. Sancar and A. Sancar, Trends Biochem. Sci. **12**, 259 (1987).
23. G. Payne and A. Sancar, Biochemistry **29**, 7715 (1990).
24. I. Husain, G. B. Sancar, S. R. Holbrook, and A. Sancar, J. Biol. Chem. **262**, 13188 (1987).
25. P. Lavelle, J. P. Henry, and A. M. Michelson, Compt. Rend. Acad. Sci., Ser. D **270**, 21 (1970).
26. R. Lyzen and G. Wegrzyn, Arch. Microbiol. **2005**, **183**, 203 (2005).

Photoreactivating Activity of Bioluminescence: Repair of UV-damaged DNA of *Escherichia coli* Occurs with Assistance of *lux*-Genes of Marine Bacteria

G.B. Zavilgelsky*, O.E. Melkina*, V.Yu. Kotova*, M.N. Konopleva,
I.V. Manukhov* **, and K.S. Pustovoit***

*State Research Center of Genetics and Selection of Industrial Microorganisms ("GosNIIGenetika"),
1-j Dorojnyj proezd 1, Moscow, 117545 Russia

**Moscow Institute of Physics and Technology (State University),
Institutskij per. 9, Dolgoprudnyj, Moscow Region, 141700 Russia

The UV resistance of luminescent bacteria *Escherichia coli* AB1886 *uvrA6* (pLeo1) containing the plasmid with *luxCDABE* genes of marine bacteria *Photobacterium leiognathi* is approximately two times higher than the UV resistance of non-luminous bacteria *E. coli* AB1886 *uvrA6*. Introduction of *phr::kan^r* mutations (a defect in the functional activity of photolyase) into the genome of *E. coli* AB1886 *uvrA6* (pLeo1) completely removes the high UV resistance of the cells. Therefore, photoreactivation that involves bacterial photolyase contributes mainly to the bioluminescence-induced DNA repair. It is shown that photoreactivating activity of bioluminescence of *P. leiognathi* is about 2.5 times lower compared with that one induced by a light source with $\lambda > 385$ nm. It is also shown that an increase in the bioluminescence intensity, induced by UV radiation in *E. coli* bacterial cells with a plasmid containing the *luxCDABE* genes under RecA-LexA-regulated promoters, occurs only 25–30 min later after UV irradiation of cells and does not contribute to DNA repair. A quorum sensing regulatory system is not involved in the DNA repair by photolyase.

Key words: bioluminescence, photolyase, photoreactivation, SOS-induction, quorum sensing