Baština Akademije nauka i umjetnosti Bosne i Hercegovine

Četvrti simpozijum o mikotoksinima, Sarajevo, 14 juni 1991

Ožegović, Ladislav (urednik)

1996.

Akademija nauka i umjetnosti Bosne i Hercegovine

https://bastina.anubih.ba/handle/123456789/824

Preuzeto s Baštine Akademije nauka i umjetnosti Bosne i Hercegovine

https://bastina.anubih.ba/

AKADEMIJA NAUKA I UMJETNOSTI
BOSNE I HERCEGOVINE

SPECIJALNA IZDANJA
VOL. CIII

Odjeljenje medicinskih nauka
Vol. 17

ČETVRTI SIMPOZIJUM O MIKOTOKSINIMA

(Sarajevo, 14 Juni 1991)

Redakcioni odbor
Seid Huković, Ladislav Ožegović, Džemal Rezaković

Glavni urednik
Ladislav Ožegović
Redovni član Akademije nauka i umjetnosti
Bosne i Hercegovine

SARAJEVO 1996

NEKI EFEKTI T-2 TOKSINA NA *rec* MUTANTE *Escherichia coli*

SONJA DULETIĆ

Institut za botaniku Biološkog fakulteta PMF, Beograd

Apstrakt. Efekat T-2 toksina na DNK bakterija je ispitivan korišćenjem divljeg tipa *E. coli* i različitih mutanata defektnih u rekombinaciji i postreplikativnoj reparaciji (*rec* sojevi). Toksičnost T-2 toksina je testirana delovanjem različitih doza na preživljavanje bakterija. Osim toga, pošto je poznato da agensi koji oštećuju DNK dovode do SOS odgovora, ispitivan je i potencijal T-2 toksina za indukciju SOS funkcija kod *rec*$^+$ i *rec*F sojeva, što je praćeno preko jedne od SOS funkcija - ćelijske filamentacije.

Prema dobijenim rezultatima se može zapaziti da T-2 toksin u ispitivanim koncentracijama dovodi do malog broja prekida u DNK ili da se oni brzo repariraju.

1. UVOD

Zbog sve većeg zagađivanja životne sredine hemijskim i fizičkim agensima, među kojima su i mikotoksini značajni prirodni polutanti, (a za neke od njih je saopšteno da su mutageni i kancerogeni), razvijeni su brojni testovi za brzu detekciju mutagenih agenasa. U ovim testovima često se primenjuju različiti mikroorganizmi koji su zbog svojih osobina—malih dimenzija, brzog rasta, haploidnog genoma, veoma pogodni za proveru mutagenosti i potencijalne kancerogenosti hemijskih jedinjenja. Testovi se zasnivaju na promenama genotipa i otkrivanju mutanata koji nastaju posle delovanja hemijskih agenasa, pri čemu su bakterijski sojevi kojima nedostaju mehanizmi reparacije DNK mnogo osetljiviji od normalnih sojeva.

U literaturi se mogu naći podaci da su za detekciju aktivnosti mikotoksina (među njima i T-2 toksina), osim kultura sisarskih ćelija i sisarskih organizama (Bamburg i Strong, 1971; Schoental i Joffe 1974; Ueno, 1984; Anderson i sar., 1989), korišćeni i neki mikroorganizmi - *S. typhimurium* (Ueno i sar., 1978); *B. subtilis* (Ueno i Kubota, 1976) i druge bakterije (Burmeister i Hesseltine, 1970). Tako je, npr., među brzim testovima za odre-

divanje toksičnosti i mutagenosti različitih agenasa, korišćen Rec test sa *B. subtilis* za detekciju mikotoksina (Ueno i Kubota, 1976).

Tokom ovog rada vršena su ispitivanja dejstva T-2 toksina na preživljavanje odabranih *rec* mutanata *E. coli* i njegov potencijal za indukciju SOS funkcija, što je praćeno preko ćelijske filamentacije.

2. MATERIJAL I METODE

2.1. BAKTERIJSKI SOJEVI

U eksperimentalnom radu su korišćeni sojevi bakterije *Escherichia coli* K12 navedeni u Tabeli 1.

Tabela 1. BAKTERIJSKI SOJEVI

Soj	Genotip	Poreklo
AB1157	F⁻ *thi*-1 *his*-4 *pro*A2 *arg*E3 *thr*-1 *leu*B6 *ara*-14 *lac*Y1 *gal*K2 *xyl*-5 *mtl*-1 *rps*L31 *sup*E44 *tsx*-33	K. B. Low
AB2470	kao AB1157 ali *rec*B21	K. B. Low
DL130	kao AB1157 ali *rec*C22	A. Taylor
DL131	kao AB1157 ali *rec*F143	A. Taylor
DL 132	kao AB1157 ali *rec*B21*rec*F143	A. Taylor
SP254	kao AB1157 ali *rec*N262	M. Radman
AB2463	kao AB1157 ali *rec*A13	K. B. Low

ANU BiH АНУ БиХ

2.2. HRANLJIVE PODLOGE

2.2.1. *Medijum za održavanje bakterija*

Za održavanje bakterijskih sojeva korišćen je: LA-Luria agar, koji na 1000 ml destilovane vode sadrži: 5 g NaCl, 5 g ekstrakta kvasca, 10 g kazein hidrolizata i 15 g agara.

2.2.2. *Medijumi za testiranje dejstva T-2 toksina na bakterijske sojeve*

Za rast bakterija korišćen je:

- *LB-Luria broth*, bogati medijum koji na 1000 ml destilovane vode sadrži: 5 g NaCl, 5 g ekstrakta kvasca i 10 g kazein hidrolizata i
- *LA-Luria agar.*

Za određivanje titra bakterija razblaženja su pravljena u $MgSO_4$ 10^{-2}M.

2.3. BOJENJE BAKTERIJSKIH PREPARATA

Za bojenje preparata je korišćena bazna boja metilensko plavo. Priprema: 0,3 g metilenskog plavog se rastvora u 30 ml etanola i rastvoru se dodaje 100 ml destilovane vode.

2.4. STANDARD T-2 TOKSINA

U toku ovih istraživanja dejstva T-2 toksina na bakterije korišćen je standard T-2 toksina iz *Fusarium* sp., čija je anhidrovana molekulska težina 466,5 (SIGMA I SERVA), pri čemu su razblaženja pravljena u apsolutnom etanolu.

2.5. ISPITIVANJE DEJSTVA T-2 TOKSINA NA BAKTERIJSKE SOJEVE

2.5.1. Tretiranje T-2 toksinom za određivanje preživljavanja

Prekonoćne kulture bakterija su razblažene i inkubirane na 37°C uz aeraciju (180 o/min). U logaritamske kulture bakterija (O.D.610=0,2-0,25) dodavan je T-2 toksin finalne koncentracije 0, 25, 50, 100 i 200 μg/ml. Inkubacija je vršena 10 odnosno 40 minuta na 37°C uz aeraciju, posle čega je određivan titar bakterija pravljenjem razblaženja u $MgSO_4$ 10^{-2}M i zasejavano na LA podlogu po 0,1 ml odgovarajućih razblaženja. Zatim su bakterije inkubirane preko noći na 37°C. Potom je izvršeno prebrojavanje izraslih kolonija i titar bakterija određivan:

$$\frac{\text{srednja vrijednost x 10}}{\text{razblaženje}}.$$

2.5.2. *Merenje filamentoznog rasta*

Poslje dodavanja određenih koncentracija T-2 toksina u logaritamske kulture, bakterije su inkubirane na 37°C uz aeraciju (180 o/min). U određenim vremenskim intervalima su uzimani uzorci, prenošeni na mikroskopske pločice, fiksirani i bojeni metilenskim plavim. Posmatranje i merenje bakterijskih ćelija (najmanje 100 ćelija u uzorku) je vršeno pomoću "Amplival" optičkog mikroskopa pri uvećanju od 400x.

3. REZULTATI I DISKUSIJA

Iz literature je poznato da T-2 toksin oštećuje DNK (Ueno, 1977; Agrelo i Schoental, 1980; Lafarge-Frayssinet, 1981; Kiessling 1986), pa smo korišćenjem divljeg tipa *E. coli* K12 i različitih mutanata defektnih u rekombinaciji i postreplikativnoj reparaciji (*rec* sojevi) pokušali da detaljnije ispitamo efekat ovog mikotoksina na DNK. Testirali smo toksičnost T-2 toksina ispiti-

vanjem delovanja različitih doza na preživljavanje bakterija, kao i tip oštećenja na DNK molekulu. Ukoliko bi T-2 toksin dovodio do prekida u molekulu DNK, očekivali bismo da rekombinacija bude uključena u reparaciju nakon delovanja toksina. Poređenjem preživljavanja mutanata sa različitim defektima u rekombinacionoj reparaciji jednolančanih ili dvolančanih prekida pokušali smo da bliže odredimo da li T-2 toksin prvenstveno dovodi do jedno - ili dvolančanih prekida DNK. Osim toga, pošto je poznato da agensi koji oštećuju DNK dovode do SOS odgovora (Walker, 1985) ispitivali smo i potencijal T-2 toksina za indukciju jedne od SOS funkcija - ćelijske filamentacije, koju smo koristili kao meru nivoa SOS indukcije.

Na osnovu studija konjugacione rekombinacije kod *E. coli*, nađeno je da postoje tri alternativna puta rekombinacije i postreplikativne reparacije: RecBC(D)-zavisan, RecF-zavisan i RecE-zavisan put (Clark, 1974; Wang i Smith, 1984), pri čemu sva tri puta zahtevaju prisustvo funkcionalnog RecA proteina, koji je produkt *rec*A gena. Ovaj protein je neophodan za homolognu rekombinaciju kod *E. coli*, a uz to reguliše i indukciju SOS odgovora (Armengod, 1982; Walker, 1985). RecBC(D) put je konstitutivan i kod divljeg soja se 99% rekombinacije odvija RecBC(D) putem (Clark, 1973). *rec*B, *rec*C i *rec*D geni kodiraju subjedinice enzima egzonukleaze V (RecBCD enzima).

*Rec*B i *rec*C mutanti su nevarijabilni, defektni u rekombinaciji i osetljivi na agense koji oštećuju DNK (Clark, 1973).

U odsustvu Exo V (kod *rec*B, *rec*C mutanata) dodatne mutacije u sbcB i sbcA genima mogu dovesti do uspostavljanja rekombinacije aktiviranjem RecF, odn. RecE puteva rekombinacije (Clark, 1974; Walker, 1985). Za funkcionisanje RecF puta su, osim produkta recA gena, neophodni i produkti *rec*F, *rec*N, *rec*J, *ruv*, *rec*O, *rec*Q, i *uvr*D (*rec*L) gena (Walker, 1984; Smith, 1988). Pojedinačne mutacije u genima RecF puta imaju malog efekta na konjugacionu rekombinaciju u *rec*BC$^+$ sojevima, ali mutanti pokazuju različitu osetljivost na agense koji oštećuju DNK. Tako su npr. *rec*F mutanti osetljivi na agense koji oštećuju DNK i defektni u rekombinaciji plazmida i λ fag-profag rekombinaciji (Armengod, 1981). RecN mutanti su osetljivi na mitomicin C i jonizujuće zračenje, dok je osetljivost na UV-zračenje neznatno povećana u odnosu na divlji soj (Picksley i sar., 1984). Različita osetljivost mutanata u genima koji pripadaju RecF putu je posledica njihovog različitog udela u reparaciji pojedinih tipova lezija na DNK. Prema tome, pretpostavlja se da je glavna uloga RecF puta u reparaciji DNK. Većina gena ovog puta je pod SOS regulacijom, pa se put aktivira pri oštećenjima DNK, u toku indukcije SOS odgovora. Studiranjem efekata UV-zračenja na različite *rec* mutante *E. coli* nađeno je da je RecBC put potreban u reparaciji dvolančanih prekida na DNK (koji nastaju od nerepariranih jednolančanih prekida), a da je RecF put uglavnom odgovoran za popunjavanje jednolančanih prekida u novosintetisanoj DNK.

3.1. EFEKAT T-2 TOKSINA NA PREŽIVLJAVANJE *rec* MUTANATA

U toku ovog rada je ispitivan efekat T-2 toksina (koncentracija 0-100 μg/ml) na preživljavanje izogenih sojeva *E. coli* koji poseduju mutacije u različitim *rec*

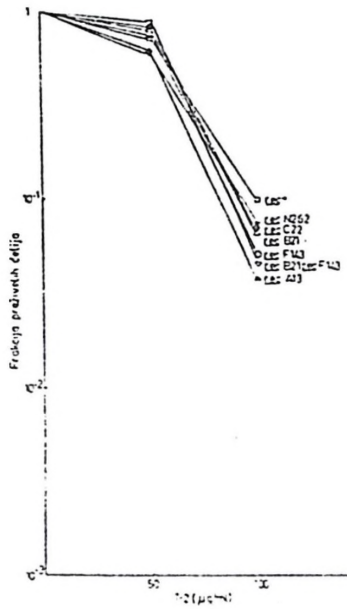
genima i pokazuju različitu efikasnost reombinacionih puteva u reparaciji indukovanih DNK oštećenja.

Rezultati dobijeni ispitivanjem preživljavanja *rec* mutanata posle tretiranja rastućim koncentracijama T-2 toksina u trajanju od deset minuta su prikazani na sl. 1. Zapaža se da se sa povećanjem koncentracije T-2 toksina smanjuje preživljavanje svih ispitivanih bakterijskih sojeva. Svi rec sojevi pokazuju nešto slabije preživljavanje od *rec*$^+$ soja. RecA mutant, defektan u homologoj rekombinaciji, postreplikativnoj i SOS-inducibilnoj reparaciji pokazuje povećanu osetljivost u odnosu na sve ispitivane sojeve, mada se ne zapaža velika razlika u preživljavanju između *recA* soja i divljeg soja, dok ostali *rec* mutanti pokazuju intermedijerno preživljavanje u odnosu na njih. Koncentracija T-2 toksina od 50 μg/ml nema značajniji toksični efekat na ispitivane bakterijske sojeve, već se tek sa koncentracijom od 100 μg/ml smanjuje njihovo preživljavanje. Ovakva priroda krive, gde se zapaža manja osetljivost bakterijskih ćelija do koncentracije od 50 μg/ml, može ukazivati na to da su oštećene druge komponente u ćeliji koje pri tretiranju većim dozama T-2 toksina povećavaju osetljivost ćelija.

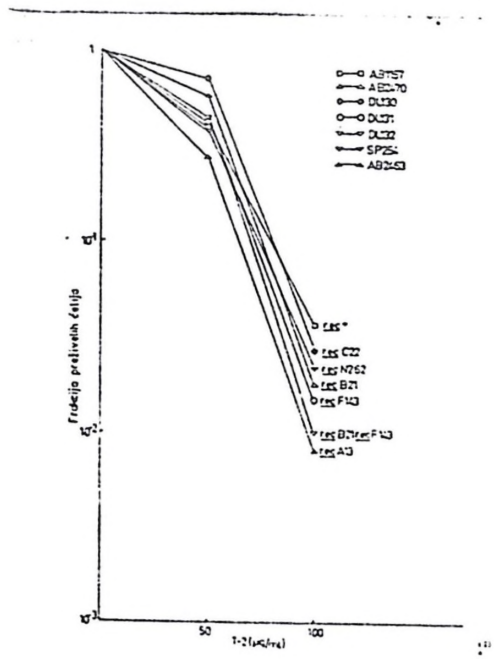
Da bi se bolje ispoljio efekat T-2 toksina, uzimani su uzorci nakon tretiranja u trajanju od 40 min, a rezultati su prikazani na sl. 2. Posle produženog delovanja T-2 toksina, preživljavanje svih ispitivanih sojeva se smanjuje, a najveću osetljivost pokazuju *recA* i *recBrecF* sojevi, defektni u homologoj rekombinaciji i postreplikativnoj reparaciji. Kod svih sojeva se zapaža, kao i kod 10-minutnog tretiranja, blago opadanje preživljavanja do koncentracije od 50 μg/ml i naglo opadanje do koncentracije od 100 μg/ml.

Preživljavanje *rec* mutanata posle delovanja T-2 toksina koncentracije od 100 μg/ml je sumirano na sl. 3. Među sojevima koji pokazuju intermedijernu osjetljivost na T-2 toksin najosjetljiviji je *recF* mutant, koji je defektan u reparaciji DSG (daughter strand gaps). Nešto manje osetljivi od *recF* soja su *recB* i *recC* sojevi, koji su defektni u konstitutivnoj reparaciji dvolančanih prekida DNK i veoma osetljivi na bleomicin i UV-zračenje (Simić i sar., 1990), kao i *recN* soj, defektan u SOS inducibilnoj reparaciji dvolančanih prekida. Pošto u literaturi postoje podaci da T-2 toksin izaziva jednolančane prekide DNK (Laffarge-Frayssinet i sar., 1981), možda se nešto povećana osetljivost sojeva koji nose *recF* mutaciju može objasniti njihovim defektom u reparaciji jednolančanih prekida. U eksperimentima sa eukariotskim organizmima dobijena su ozbiljna oštećenja DNK (jednolančani prekidi) limfoidnih organa pacova, i to posle kratkog izlaganja dejstvu T-2 toksina, dok na hepatičnoj DNK nisu konstatovana oštećenja (Laffarge-Frayssinet i sar., 1981). Schoental i Joffe (1974) su takođe, pri indukovanju lezija kod Rodentia, dobili najveća oštećenja DNK u limfoidnim tkivima, kao i u plućima i digestivnom traktu.

Prema preživljavanju ispitivanih sojeva, vjerovatno da rekombinacija nije značajna kao mehanizam reparacije nakon delovanja T-2 toksina. Može se pretpostaviti da formiranje prekida u molekulu DNK nije primarni mehanizam delovanja ovog toksina ili da se oni posle formiranja brzo repariraju, pa nisu mogli da se



Sl. 1. Kriva preživljavanja *rec* sojeva tretiranih T-2 toksinom u trajanju od 10 min



Sl. 2. Kriva preživljavanja *rec* sojeva tretiranih T-2 toksinom u trajanju od 40 min

АНУ ВіН АНУ БиХ

zapaze kroz smanjenje preživljavanja. Moguće je da se prekidi brzo repariraju na neki drugi način (reparativnom resintezom), pa se ne indukuje reparacije rekombinacijom. Moguće je da T-2 toksin nema direktno dejstvo na molekul DNK, ili da inhibicijom sinteze proteina inhibira i sintezu enzima koji učestvuju u reparaciji, pa oštećenja ne mogu da se repariraju, pri čemu bi trebalo ispitati molekularni mehanizam njegovog dejstva.

3.2. ĆELIJSKA FILAMENTACIJA INDUKOVANA T-2 TOKSINOM U *rec* SOJEVIMA

U našim eksperimentima smo određivali potencijal T-2 toksina za indukciju SOS funkcija kod *rec*$^+$ i *rec*F sojeva, što je praćeno preko jedne od SOS funkcija - ćelijske filamentacije.

Fiziološki odgovori koji se javljaju u ćeliji posle delovanja različitih agenasa koji oštećuju DNK ili zaustavljaju replikaciju DNK, formiranjem SOS signala dovode do indukcije SOS funkcija, među kojima je i ćelijska filamentacija.

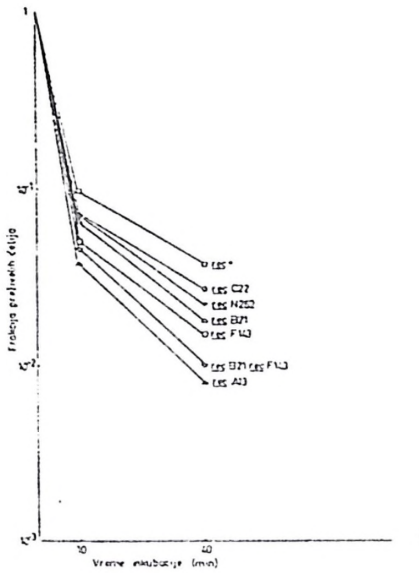
SOS regulacioni sistem je kontrolisan produktima *rec*A i *lex*A gena, i u neindukovanoj ćeliji LexA protein djeluje kao represor velikog broja gena, uključujući i sopstveni i *rec*A gen. LexA protein u neindukovanoj ćeliji održava sintezu RecA proteina na niskom nivou. Kada dođe do oštećenja DNK, formira se SOS indukujući signal koji aktivira bazalnu količinu RecA proteina. Aktivirani RecA protein razlaže LexA represor, što dovodi do povećane sinteze RecA proteina i drugih genskih produkata (Walker, 1985). Posle reparacije oštećenja na DNK, nestaje SOS indukujući signal i nagomilava se LexA represor koji se vezuje za SOS gene, čime se ćelija vraća u neindukovano stanje (Walker, 1985).

Jedan od gena koji je pod kontrolom LexA represora je *sfi*A (*sul*A) gen, čiji je produkt odgovoran za inhibiciju ćelijske deobe pri čemu se kao posljedica javlja filamentozni rast bakterijskih ćelija (Huisman i D'Ari, 1983).

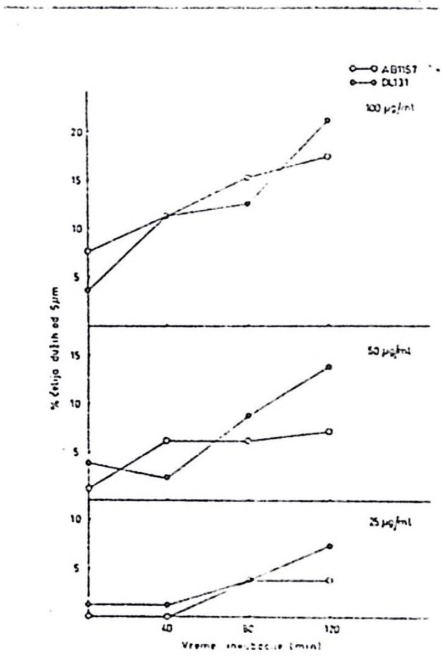
Na slici 4 su prikazani rezultati ovih eksperimenata. Zapaža se veće izdu-živanje ćelija kod *rec*F soja u odnosu na divlji tip na svim koncentracijama, mada je procenat filamenata mali u poređenju sa procentom izdu-živanja ćelija pri delovanju nekih potentnih SOS-indukujućih agenasa, kao što je npr. bleomicin (Knežević-Vukčević i sar., 1987). Sa povećanjem koncentracije T-2 toksina konstatovan je porast dužine filamenata kod oba soja, tako da je najveći procenat filamenata nađen na koncentraciji T-2 toksina od 100 μg/ml. Auffray i Boutibonnes (1986) su tokom ispitivanja genotoksičnosti nekih mikotoksina koristeći *E. coli* u SOS spot testu našli da je T-2 toksin negativan kao SOS-indukujući agens i da je jedini detektovani efekat bio toksični, što se manifestovalo odsustvom rasta oko filtera sa T-2 toksinom.

Ueno i sar. (1978) su u Ames-ovom testu sa S. *typhimurium* konstatovali da T-2 toksin ne pokazuje mutagenost.

SOS-indukcija dobijena u našim eksperimentima nije značajna, što ponovo navodi na pretpostavku da T-2 toksin nije izazvao brojna oštećenja u DNK ili da su se ta oštećenja brzo reparirala, pa nisu indukovala SOS-odgovor.



Sl. 3. Kriva preživljavanja *rec* sojeva tretiranih T-2 toksinom koncentracije 100 μg/ml



Sl. 4. Ćelijska filamentacija indukovana T-2 toksinom

ANU BiH АНУ БиХ

4. ZAKLJUČAK

Testiranjem efekta T-2 toksina na preživljavanje *rec* mutanata i ispitivanjem njegove sposobnosti da indukuje SOS-odgovor dobijene su indikacije da T-2 toksin u ispitivanim koncentracijama dovodi do malog broja prekida u DNK ili da se oni brzo repariraju i da je slab SOS-induktor.

SOME T-2 TOXIN EFFECTS ON *rec* MUTANTS OF *Escherichia coli*

Summary

T-2 toxin effects on bacterial DN were investigated by using bacterial strains, derivatives of *E. coli* K12.

Since T-2 toxin is known to induce DNA damages in eucaryotic cells, the effect of different concentrations (50 and 100 μg/ml) of T-2 toxin on bacterial survival was tested.

Exposure of *E. coli* to agents that damage DNA or interfere with DNA replication results in the induction of a diverse set of physiological responses termed SOS functions. These responses include, among others, inhibition of cell division which leads to filamentation. Various T-2 toxin concentrations (25, 50 and 100 μg/ml) for inducing SOS functions in *rec*$^+$ and *rec*F strains were studied.

The results obtained indicate that T-2 toxin in the used concentrations leads to a small number of DNA breaks which are relatively rapidly repaired.

LITERATURA

Agrelo, C. E., Schoental, R. (1980): *Synthesis of DNA in human fibroblasts treated with T-2 toxin and HT-2 toxin (The trichothecene metabolites of Fusarium species) and the effects of hydroxyurea.* Toxicol. Lett., 5, 155-160.

Anderson, D. W., Black, R. M., Lee, C. G., Pottage, C., Rickard, R. L., Sandford, M. S. , Webber, T. D., Williams, N. E. (1989): *Structure-activity studies of trichothecenes: citotoxysity of analogues and reaction products derived from T-2 toxin and neosolaniol.* Journal of Medicinal Chemistry, 32, 555-562.

Armengod, M. E. (1981): *Role of the recF gene of Escherichia coli K12 in recombination.* Mol. Gen. Genet., 181, 497-504.

Armengod, M. E. (1982): *RecF-dependent recombination as a SOS function.* Biochimie, 64, 629-632.

Zahvalnica: Eksperimentalni deo rada je urađen na Katedri za mikrobiologiju Instituta za botaniku Biološkog fakulteta PMF-a Univerziteta u Beogradu, Veoma sam zahvalna prof. dr Dragi Simić i dr Jeleni Knežević-Vukčević za pažnju, stručnu pomoć i korisne sugestije u toku rada i konačne obrade rezultata.

Auffray, Y., Boutibonnes, P. (1986): *Evaluation of the genotoxic activity of some mycotoxins using Escherichia coli in the SOS spot test.* Mutation Res., 171, 79-82.

Bamburg, J. R., Strong, F. M. (1971): *12,13-Epoxytrichothecenes.* U: Microbial toxins (S. Kadis, A. Ciegler and S. J. Ajl eds.) VII, 207-292, Academic Press, New York.

Burmeister, H. R., Hesseltine, C. W. (1970): *Biological assays for two mycotoxins produced by Fusarium tricinctum.* Appl. Microbiol., 20, 437-440.

Clark, A. J. (19739: *Recombination deficient mutants of E. coli and other bacteria.* Annu. Rev. Genet., 7, 67-86.

Clark, A. J. (1974): *Progress toward a metabolic interpretation of genetic recombination of Escherichia coli and bacteriophage lambda.* Genetics, 78, 259-271.

Huisman, O., D'Ari, R. (1983): *Effect of suppressors of SOS mediated filamentation on sfiA operon expression in Escherichia coli.* J. Bacteriol., 153, 169-175.

Kiessling, K. H. (1986): *Biochemical mechanism of action of mycotoxins.* Pure & Appl. Chem. 58, 327-338.

Kneževič-Vukčevič, J., Vuković, B., Simić, D. (1987): *Role of rec genes in SOS-induced inhibition of cell division in Escherichia coli.* Mutation Res., 192, 247-252.

Laffarge-Frayssinet, C., Decloitre F., Mousset, S., Martin, M., Frayssinet (1981): *Induction of DNA single-strand breaks by T-2 toxin, a trichothecene metabolite of Fusarium. Effect on lymphoid organs and liver.* Mutation Res., 88, 115-123.

Picksley, S. M., Attfield, P. V., Lloyd, R. G. (1984): *Repair of DNA double-strand breaks in Escherichia coli K-12 requires a functional recN product.* Mol. Gen. Genet., 195, 267-274.

Schoental, R., Joffe, A. Z. (1974): *Lesions induced in rodents by extracts from cultures of Fusarium poae and F. sporotrichioides.* J. Pathol.112, 37-42.

Smith, G. R. (1988): *Homologous recombination in procaryotes.* Microbiol. Rev., 52, 1-28.

Simić, D., Vuković-Gačić, B., Kneževič-Vukčevič, J. (1990): *Participation of rec genes of Escherichia coli K-12 in W-reactivation of UV-irradiated phage Lambda.* Mutation Res., 243, 159-164.

Ueno, Y., Kubota, K. (1967): *DNA-attacking ability of carcinogenic mycotoxins in recombination-deficient mutant cells of Bacillus subtilis.* Cancer Res., 36, 445-451.

Ueno, Y., (1977): *Mode of action of trichothecenes.* Pure & Appl. Chem., 49, 1737-1745.

Ueno, Y., Kubota, K., Ito, T., Nakamura, Y. (1978): *Mutagenicity of carcinogenic mycotoxins in Salmonella typhimurium.* Cancer Res., 38, 536-542.

Ueno, Y. (1984): *Toxicological features of T-2 toxin and related trichothecenes.* Fund. Appl. Toxicol., 4, 124-132.

Walker, G. C. (1984): *Mutagenesis and inducible responses to deoxyribonucleic acid damage in Escherichia coli.* Microbiol. Rev., 48, 60-93.

Walker, G. C. (1985): *Inducible DNA repair systems.* Ann. Rev. Biochem., 54, 425-457.

Wang, T. V., Smith, K. C. (1984): *RecF-dependent and recFrecB-independent DNA gap-filling repair processes transfer dimer-containing parental strands to daughter strands in Escherichia coli K-12 uvrB.* J. Bacteriol., 158, 727-729.