

УДК 574.3+579.842.14.044(047)

## РОЛЬ ГЕНА *rpoS* В АДАПТИВНОМ МУТАГЕНЕЗЕ У *Salmonella typhimurium*

М.А.Ф. Саляма, Р.М. Гимадеева, Э.В. Бабынин, Б.И. Барабанищikov

### Аннотация

С помощью флуктуационного теста определяли характер и частоту мутаций у штаммов SF553 и JF2794 *Salmonella typhimurium*, различающихся по *rpoS*-статусу. Показано участие гена *rpoS* в адаптивном мутагенезе. Частота His<sup>+</sup>-реверсий, а также мутаций устойчивости к канамицину и рифампицину у штамма SF553 (*rpoS*<sup>+</sup>) была выше в 2–8 раз, чем у штамма JF2794 (*rpoS*<sup>-</sup>). Определение скорости отмирания культур в условиях голодания показало, что штамм SF553 был более устойчив, чем JF2794, однако разница в жизнеспособности культур была менее 30%. Полученные результаты свидетельствуют о том, что различия в частоте мутаций этих двух штаммов связаны с тем, что *rpoS* напрямую участвует в адаптивном мутагенезе. Предполагается, что белок RpoS играет регуляторную роль в системе запуска индуцированного стрессом мутагенеза у бактерий.

**Ключевые слова:** адаптивный мутагенез, *Salmonella typhimurium*, устойчивость к антибиотикам, *rpoS*.

### Введение

Широкое распространение бактерий в различных экологических условиях в значительной степени зависит от их чрезвычайно высокой способности к адаптации, которая позволяет переживать неблагоприятные условия, с которыми им приходится сталкиваться в естественной среде обитания. Для существования в неблагоприятных условиях бактерии используют две основные стратегии: клеточную дифференциацию в специализированные структуры, например споруляцию у грамположительных бактерий [1], и специфичную индукцию генов стресс-ответа, которые усиливают метаболическую устойчивость вегетативных клеток, что обнаружено у большинства грамотрицательных бактерий [2].

Существует несколько специфических систем, которые запускаются в ответ на определенные типы стресса, регулируют транскрипцию соответствующих генов в ответ на изменение окружающих условий [3]. Кроме того, у бактерий имеется система общего стресс-ответа, находящаяся под контролем белка RpoS, который индуцируется во время перехода от экспоненциальной фазы роста к стационарной фазе или в ответ на различные условия, вызывающие стресс у бактерий. Это сопровождается активацией RpoS-регулируемых генов стресс-ответа и рядом физиологических и морфологических изменений [2, 4].

Среди различных стресс-ответов бактерий наименее изученным является феномен адаптивного мутагенеза. Нами было установлено, что адаптивный мутагенез у *Salmonella typhimurium* запускается в ответ на воздействие различных неблагоприятных факторов среды [5–7], что дает возможность предположить

существование единой системы запуска индуцированного стрессом мутагенеза. Под термином «адаптивный мутагенез» подразумевают процесс, который характеризуется тем, что мутации появляются у оказавшихся в состоянии стресса, голодающих, неделящихся клеток, в результате чего происходит восстановление нормальной жизнедеятельности [8]. С момента появления первого сообщения об адаптивном мутагенезе [9] прошло уже немало времени, однако вопрос о механизмах данного явления до сих пор остается открытым [10].

Целью настоящего исследования явилось установление роли гена *rpoS* в адаптивном мутагенезе. Для этого мы определяли частоту возникновения адаптивных His<sup>+</sup>-реверсий, а также мутаций устойчивости к канамицину и рифампицину у штаммов SF553 и JF2794, различающихся по *rpoS*-статусу.

### Материалы и методы исследования

Объектом исследования являлись штаммы *Salmonella typhimurium*, различающиеся по *rpoS*-статусу:

SF553 (RpoS<sup>+</sup>) / *rpsL hisG*,

JF2794 (RpoS<sup>-</sup>) / *rpsL hisG xyl rpoS<sup>LT2</sup> zgd-5178::Tn10(dTc)*.

Используемые в работе штаммы *Salmonella typhimurium* были любезно предоставлены Джоном Фостером (кафедра микробиологии и иммунологии, Университет Южной Алабамы, США).

Флуктуационный тест выполняли согласно методике Лурия и Дельбрюка [11]. Для этого колонию размером 10<sup>8</sup> клеток, выращенную на полноценной агаризованной среде, последовательно разводили в физиологическом растворе по стандартной методике до получения суспензии 50–100 клеток на 0.1 мл. Полученная суспензия переносилась в N-бульон (фирма Serva, Германия). Весь объем разливали в отдельные пробирки по 1 мл в каждую. Серию приготовленных пробирок с отдельными бактериальными культурами инкубировали в термостате при 37 °С в течение 24–48 ч. Аликвоты для засева на селективные чашки отбирались с помощью автоматической микропипетки объемом 0.1 мл. Мутанты подсчитывались после 48-часовой инкубации. Некоторое количество мутантов появлялось дополнительно в течение 10 дней.

Частоту мутаций определяли по формуле:  $a = h / N$ , где  $h = -\ln [m_0/m]$ ,  $m_0$  – культуры без мутантов,  $m$  – общее число культур,  $N$  – общее количество клеток.

Минимальные ингибирующие концентрации (МИК) определяли путем посева бактериальной культуры плотностью 10<sup>4</sup> клеток/мл на агаризованные питательные среды с различными концентрациями антибиотика. За МИК принимали концентрацию, при которой полностью подавлялся видимый рост культуры после 24-часовой инкубации при 37 °С.

Динамику числа жизнеспособных клеток при инкубации на твердых селективных средах определяли путем вырезания участков определенной величины из агара, на который была засеяна культура клеток. Данные кусочки агар-агара с находящимися на них клетками переносили в пробирку с 1 мл физиологического раствора и затем с помощью пипетки клетки смывались с агар-агара. Путем стандартных последовательных разведений определяли количество клеток в данной пробе. Подобные замеры делали через различные промежутки времени. После подсчета колоний, выросших на следующие сутки, вычисляли логарифм

отношения числа клеток в пробе на определенном временном интервале к числу клеток в пробе, сделанной в момент засева. Полученные данные позволили судить об изменении размера голодающей клеточной популяции.

### Результаты и их обсуждение

Флуктуационный тест был применен нами для исследования характера возникновения His<sup>+</sup>-ревертантов *Salmonella typhimurium*, а также мутантов, устойчивых к рифампицину и канамицину. Согласно теории флуктуационного теста [11], если мутации возникают преадаптивно, то распределение будет характеризоваться резкими колебаниями (флуктуациями) числа мутантов от культуры к культуре. Такой тип распределения Лурия и Дельбрюк назвали джекпот-распределением. В свою очередь, если мутанты возникают адаптивно, то они будут распределены в соответствии с законом Пуассона. В том случае, когда мутанты возникают преадаптивно, значение дисперсии должно в несколько раз превышать среднее число ревертантов на чашку. Если эти два значения будут приблизительно равны, это должно свидетельствовать о том, что мутанты возникли в момент контакта с селективным фактором, или адаптивно.

Результаты экспериментов представлены в табл. 1–4. Из табл. 1 видно, что в независимых культурах отношение дисперсии к среднему близко к единице. Это свидетельствует о том, что преадаптивные мутанты не образуются в богатой среде. His<sup>+</sup>-ревертанты возникают в ответ на стрессогенный фактор, то есть в условиях голодания по гистидину.

Адаптивный характер возникновения His<sup>+</sup>-ревертантов был установлен для обоих штаммов SF553 и JF2794. Таким образом, мутация в гене *rpoS* у штамма JF2794 не влияла на характер возникновения адаптивных мутаций. Однако частота His<sup>+</sup>-ревертантов у штамма SF553 была выше в 2–10 раз (табл. 2).

В табл. 3 и 4 представлены результаты по определению частоты мутаций устойчивости к рифампицину и канамицину у изучаемых штаммов. Как и в случае His<sup>+</sup>-ревертантов, частота мутаций устойчивости к антибиотикам различалась и была выше у штамма SF553 с функционирующим белком RpoS. Это может свидетельствовать о том, что белок RpoS необходим для появления мутаций в условиях стресса. Ранее было показано, что RpoS важен для адаптивных точковых мутаций и амплификации в стационарной фазе у *E. coli* [12, 13].

Различия в частоте мутаций у штаммов SF553 и JF2794 могут быть результатом как прямого участия *rpoS* в мутагенезе, так и косвенного, влияя на общую устойчивость бактерий к негативному воздействию внешних факторов. Мутанты по гену *rpoS* у *Salmonella typhimurium* и *Escherichia coli* показывают быструю потерю жизнеспособности в течение длительного голодания. Они также высокочувствительны к множеству стрессовых факторов, включая ультрафиолетовое облучение, повышенную температуру, высокую осмотическую концентрацию, низкую pH и пероксид водорода [2].

Определение МИК не выявило различий между штаммами SF553 и JF2794 по чувствительности к рифампицину (МИК – 100 мкг/мл) и канамицину (МИК – 4 мкг/мл). По этой причине мы не можем объяснить различие в частоте мутантов неодинаковой чувствительностью к антибиотикам. Для условий аминокислотного голодания чувствительность клеток к данному типу стресса мы определяли

Табл. 1

Определение частоты His<sup>+</sup>-реверсий по Лурия – Дельбрюку

|                    | Независимые SF553 (RpoS <sup>+</sup> ) | Общая SF553 (RpoS <sup>+</sup> ) | Независимые JF2794 (RpoS <sup>-</sup> ) | Общая JF2794 (RpoS <sup>-</sup> ) |
|--------------------|--|----------------------------------|---|-----------------------------------|
| <i>N</i>           | 5.9·10 <sup>7</sup>                    |                                  | 4.41·10 <sup>8</sup>                    |                                   |
| 1                  | 3                                      | 0                                | 0                                       | 1                                 |
| 2                  | 2                                      | 0                                | 1                                       | 1                                 |
| 3                  | 0                                      | 2                                | 0                                       | 0                                 |
| 4                  | 0                                      | 1                                | 1                                       | 0                                 |
| 5                  | 2                                      | 2                                | 1                                       | 1                                 |
| 6                  | 0                                      | 0                                | 0                                       | 0                                 |
| 7                  | 1                                      | 0                                | 1                                       | 0                                 |
| 8                  | 0                                      | 2                                | 0                                       | 0                                 |
| 9                  | 0                                      | 1                                | 1                                       | 1                                 |
| 10                 | 0                                      | 1                                | 1                                       | 0                                 |
| 11                 | 0                                      | 1                                | 0                                       | 0                                 |
| 12                 | 0                                      | 2                                | 0                                       | 0                                 |
| 13                 | 2                                      | 0                                | 2                                       | 0                                 |
| 14                 | 0                                      | 2                                | 1                                       | 0                                 |
| 15                 | 0                                      | 0                                | 0                                       | 0                                 |
| 16                 | 0                                      | 0                                | 0                                       | 0                                 |
| 17                 | 0                                      | 0                                | 0                                       | 1                                 |
| 18                 | 0                                      | 0                                | 0                                       | 1                                 |
| 19                 | 0                                      | 0                                | 0                                       | 0                                 |
| 20                 | 0                                      | 0                                | 0                                       | 0                                 |
| Среднее            | 0.5                                    | 0.7                              | 0.45                                    | 0.3                               |
| Дисперсия          | 0.89                                   | 0.75                             | 0.36                                    | 0.22                              |
| $\sigma^2/\bar{X}$ | 1.78                                   | 1.07                             | 0.8                                     | 0.73                              |
| <i>f</i>           | 8.47·10 <sup>-9</sup>                  |                                  | 1.02·10 <sup>-9</sup>                   |                                   |

Табл. 2

Частота His<sup>+</sup>-реверсий у штаммов SF553 и JF2794

| SF553 (RpoS <sup>+</sup> ) | JF2794 (RpoS <sup>-</sup> ) |
|----------------------------|-----------------------------|
| 2.1·10 <sup>-10</sup>      | 1.01·10 <sup>-10</sup>      |
| 8.47·10 <sup>-9</sup>      | 1.02·10 <sup>-9</sup>       |
| 4.77·10 <sup>-9</sup>      | 0.27·10 <sup>-9</sup>       |
| 0.57·10 <sup>-9</sup>      | 0.41·10 <sup>-9</sup>       |

Табл. 3

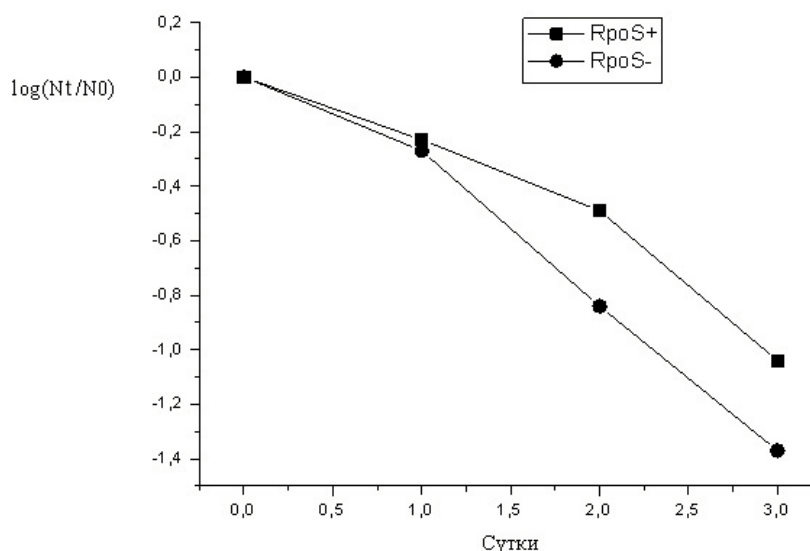
Частота устойчивых к рифампицину мутантов у штаммов SF553 и JF2794

| SF553 (RpoS <sup>+</sup> ) | JF2794 (RpoS <sup>-</sup> ) |
|----------------------------|-----------------------------|
| 2.09·10 <sup>-8</sup>      | 1.11·10 <sup>-8</sup>       |
| 8.59·10 <sup>-8</sup>      | 1.29·10 <sup>-8</sup>       |
| 7.04·10 <sup>-10</sup>     | 5.88·10 <sup>-11</sup>      |
| 7.88·10 <sup>-10</sup>     | 1.18·10 <sup>-10</sup>      |

Табл. 4

Частота устойчивых к канамицину мутантов у штаммов SF553 и JF2794

| SF553 (RpoS <sup>+</sup> ) | JF2794 (RpoS <sup>-</sup> ) |
|----------------------------|-----------------------------|
| $2.5 \cdot 10^{-8}$        | $1.14 \cdot 10^{-8}$        |
| $4.39 \cdot 10^{-8}$       | $5.39 \cdot 10^{-8}$        |
| $1.16 \cdot 10^{-8}$       | $5.13 \cdot 10^{-9}$        |
| $1.08 \cdot 10^{-8}$       | $3.28 \cdot 10^{-9}$        |

Рис. 1. Динамика отмирания культур SF553 (RpoS<sup>+</sup>) и JF2794 (RpoS<sup>-</sup>) в условиях аминокислотного голодания

по динамике отмирания клеток в условиях голодания по гистидину. Результаты опытов представлены на рис. 1.

Действительно, скорость отмирания штамма JF2794 была выше. Однако разница со штаммом SF553 в первые двое суток составила не более чем 30%, в то время как по частоте они различались более чем в два раза. Ранее было показано [14], что 90% адаптивных His<sup>+</sup>-ревертантов возникает в первые двое суток голодания. Таким образом, мы можем заключить, что ген *rpoS* напрямую участвует в адаптивном мутагенезе.

В настоящий момент является твердо установленным фактом участие в адаптивного мутагенезе SOS-индуцибельных полимераз [14, 15]. Индукция всех трех типов SOS-индуцибельных полимераз была отмечена в условиях голодания, а также в стационарной фазе роста бактериальной культуры [16]. В работе Лайот и Фостер [17] показано, что одна из SOS-индуцибельных полимераз Pol IV индуцируется в стационарной фазе, и эта индукция требует белка RpoS. Если RpoS является активным, то уровень Pol IV остается высоким в течение 3 дней, именно в этот период происходит возникновение большей части всех адаптивных мутаций [7]. Мы считаем, что для установления механизма участия *rpoS* в адаптивном мутагенезе требуется выяснить влияние *rpoS* на активацию SOS-индуцибельных полимераз.

Таким образом, можно сделать вывод, что белок RpoS принимает участие в адаптивном мутагенезе у *Salmonella typhimurium*, повышая частоту адаптивных His<sup>+</sup>-реверсий в среднем в 10 раз, а частоту появления устойчивых к канамицину и рифампицину мутантов – в 5 раз.

### Summary

M.A.F. Salama, R.M. Gimadeeva, E.V. Babynin, B.I. Barabanschikov. The Role of *rpoS* Gene in Adaptive Mutagenesis in *Salmonella typhimurium*.

Fluctuation test was performed to determine the frequency and nature of mutations in strains *Salmonella typhimurium* SF553 and JF2794 having different *rpoS* genotypes. The role of *rpoS* gene in adaptive mutagenesis was revealed. The frequency of His<sup>+</sup> reversion as well as mutations in kanamycin and rifampicin resistance genes was 2–8 times higher in *S. typhimurium* SF553 (*rpoS*<sup>+</sup>) than in *S. typhimurium* JF2794 (*rpoS*<sup>-</sup>). *S. typhimurium* SF553 was more resistant to death under starvation conditions than *S. typhimurium* JF2794; however, the difference in viability of the cultures was less than 30%. Our results suggest that variations in the mutation frequency of these two strains can be explained by the fact that *rpoS* is directly involved in adaptive mutagenesis. We hypothesize that RpoS protein plays a regulatory role in the activation of stress-induced mutagenesis in bacteria.

**Key words:** adaptive mutagenesis, *Salmonella typhimurium*, antibiotic resistance, *rpoS*.

### Литература

1. Piggot P.J., Hilbert D.W. Sporulation of *Bacillus subtilis* // Curr. Opin. Microbiol. – 2004. – V.7, No 6. – P. 579–586.
2. Hengge-Aronis R. Recent insights into the general stress response regulatory network in *Escherichia coli* // J. Mol. Microbiol. Biotechnol. – 2002. – V. 4, No 3. – P. 341–346.
3. Ishihama A. Functional modulation of *Escherichia coli* RNA polymerase // Annu. Rev. Microbiol. – 2000. – V. 54. – P. 499–518.
4. Lange R. Hengge-Aronis R. Growth phase-regulated expression of *bolA* and morphology of stationary-phase *Escherichia coli* cells are controlled by the novel sigma factor  $\delta^S$  // J. Bacteriol. – 1991. – V. 173, No 14. – P. 4474–4481.
5. Бабынин Э.В., Гасимова Г.А., Монтано А. Участие адаптивного мутагенеза в развитии устойчивости к канамицину у *Salmonella typhimurium* // Ученые записки КГАВМ им. Н.Э. Баумана. – 2009. – Т. 196. – С. 54–60.
6. Бабынин Э.В. Влияние внеклеточных метаболитов на частоту Thy<sup>+</sup> ревертантов в популяции *Salmonella typhimurium* // Микробиол. – 2006. – Т. 75, № 4. – С. 521–524.
7. Гизатуллин Ф.Ш., Бабынин Э.В. Специфичность и время возникновения His<sup>+</sup>-реверсий индуцированных гистидиновым голоданием у *Salmonella typhimurium* // Генетика. – 1996. – Т. 39, № 10. – С. 1333–1340.
8. Rosenberg S.M. Evolving responsively: adaptive mutation // Nat. Rev. Genet. – 2001. – V. 2, No 8. – P. 504–515.
9. Cairns J., Overbaugh J., Miller S. The origin of mutants // Nature. – 1988. – V. 335, No 6186. – P. 142–145.
10. Kivisaar M. Mechanisms of stationary-phase mutagenesis in bacteria: mutational processes in pseudomonads // FEMS Microbiol. Lett. – 2010. – V. 312, No 1. – P. 1–14.
11. Luria S.E., Delbrück M. Mutations of bacteria from virus sensitivity to virus resistance // Genetics. – 1943. – V. 28, No 6. – P. 491–511.

12. Bjedov I., Tenaillon O., Gérard B., Souza V., Denamur E., Radman M., Taddei F., Matic I. Stress-induced mutagenesis in bacteria // *Science*. – 2003. – V. 300, No 5624. – P. 1404–1409.
13. Lombardo M.J., Aponyi I., Rosenberg S.M. General stress response regulator RpoS in adaptive mutation and amplification in *Escherichia coli* // *Genetics*. – 2004. – V. 166, No 2. – P. 669–680.
14. Gizatullin F.S., Babynin E.V. The selection-induced His<sup>+</sup> reversion in *Salmonella typhimurium* // *Mutat. Res.* – 1996. – V. 357, No 1–2. – P. 43–56.
15. McKenzie G.J., Lee P.L., Lombardo M.-J., Hastings P.J., Rosenberg S.M. SOS mutator DNA polymerase IV functions in adaptive mutation and not adaptive Amplification // *Mol. Cell*. – 2001. – V. 7, No 3. – P. 571–579.
16. Yeiser B., Pepper E.D., Goodman M.F., Finkel S.E. SOS-induced DNA polymerases enhance long-term survival and evolutionary fitness // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2002. – V. 99, No 13. – P. 8737–8741.
17. Layton J.C., Foster P.L. Error-prone DNA polymerase IV is controlled by the stress-response sigma factor, RpoS, in *Escherichia coli* // *Mol. Microbiol.* – 2003. – V. 50, No 2. – P. 549–561.

Поступила в редакцию  
02.03.11

---

**Саляма Мона Фарид Али** – аспирант кафедры генетики Казанского (Приволжского) федерального университета.

**Гимадеева Разина Маратовна** – студент кафедры генетики Казанского (Приволжского) федерального университета.

**Бабынин Эдуард Викторович** – кандидат биологических наук, доцент кафедры генетики Казанского (Приволжского) федерального университета.

E-mail: [Edward.Babynin@ksu.ru](mailto:Edward.Babynin@ksu.ru)

**Барабанчиков Борис Иванович** – доктор биологических наук, профессор кафедры генетики Казанского (Приволжского) федерального университета.

E-mail: [Boris.Barabanchikov@ksu.ru](mailto:Boris.Barabanchikov@ksu.ru)