

УДК 577.21+575.21+575.167

ЦИКЛИЧЕСКАЯ ДИГЕННАЯ СИСТЕМА КАК УПРАВЛЯЮЩИЙ ЭЛЕМЕНТ БАКТЕРИАЛЬНОГО БИОСЕНСОРА

© 2012 г. Е. Э. Ступак, И. В. Ступак

Институт биологии Уфимского научного центра РАН, Уфа, 450054,
e-mail: evgenia_stupak@mail.ru

Поступила в редакцию 1.02.2011 г.

Протестирован штамм *Escherichia coli* JC158(pCIA12/pGFK5), несущий на плазмиде pCIA12 циклическую дигенную систему с отрицательными обратными связями, реагирующий на повреждение ДНК изменением уровня синтеза репортерных белков – GFP и β-галактозидазы. При концентрации ДНК-повреждающих веществ выше пороговых значений приобретенный фенотип наследуется в последующих поколениях после устранения генотоксического воздействия. Показана возможность использования данного бактериального биосенсора для мониторинга временного присутствия генотоксикантов в среде и тестирования последствий кратковременного воздействия токсических веществ.

Генно-инженерные методы позволяют конструировать бактериальные штаммы, реагирующие на внешнее воздействие синтезом репортерных белков, количество которых тестируется по хемилюминесценции, флуоресценции или фотометрически. Созданы бактериальные цельноклеточные биосенсоры как на индивидуальные молекулы, так и на широкий спектр внешних факторов, например на общую токсичность среды, генотоксичность, повреждение белков, мембран, окислительный стресс [1]. Как правило, цельноклеточные биосенсоры содержат плазмиды с промотором, активирующимся при определенном воздействии на клетку, а также репортерный ген, транскрибируемый с этого промотора. Выбор промотора определяет специфичность искусственной сенсорной системы генов: так, для тестирования генотоксичности используются промоторы генов, входящих в RecA LexA систему SOS-ответа (*umuC*, *sulA*, *recN*, *recA*, *cda*) и промоторы генов адаптивного ответа (*alkA*) [2]. Существует база данных GenSensor, содержащая информацию о чувствительности генов к различным внешним воздействиям и позволяющая подобрать промоторы для конструирования бактериальных биосенсорных штаммов [3]. В качестве репортерных генов используют ген β-галактозидазы *lacZ*; гены *lux* оперона, кодирующего бактериальную люциферазу; *luc* гены, кодирующие эукариотическую люциферазу; гены, кодирующие флуоресцирующие белки, в частности зеленый флуоресцирующий белок GFP (green fluorescent protein) [2, 4, 5].

Кроме систем, где репортерный ген расположен непосредственно под промотором, реагирующим на внешнее воздействие, возможно созда-

ние систем и с более сложной регуляторной частью. Сконструированы искусственные генетические системы, регистрирующие внешний сигнал и управляющие определенными функциями клетки: наследуемое изменение фенотипа, периодическая экспрессия нескольких генов в процессе роста культуры, экспрессия тестируемого белка после определенного числа импульсов индуктора [6–9]. В качестве генной сети, обеспечивающей быстрое переключение при минимальном базальном уровне синтеза репортерного белка, предлагается использовать циклические дигенные системы с отрицательными обратными связями [10]. Системы генов такой структуры называют также эпигенами [7] и генетическими переключателями (genetic toggle switch, toggle gene circuit) [6, 11]. Данная генетическая система состоит из двух генетических блоков, связанных через белки-репрессоры (рис. 1). Циклическая дигенная система может поддерживать каждый из стабильных уровней экспрессии генов в ряду клеточных генераций и переключается из одного функционального состояния в другое специфическими индуцирующими факторами, которые изменяют соотношение репрессоров в клетке [7]. Сигналы, переключающие систему из одного состояния в другое, задаются генетическими элементами, использованными при конструировании. Сконструированы циклические дигенные системы, переключающиеся под действием разнообразных внешних индуцирующих факторов, в том числе и под действием токсических веществ; показана высокая чувствительность таких систем к индукторам [10, 11].

Цель работы – исследование возможности применения бактериальных биосенсоров, реги-

стрирующих сигнал посредством изменения уровня экспрессии регуляторных генов циклической дигенной системы, для определения зависимости цито- и генотоксичности вещества от длительности его воздействия и регистрации кратковременного присутствия генотоксикантов в среде.

МЕТОДИКА

Штаммы и плазмиды. Исследования проводились на клетках *E. coli* штамма JC158 (*Hfr P01*, *thi1*, *serA6*, *lacI22*, *relA1*), полученного из Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ГосНИИгенетика). Плазмиды pGFK5 (*ori* p15A, Km^r), pCIA12 (*ori* SC101, Ap^r) были предоставлены Дж. Коллинзом (J.J. Collins, Boston University, Boston, США). Искусственная генетическая сеть, образующаяся в клетках JC158(pCIA12/pGFK5), представлена на рис. 1. Так как репрессор *cI* подавляет транскрипцию с P_L-промотора, а LacI репрессирует P_{trc}-промотор, циклическая дигенная система может находиться в двух стабильных функциональных состояниях: в одном – высокий уровень экспрессии гена *cI* и низкий уровень экспрессии гена *lacI* (*lacI⁰cI¹*, фенотип Lac⁺GFP⁻), в другом – высокий уровень экспрессии гена *lacI* и низкий гена *cI* (*lacI¹cI⁰*, фенотип Lac⁻GFP⁺). В описании функционального состояния 1 означает, что ген дерепрессируется, 0 означает, что операторный участок связан с репрессором. Изменение фенотипа Lac⁻GFP⁺ на фенотип Lac⁺GFP⁻ индуцируется изопропил-β-D-1-тио-галлактопиранозидом (ИПТГ), переход к фенотипу Lac⁻GFP⁺ – активацией SOS-ответа при повреждении ДНК.

Условия культивирования. В экспериментах использовали клетки, не подвергавшиеся ранее воздействию токсических веществ. Клетки культивировали в богатой среде LB [12], содержащей 80 мкг/мл канамицина и 100 мкг/мл ампициллина. Среду инокулировали клетками с фенотипом Lac⁺GFP⁻, через 2 ч роста клетки осаждали, отмывали от среды (предварительные эксперименты показали защитное действие среды от генотоксических агентов) и пересевали в свежую среду с таким расчетом, чтобы оптическая плотность составила приблизительно 0.002, и вносили генотоксикант. Контрольные образцы генотоксическому воздействию не подвергали. В качестве ДНК-повреждающих веществ использовали антибиотик митомицин С и пероксид водорода.

Тестирование генотоксичности рассевом клеток. Клетки Lac⁺ культивировали в жидкой среде в присутствии генотоксиканта, а затем высевали на чашки с LB-агаром без генотоксических веществ. Генотоксичность определяли, как разницу в количестве колоний с фенотипом Lac⁻ на чашках

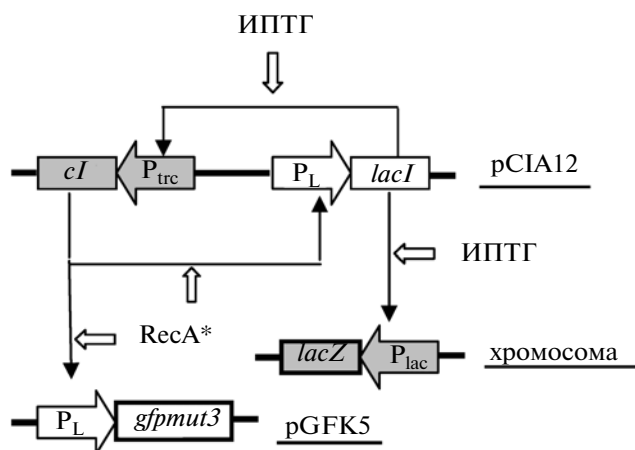


Рис. 1. Схема искусственной генной сети в клетках штамма JC158(pCIA12/pGFK5). Сеть состоит из циклической дигенной системы с отрицательными обратными связями, локализованной на плазмиде pCIA12, маркерного гена *lacZ* на хромосоме и маркерного гена *gfpmut3* на плазмиде pGFK5.

опыта и контроля. Хромогенный субстрат 5-бромо-4-хлоро-3-индолил-β-D-галлактопиранозид (X-Gal) вносили в концентрации 40 мкг/мл. Чашки инкубировали 24 ч при 34°C.

Измерение активности β-галактозидазы и уровня флуоресценции культуры. Активность β-галактозидазы оценивали при помощи хромогенного субстрата о-нитрофенил-β-D-галлактозида (ОНФГ) [12] по увеличению количества о-нитрофенола/мин. Уровень снижения активности вычисляли по формуле $F_a = A_k/A_0$, где A_k и A_0 – активность β-галактозидазы контроля и опыта соответственно. Для определения флуоресценции культуру концентрировали или разводили до $D_{600} = 0.3$. Флуоресценцию измеряли на флуориметре LS 55 фирмы “Perkin Elmer” (США) при 510–520 нм при длине волны возбуждающего света 488 нм. Уровень индукции вычисляли по формуле $F_i = I_o/I_k$, где I_o , I_k – нормированная по плотности клеток флуоресценция в опыте и контроле соответственно. Принято считать, что вещество является генотоксикантом, если в его присутствии уровень SOS-ответа возрастает в 2 раза, по сравнению с фоновым [13].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для проверки чувствительности клеток штамма JC158(pCIA12/pGFK5) к генотоксическим веществам в среду культивирования вносили митомицин С, антибиотик, повреждающий ДНК как при непосредственном взаимодействии с молекулой, так и опосредованно, индуцируя окислительный стресс [14]. Образцы готовили, как описано в “Методике”. Из диаграмм на рис. 2, следует, что по из-

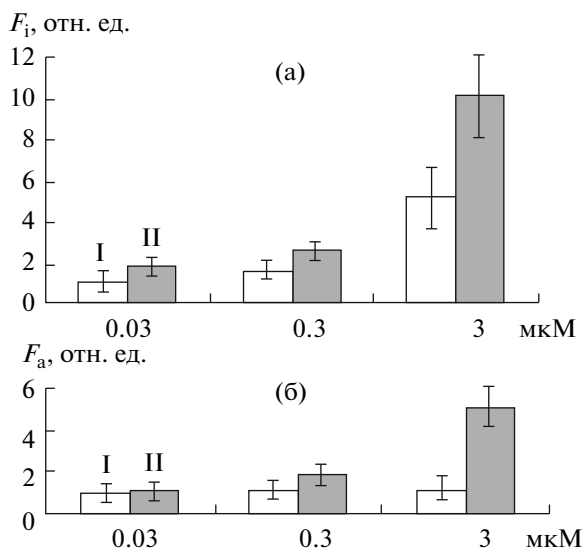


Рис. 2. Влияние различных концентраций митомидина С на уровень флуоресценции, F_i (а) и падение активности β -галактозидазы, F_a (б) клеток штамма JC158(pCIA12/pGFK5). I – 2, II – 4 ч.

менению уровня флуоресценции культуры генотоксическое действие митомидина С регистрировалось, начиная с концентрации 0.03 μM , по падению активности β -галактозидазы – с концентрации 0.3 μM . При определении генотоксичности рассеяв клетки подвергали воздействию в жидкой среде, а затем высевали на чашки, не содержащие митомидин С. Изменение числа Lac^- -колоний на чашках наблюдалось при внесении 3 μM митомидина С (рис. 3). При этой концентрации митомидина, даже в отсутствие роста культуры, индуцировал изменение фенотипа у $60 \pm 10\%$ выживших клеток уже через 1 ч инкубации.

Эксперименты подтвердили, что клеточный биосенсор реагирует на повреждение ДНК изменением уровня синтеза белка GFP и β -галактозидазы, чувствительность к действию митомидина С зависела от способа тестирования.

Рассмотрим механизм регистрации повреждения ДНК в штамме JC158(pCIA12/pGFK5) (рис. 1). При нарушении целостности молекулы ДНК бактериальных клеток белок RecA обратимо переходит в активированную форму RecA* и стимулирует автокаталитическое расщепление репрессора генов SOS-регулона LexA, что приводит к развитию SOS-ответа [15]. Развитие SOS-ответа может, в свою очередь, вызвать рост концентрации белка RecA в десятки раз, поскольку LexA является репрессором гена *recA*. Чувствительность клеток штамма JC158(pCIA12/pGFK5) к генотоксикантам обеспечивает репрессор CI, который подобно белку LexA расщепляется при взаимодействии с RecA* [16]. Падение концентрации CI-репрессора вызывает экспрессию с P_L -промотора генов *gfp*

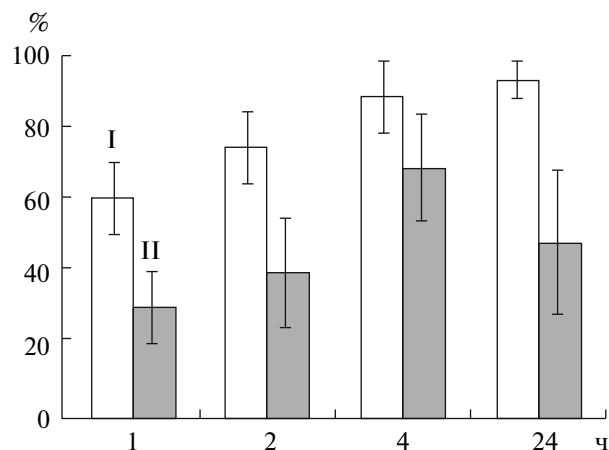


Рис. 3. Зависимость количества (%) Lac^- -колоний JC158(pCIA12/pGFK5) на чашках, не содержащих генотоксикантов, от длительности предшествующего воздействия 3 μM митомидина С (I) и 0.9 мМ пероксида водорода (II).

и *lacI*. Репрессор лактозного оперона LacI останавливает транскрипцию гена *LacZ*, кодирующего β -галактозидазу, и репрессирует P_{trc} -промотор, блокируя экспрессию гена *cl*. Таким образом, в присутствии генотоксиканта начинается синтез белка GFP, в то время как накопление β -галактозидазы останавливается.

По данным литературы, бактериальные биосенсоры, регистрирующие сигнал изменением уровня экспрессии регуляторных генов циклической дигенной системы, обладают более высокой чувствительностью, чем биосенсоры, в которых внешний сигнал непосредственно индуцирует экспрессию репортерного гена [10]. В наших экспериментах минимальная концентрация митомидина С, индуцирующая флуоресценцию культуры JC158(pCIA12/pGFK5), соответствует концентрациям, регистрируемым хроматестом [17] и *umu*-тестом [18], уступая более чувствительным биосенсорам [13, 19]. Вероятно, в нашем случае повысить чувствительность можно, используя штаммы с мутациями, снижающими эффективность процесса эксцизионной репарации нуклеотидов, вследствие чего возрастет количество одонитевой ДНК [2, 20].

Искусственная система генов в штамме JC158(pCIA12/pGFK5) обеспечивает возможность наследования двух альтернативных фенотипов, иными словами, данный биосенсор обладает памятью на генотоксическое воздействие. Устойчивое переключение $\text{GFP}^- \text{Lac}^+$ и $\text{GFP}^+ \text{Lac}^-$ происходит, если изменение соотношения репрессоров в клетке при развитии SOS-ответа достаточно для закрепления нового фенотипа. В экспериментах пороговая концентрация митомидина С, обеспечивающая переключение феноти-

пов, составляла 3 мкМ. Ниже этих значений штамм JC158(pCIA12/pGFK5) функционировал, как обычный биосенсор, отвечая на повреждение ДНК увеличением флуоресценции, но не поддерживая фенотип GFP⁺Lac⁻ после устранения генотоксического воздействия.

В последующих экспериментах мы протестировали возможность мониторинга временного присутствия генотоксиканта в среде. Клетки экспоненциально растущей культуры подвергали воздействию 3 мкМ митомицина С или 0.9 мМ пероксида водорода на протяжении 1 ч, затем отмывали, пересеивали в свежую среду, не содержащую токсических веществ, и через 5 ч культивирования рассевали на чашки. Концентрация 0.9 мМ для пероксида водорода была определена в предварительных экспериментах как пороговая для устойчивого переключения фенотипа клеток JC158(pCIA12/pGFK5) (рис. 3). Разрывы ДНК при воздействии на клетку пероксида водорода опосредованы свободным гидроксильным радикалом OH[•], образующимся при одноэлектронном восстановлении пероксида ионами Fe⁺² в реакции Фентона [21]. За вычетом контроля, клетки, контактировавшие за 5 ч до посева с митомицином С или с пероксидом водорода, сформировали на чашках 70 и 20% Lac⁻-колоний соответственно. Эксперимент показал принципиальную возможность создания на основе клеток, содержащих генетические системы с памятью на внешнее воздействие, биосенсоров для непрерывного мониторинга исследуемой среды.

Наличие у данной системы памяти позволяет использовать биосенсор для одновременной оценки цито- и генотоксичности кратковременного воздействия тестируемого вещества. Клетки культивировали в течение 30, 60 и 120 мин в присутствии 1.5, 3 или 4.5 мМ пероксида водорода, затем рассевали на чашки, не содержащие токсических веществ. Количество образовавшихся колоний свидетельствовало о цитотоксичности, процент Lac⁻-колоний – о генотоксичности. Цитотоксическое действие 1.5 мМ пероксида водорода наблюдалась в первые 30 мин, в дальнейшем рост культуры возобновлялся, вновь останавливаясь к 120 мин; генотоксическое действие проявлялось через 1 ч культивирования – при посеве клетки формировали на чашках 40% Lac⁻-колоний, через 2 ч – 60% (рис. 4). При концентрации 3 мМ пероксид водорода через 30 мин оказывал генотоксическое действие на 5% клеток, через 1 ч – на 50% клеток, через 2 ч клетки погибали. При концентрации пероксида водорода 4.5 мМ клетки погибают за 1 ч, генотоксическое действие не регистрируется. Эксперимент наглядно демонстрировал зависимость выживаемости клеток и вероятности повреждения ДНК от концентрации и длительности воздействия пероксида водорода.

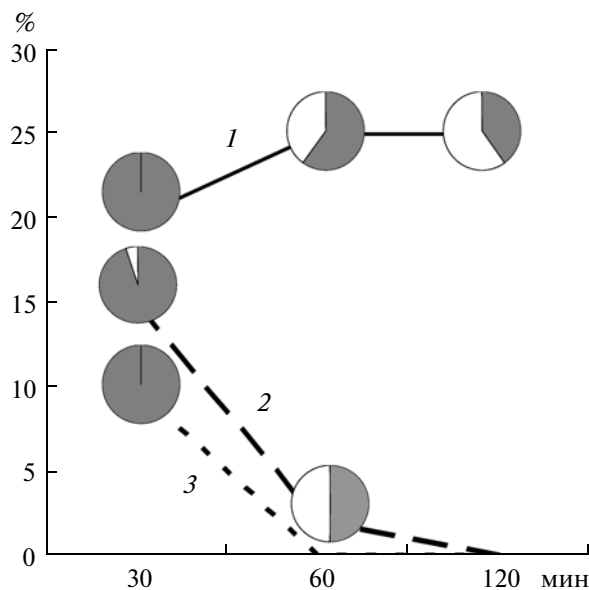


Рис. 4. Последствия кратковременного воздействия пероксида водорода (%) на клетки штамма JC158(pCIA12/pGFK5). 1 – 1.5, 2 – 3.0, 3 – 4.5 мМ. Круговыми диаграммами представлено соотношение Lac⁺ и Lac⁻-колоний на чашках (серые и белые сектора соответственно).

Гибель бактериальных клеток под действием пероксида водорода обусловлена повреждением ДНК и перекисным окислением мембран [22]. Можно предположить, что в наших экспериментах гибель клеток при концентрации пероксида 4.5 мМ является результатом повреждения мембран, при более низких концентрациях свой вклад в цитотоксическое действие пероксида вносит и повреждение ДНК. Результаты позволяют не только получить представление о цито- и генотоксичности исследуемого вещества, но и оценить последствия воздействия генотоксиканта на клетки. Например, в популяции, контактировавшей с 3 мМ пероксидом водорода в течение 1 ч, через 24 ч 50% составляли потомки клеток, получивших повреждения ДНК.

Таким образом, нами показано, что клетки штамма JC158(pCIA12/pGFK5), содержащие циклическую дигенную систему с отрицательными обратными связями, позволяют фиксировать генотоксическое воздействие, в том числе и при его устранении на момент анализа, и тестировать последствия кратковременного воздействия токсических веществ.

Авторы выражают благодарность Р.Н. Чураеву за ценные замечания и обсуждение рукописи, С.С. Астахову и Р.Р. Гарафутдинову за помощь при измерении флуоресценции.

Работа выполнена при частичной поддержке программы фундаментальных исследований президиума РАН “Биологическое разнообразие”,

подпрограммы “Генофонды и генетическое разнообразие”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Belkin Sh.* // *Current Opinion Microbiol.* 2003. V. 6. № 3. P. 206–212.
2. *Biran A., Pedahzur R., Buchinger S., Reifferscheid G., Belkin S.* // *Handbook Environ. Chem.* 2009. V. 5J. P. 161–186.
3. *Тикунова Н.В., Хлебодарова Т.М., Качко А.В., Степаненко И.Л.* // Докл. РАН. 2007. Т. 417. № 6. С. 835–839.
4. *Hakkila K., Maksimow M., Karp M., Virta M.* // *Anal. Biochem.* 2002. V. 301. № 2. P. 235–242.
5. *Close D.M., Ripp S., Sayler G.S.* // *Sensors.* 2009. V. 9. № 11. P. 9147–9174.
6. *Gardner T.S., Cantor C.R., Collins J.J.* // *Nature.* 2000. V. 403. № 6767. P. 339–342.
7. *Tchuraev R.N., Stupak I.V., Tropynina T.S., Stupak E.E.* // *FEBS Lett.* 2000. V. 486. № 3. P. 200–202.
8. *Friedland A.E., Lu T.K., Wang X., Shi D., Church G., Collins J.J.* // *Science.* 2009. V. 324. № 5931. P. 1199–1202.
9. *Michalodimitrakis K., Isalan M.* // *FEMS Microbiol. Rev.* 2009. V. 33. № 1. P. 27–37.
10. *Kobayashi H., Kaern M., Araki M., Chung K., Gardner T.S., Cantor Ch.R., Collins J.J.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004. V. 101. № 22. P. 8414–8419.
11. *Wu C.H.* // *Biotechnol. Prog.* 2009. V. 25. № 3. P. 898–903.
12. *Миллер Дж.* Эксперименты в молекулярной генетике. М.: Мир, 1976. 436 с.
13. *Птицын Л.Р.* // *Генетика.* 1996. Т. 32. № 3. С. 354–358.
14. *Dusre L., Covey J.M., Collins C., Sinha B.K.* // *Chem. Biol. Interact.* 1989. V. 71. № 1. P. 63–78.
15. *Walker G.C.* // *Microbiol. Rev.* 1984. V. 48. № 1. P. 60–93.
16. *Mustard J.A., Little J.W.* // *J. Bacteriol.* 2000. V. 182. № 6. P. 1659–1670.
17. *Quillardet P., de Bellecombe C., Hofnung M.* // *Mutat. Res.* 1985. V. 147. № 3. P. 79–95.
18. *Nakamura S., Oda Y., Shimada T., Oki I., Sugimoto K.* // *Mutat. Res.* 1987. V. 192. № 4. P. 239–246.
19. *Лавриненко И. А., Рябченко А. В., Беклемишев А. Б.* // Вестник НГУ. Серия: Биология, клиническая медицина. 2007. Т. 5. № 1. С. 95–99.
20. *Масленникова И.Л., Голясная Н.В.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2007. Т. 43. № 4. С. 455–461.
21. *Imlay J.A., Linn S.* // *Science.* 1988. V. 240. № 4857. P. 1302–1309.
22. *Ткаченко А.Г., Пиеничнов М.Р., Салахетдинова О.Я., Нестерова Л.Ю.* // Микробиология. 1999. Т. 68. № 1. С. 27–32.

Cyclic Digene System as a Control Element of a Bacterial Biosensor

E. E. Stupak and I. V. Stupak

Institute of Biology, Ufa Scientific Center, Ufa, 450054 Russia

e-mail: evgenia_stupak@mail.ru

Received February 1, 2011

Abstract—The *Escherichia coli* JC158(pCIA12/pGFK5) strain carrying a cyclic digene system with a negative feedback on the pCIA12 plasmid reacting to the DNA damage by changing the synthesis level of reporter genes—GFP and β -galactosidase—was tested. The acquired phenotype was inherited by the next generations after the removal of the genotoxic action when the concentration of the DNA-damaging compounds was above the threshold level. A potential has been shown for the application of bacterial biosensors to monitor the presence of genotoxicants in the environment and to test the consequences of short-term exposures to toxic compounds.