

На правах рукописи

Демидова Елизавета Вячеславовна

**ИЗУЧЕНИЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ ТЕРАГЕРЦОВОГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА
ESCHERICHIA COLI ПРИ ПОМОЩИ ГЕНОСЕНСОРОВ**

03.02.07 – генетика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Новосибирск – 2016

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» в лаборатории молекулярных биотехнологий (т. 22), г. Новосибирск.

НАУЧНЫЙ
РУКОВОДИТЕЛЬ

кандидат биологических наук,
зав. лабораторией молекулярных биотехнологий,
зам. директора по научной работе ФГБНУ ФИЦ
«Институт цитологии и генетики СО РАН»
Сергей Евгеньевич Пельтек

ОФИЦИАЛЬНЫЕ
ОППОНЕНТЫ

доктор биологических наук,
Ольга Павловна Черкасова,
ФГБУН «Институт лазерной физики СО РАН»,
ведущий научный сотрудник
лаборатории биофизики

доктор биологических наук, профессор,
Сергей Львович Киселев,
ФГБУН «Институт общей генетики им. Н.И.
Вавилова РАН», зав. лабораторией эпигенетики

Ведущее учреждение

Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки «Институт молекулярной
и клеточной биологии СО РАН», г. Новосибирск

Защита диссертации состоится «__» _____ 2016 г. на утреннем заседании диссертационного совета Д 003.011.01 на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» (ИЦиГ СО РАН), в конференц-зале Института по адресу: пр. академика Лаврентьева 10, г. Новосибирск, 630090, тел.: (383) 3634906 (1321); факс: (383) 3331278; e-mail: dissov@bionet.nsc.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИЦиГ СО РАН и на сайте института www.bionet.nsc.ru.

Автореферат разослан «__» _____ 2016 г.

Учёный секретарь
Диссертационного совета
Доктор биологических наук

Т. М. Хлебодарова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

В связи с тем, что человечество начало эксплуатировать терагерцовый (ТГц) диапазон частот электромагнитного спектра в научных и прикладных областях деятельности, предполагается все более интенсивный контакт человека с ним, особенно в инспекционных системах безопасности и диагностическом медицинском оборудовании. Главная идея эксплуатации этого диапазона частот заключается в его теоретически обоснованной безопасности для живых систем – низкой энергии кванта, не способной к ионизации молекул и, следовательно, не вызывающей хорошо известных последствий контакта живых систем с другими, более высокоэнергетичными диапазонами электромагнитного спектра. Следует отметить, что ТГц излучение практически отсутствует в естественной среде обитания живых систем на планете Земля в силу интенсивного поглощения этого диапазона частот водой и ее парами в атмосфере. В то же время появление таких интенсивных источников этого излучения, как лазеры на свободных электронах (ЛСЭ), открывает уникальные возможности изучения возможного воздействия ТГц излучения на живые объекты. В частности, параметры излучения таких лазеров позволяют проводить эксперименты в строго контролируемых температурных условиях, что важно для разделения реакции живых организмов на температуру и непосредственно на ТГц излучение.

Наиболее простым и удобным объектом для изучения воздействия ТГц излучения на живые объекты является бактерия *Escherichia coli* (*E. coli*), генетика, молекулярная биология и метаболизм которой изучены наиболее подробно. Возможно создание геносенсорных конструкций, которые будут сигнализировать о наличии или отсутствии реакции конкретной стрессовой системы на ТГц излучение у *E. coli* синтезом специального репортерного белка GFP, легко определяемого флуорометрически. Применение геносенсорных конструкций позволит не только выявить возможное влияние ТГц излучения на функционирование генетических систем у *E. coli*, но и подойти к изучению некоторых механизмов этого воздействия.

Цель и задачи исследования

Целью работы являлось изучение нетермического воздействия ТГц излучения на функционирование генетических систем у *E. coli*.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

- 1) Изучить динамику развития интенсивности флуоресценции геносенсора *E. coli/pKatG-GFP* в зависимости от дозы облучения и

длины волны для изучения нетермического воздействия ТГц излучения на систему окислительного стресса.

- 2) Создать геносенсорную конструкцию на основе промотора гена *copA*, который входит в систему поддержания гомеостаза ионов меди у *E. coli*, и изучить динамику развития интенсивности флюоресценции геносенсора *E. coli/pCopA-GFP* в ответ на облучение с целью изучения нетермического воздействия ТГц излучения на систему гомеостаза ионов меди.
- 3) Изучить динамику развития интенсивности флюоресценции геносенсора *E. coli/pEmrR-GFP* в ответ на облучение с целью изучения нетермического воздействия ТГц излучения на стрессовую систему детоксикации противомикробных агентов.
- 4) Сравнить уровень индукции флюоресцентного ответа геносенсоров *E. coli/pKatG-GFP*, *E. coli/pCopA-GFP*, *E. coli/pEmrR-GFP* в ответ на нетермическое воздействие ТГц излучения и естественные индукторы.
- 5) Создать геносенсорную конструкцию на основе промотора гена *glnA*, остро реагирующего на ТГц излучение по данным протеомного профилирования, и изучить динамику развития интенсивности флюоресценции геносенсора *E. coli/pGlnA-GFP* после нетермического воздействия ТГц излучения.
- 6) Изучить воздействие облученной среды на индукцию флюоресцентного ответа геносенсоров *E. coli/pKatG-GFP*, *E. coli/pCopA-GFP*, *E. coli/pEmrR-GFP* и *E. coli/pGlnA-GFP*.

Научная новизна

В настоящей работе впервые изучено нетермическое воздействие ТГц излучения на стрессовые системы клеток *E. coli*. При помощи сконструированного нами геносенсора *E. coli/pCopA-GFP*, а также геносенсоров *E. coli/pKatG-GFP* и *E. coli/pEmrR-GFP* впервые показано, что промоторы генов *copA* и *katG* задействованы в ответе на нетермическое воздействие ТГц излучения, а промотор гена *emrR* нет. При помощи сконструированного нами геносенсора *E. coli/pGlnA-GFP* впервые показано, что промотор гена *glnA* задействован в ответе на нетермическое воздействие ТГц излучения. Это полностью согласуется с данными лаборатории молекулярных биотехнологий ИЦиГ СО РАН, полученными ранее при протеомном анализе быстрого ответа клеток *E. coli* на нетермическое воздействие ТГц излучения.

Впервые показано, что клетки геносенсоров *E. coli/pKatG-GFP*, *E. coli/pCopA-GFP* и *E. coli/pGlnA-GFP*, помещенные в облученную минимальную среду М9, демонстрируют ту же динамику синтеза репортерного белка GFP, что и жидкие культуры геносенсоров, непосредственно облученные ТГц излучением. Наоборот, перенос

облученных клеток геносенсоров в интактную среду не приводит к индукции синтеза флюоресцентного белка GFP.

Теоретическая и практическая значимость

В работе впервые получены экспериментальные доказательства селективности нетермического воздействия ТГц излучения на стресс-реактивные системы *E. coli*. Изучена динамика ответа культур геносенсоров, полученных на основе промоторов стресс-реактивных генов бактерии *E. coli*, на однократное нетермическое воздействие ТГц излучения. При помощи геносенсора *E. coli/pKatG-GFP* показано, что нетермическое воздействие ТГц излучения носит ярко выраженный дозовый характер. При помощи геносенсоров *E. coli/pKatG-GFP* и *E. coli/pCopA-GFP* впервые показано, что характер динамики ответа на облучение и на естественные индукторы носит принципиально разный характер. Показано отсутствие индукции синтеза репортерного белка GFP как при непосредственном облучении клеток геносенсора *E. coli/pEmrR-GFP*, так и при добавлении к его жидкой культуре облученной минимальной среды М9.

На основе промотора гена *glnA*, участвующего в процессе метаболизма аминокислот у *E. coli*, создан геносенсор *E. coli/pGlnA-GFP*, маркирующий быстроразвивающийся протеомный ответ на нетермическое воздействие ТГц излучения. Показана его индукция как при непосредственном облучении клеток, так и при добавлении облученной минимальной среды М9.

Воздействие ТГц излучения на жидкую культуральную минимальную среду М9 вызывает образование устойчивого фактора индукции системы гомеостаза ионов меди и окислительного стресса у *E. coli*. Для геносенсоров, маркирующих эти стресс-реактивные системы, динамика индукционного ответа при добавлении облученной среды М9 в точности повторяет динамику ответа при непосредственном облучении их жидкой культуры. Показано, что образование фактора индукции стрессовых систем *E. coli* при нетермическом воздействии ТГц излучения на жидкую культуральную среду М9 связано с ее органическими компонентами.

Положение, выносимое на защиту

Генетически детерминированные системы окислительного стресса, гомеостаза ионов меди и метаболизма аминокислот у *E. coli* вовлечены в генную сеть ответа на нетермическое воздействие ТГц излучения и на модификацию органических компонентов культуральной минимальной среды, которая возникает при ее облучении ТГц излучением. В этот ответ не вовлечена молекулярно-генетическая система детоксикации противомикробных агентов.

Личный вклад автора в исследование проблемы

Большая часть экспериментальной работы выполнена лично автором. Геносенсоры *E. coli/pCopA-GFP* и *E. coli/pGlnA-GFP* получены автором самостоятельно. Облучение геносенсоров проводилось автором самостоятельно при участии сотрудников лаборатории молекулярных биотехнологий ИЦиГ СО РАН и сотрудников лаборатории № 8-1 Института ядерной физики им. Г. И. Будкера СО РАН.

Структура и объем работы

Диссертационная работа состоит из оглавления, списка сокращений, введения, обзора литературы, описания используемых материалов, методов и приборной базы, результатов, обсуждения, заключения, выводов, списка цитированной литературы и приложений. Работа изложена на 173 страницах, содержит 43 рисунка и 8 таблиц. Библиографический указатель литературы включает 228 источников, из них 48 отечественных и 180 зарубежных.

Благодарности

Автор выражает благодарность сотрудникам ИЯФ СО РАН: к.ф.м.н., с.н.с. В. М. Попику, к.ф.м.н., с.н.с. М. А. Щеглову, А. И. Семенову и коллективу операторов лазера на свободных электронах за организацию пользовательских станций, настройку параметров и поддержание режимов работы лазера. Академикам РАН Н. А. Колчанову и Г. Н. Кулипанову за постоянный интерес к выполненной работе, коллективу лаборатории молекулярных биотехнологий ИЦиГ СО РАН за помощь и поддержку. Особая благодарность – моему научному руководителю, к.б.н., заведующему лабораторией молекулярных биотехнологий Сергею Евгеньевичу Пельтеку.

МАТЕРИАЛЫ, МЕТОДЫ И ПРИБОРНАЯ БАЗА

Плазмидные конструкции. При изучении воздействия нетермического ТГц излучения использовались плазмидные геносенсорные конструкции на основе промоторов генов *katG* [Khlebodarova T. M. et al., 2007], *emrR* (предоставлена лабораторией молекулярно-генетических систем), а также *copA* и *glnA*, созданных в рамках данной работы. Геносенсор – это искусственная генетическая система, чувствительным элементом которой является промотор гена-сенсора, активируемый в ответ на стрессовое воздействие. Существенным элементом этой системы является репортерный ген, который находится под регуляторным контролем промотора гена-сенсора. Последним элементом системы является бактериальная клетка, в которую введена генетическая конструкция. Реакция клетки на внешние воздействия активирует экспрессию этой генетической конструкции, что приводит к синтезу репортерных белков (рис. 1).

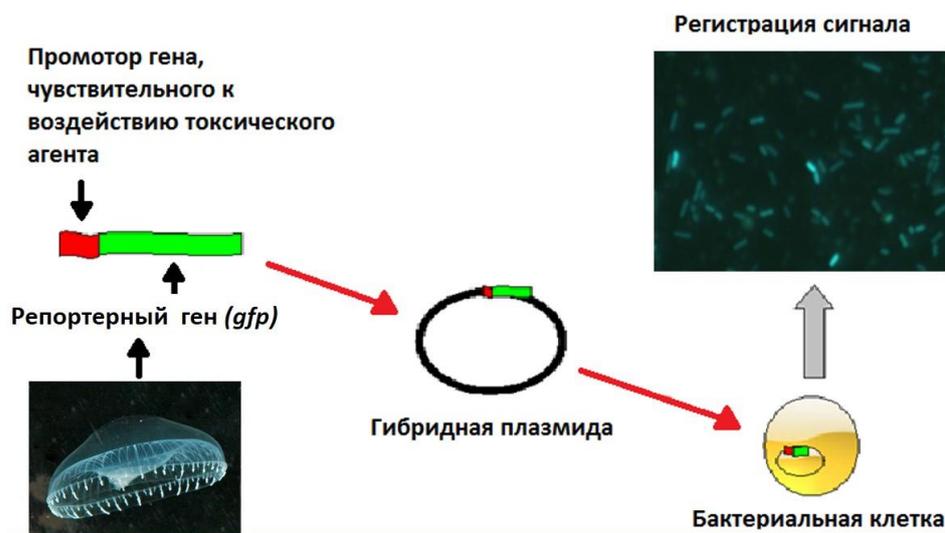


Рисунок 1. Принципиальная схема геносенсора.

Плазмидная геносенсорная конструкция на основе промотора гена *copA* была создана на основе базового вектора pUC18-GFP, сконструированного в рамках данной работы. Данные протеомного анализа изменения экспрессии генов в ответ на ТГц излучение, полученные в лаборатории молекулярных биотехнологий ИЦиГ СО РАН, стимулировали нас создать геносенсор *E. coli/pGlnA-GFP*, маркирующий быстрый протеомный ответ на непосредственное нетермическое воздействие ТГц излучения на метаболические системы клеток *E. coli*. Плазмидная геносенсорная конструкция на основе промотора гена *glnA* была создана на основе базового вектора pUC18-GFP (таб. 1).

Таблица 1. Плазмидные конструкции, использованные в работе.

Промотор гена	<i>katG</i>	<i>copA</i>	<i>emrR</i>	<i>glnA</i>
Плазмидная конструкция с геном флюоресцентного белка GFP	Была сконструирована ранее	Сконструирована в данной работе	Была сконструирована ранее	Сконструирована в данной работе
Естественный индуктор	Перекись водорода	Сульфат меди	Салициловая кислота	ТГц излучение

Получение культуры геносенсоров осуществлялось при помощи трансформации компетентных клеток *E. coli* JM103 плазмидными геносенсорными конструкциями методом электропорации на электропораторе PowerPac™ HC Power Supply (Bio-Rad) при параметрах: 1,8 кВ, 25 мкФ, 200 Ом, зазор ячейки кюветы 1 мм. Для проведения экспериментов по тестированию геносенсоров, ночную культуру геносенсора подращивали до оптической плотности, равной 0,6 и переводили на минимальную среду M9.

Тестирование клеток геносенсора на восприимчивость к токсическим веществам проводилось одновременно с тестированием облученных образцов и выступало в роли положительного контроля, флюоресценцию клеток геносенсора в минимальной среде М9 без токсических агентов рассматривали в качестве отрицательного контроля. Чувствительность клеток к воздействию токсических агентов и ТГц излучению оценивали по увеличению флюоресценции, измеряемой на флюориметре VICTOR³ (Perkin Elmer) со следующими параметрами: время облучения – 0,1 секунда, длина волны облучения – 485 нм, длина волны эмиссии – 535 нм. Измерения на флюориметре проводились каждые 15 или 20 минут.

Оценка выживаемости клеток в экспериментах с облучением была проведена путем посева клеток на плотную агаризованную среду после облучения и после окончания измерения флюоресценции.

Облучение. Для проведения исследований использовали Новосибирский лазер на свободных электронах ТГц диапазона, имеющий рекордные параметры средней мощности в 400 Вт. Эта уникальная установка генерирует когерентное ТГц излучение в виде периодических пикосекундных импульсов с возможностью плавного изменения длины волны от 5 до 240 мкм, что позволяет изучать воздействие излучения большой мощности в широком диапазоне длин волн на биологические объекты.

Для экспериментов с воздействием излучения ТГц диапазона на жидкую культуру клеток геносенсоров особенно важно избежать температурных воздействий, возникающих при диссипации энергии ТГц излучения в водных средах. Для правильной постановки эксперимента сотрудниками лабораторий 8-1 ИЯФ СО РАН и молекулярных биотехнологий ИЦиГ СО РАН была разработана специальная кювета для экспонирования биологических образцов. Для облучения 50 мкл культуры геносенсора в минимальной среде М9 помещали в специальную кювету для экспонирования между двумя натянутыми полипропиленовыми пленками. Регулировка средней мощности при условии неизменности пиковой мощности осуществлялась при помощи обтюратора. Строгий контроль температуры среды внутри кюветы осуществляли дистанционно при помощи тепловизора «ТКВр-СВИТ 101» (ИФП СО РАН), что обеспечивало возможность изучать *именно нетермическое* воздействие ТГц излучения на бактериальные клетки. Облучение бактериальных культур в каждом эксперименте проводили однократно и наблюдали за кинетикой развития ответа конкретных промоторов при помощи репортерного гена *gfp*.

Такие параметры, как время, длина волны, температурный режим, контролировались и зависели от требований конкретного эксперимента.

Статистическая обработка данных. Тестирование геносенсоров на предмет влияния на них токсических агентов и некоторых экспериментов с

облучением проводилось в трех повторах. Для каждого эксперимента были рассчитаны стандартные отклонения.

Для обработки результатов экспериментов исследования нетермического воздействия ТГц излучения с облучением клеточной культуры или минимальной среды М9 был использован метод линейной регрессии. Для этого использовался программный пакет OriginPro 7.5 (OriginLab Corporation). Коэффициент В и Error, полученные для отрицательного контроля и опыта, использовались для сравнения углов наклонов линий между собой с использованием t-критерия Стьюдента. Сравнению между собой подвергались данные отрицательного контроля и опыта в каждом отдельном эксперименте.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ И ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

Определение оптимальных концентраций естественных индукторов для геносенсоров

Для обеспечения показательного положительного контроля в экспериментах с облучением были проведены предварительные тестирования геносенсоров, в ходе которых определялись оптимальные концентрации токсических агентов: для геносенсора *E. coli/pKatG-GFP* оптимальная концентрация перекиси водорода составила 2,5 мМ, для геносенсора *E. coli/pCopA-GFP* оптимальная концентрация сульфата меди для минимальной среды ГГМ составила 25 мкМ и 50 мкМ – для минимальной среды М9, для геносенсора *E. coli/pEmrR-GFP* оптимальная концентрация салициловой кислоты составила 0,1 мМ. Также для геносенсоров *E. coli/pKatG-GFP* и *E. coli/pCopA-GFP* было показано отсутствие индукции флюоресцентного белка GFP вследствие теплового шока (рис.2, рис. 3).

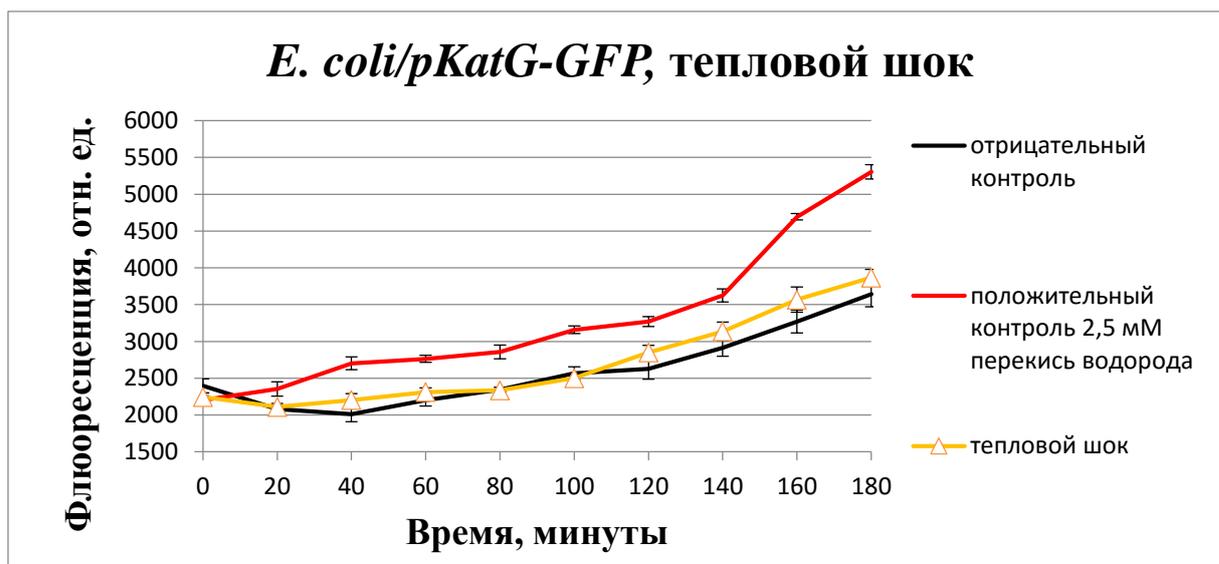


Рисунок 2. Проверка реакции геносенсора *E. coli/pKatG-GFP* на тепловой шок. Интенсивность флюоресценции белка GFP в клетках-сенсорах *E. coli/pKatG-GFP* после воздействия температурой 42⁰С в течение 15 минут. В качестве положительного контроля к геносенсору добавляли 2,5 мМ перекись водорода. Планки погрешностей демонстрируют стандартное отклонение трех технических повторов.

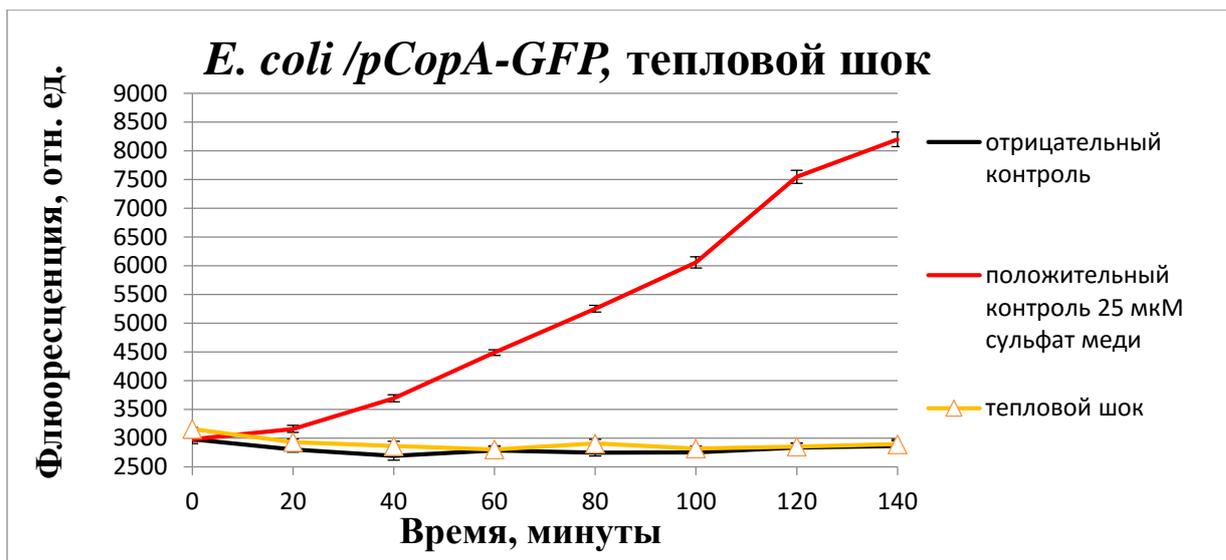


Рисунок 3. Проверка реакции геносенсора *E. coli/pCopA-GFP* на тепловой шок. Интенсивность флуоресценции белка GFP в клетках-сенсорах *E. coli/pCopA-GFP* после воздействия температурой 42⁰С в течение 15 минут. В качестве положительного контроля к геносенсору добавляли 25 мкМ сульфата меди. Планки погрешностей демонстрируют стандартное отклонение трех технических повторов.

Облучение геносенсора *E. coli/pKatG-GFP* и его реакция на нетермическое воздействие ТГц излучения

Клетки геносенсора *E. coli/pKatG-GFP* были подвергнуты нетермическому воздействию ТГц излучения в течение 15 минут при длинах волн, составляющих 130 мкм, 150 мкм и 200 мкм, с плотностью мощности 1,4 Вт/см². Была показана индукция флуоресцентного белка GFP при всех длинах волн. Следует отметить отсроченное во времени, по сравнению с положительным контролем, развитие ответной реакции клеток геносенсора на облучение, при этом в опыте значения уровня флуоресценции этих же клеток **намного выше**. Одной из возможных причин этого явления могло бы быть значительное увеличение количества клеток в экспериментальном облученном образце по сравнению с отрицательным контролем. Для исследования данного вопроса был проведен ряд высеваний культур из образцов отрицательного контроля и опыта на плотную агаризованную среду сразу после облучения и в конце проведения замеров флуоресценции. Полученные результаты показали отсутствие достоверных отличий в количестве клеток опытного и контрольного образцов, высеянных в начале и в конце проведения замеров флуоресценции.

С целью определения минимальной дозы облучения были проведены эксперименты по облучению клеток геносенсора *E. coli/pKatG-GFP* ТГц излучением в течение 5, 10 и 15 минут при длине волны 130 мкм.

Из рисунка 4 видно, что только облучение ТГц излучением в течение 15 минут приводит к выраженной индукции белка GFP в клетках геносенсора *E.coli/pKatG-GFP*.

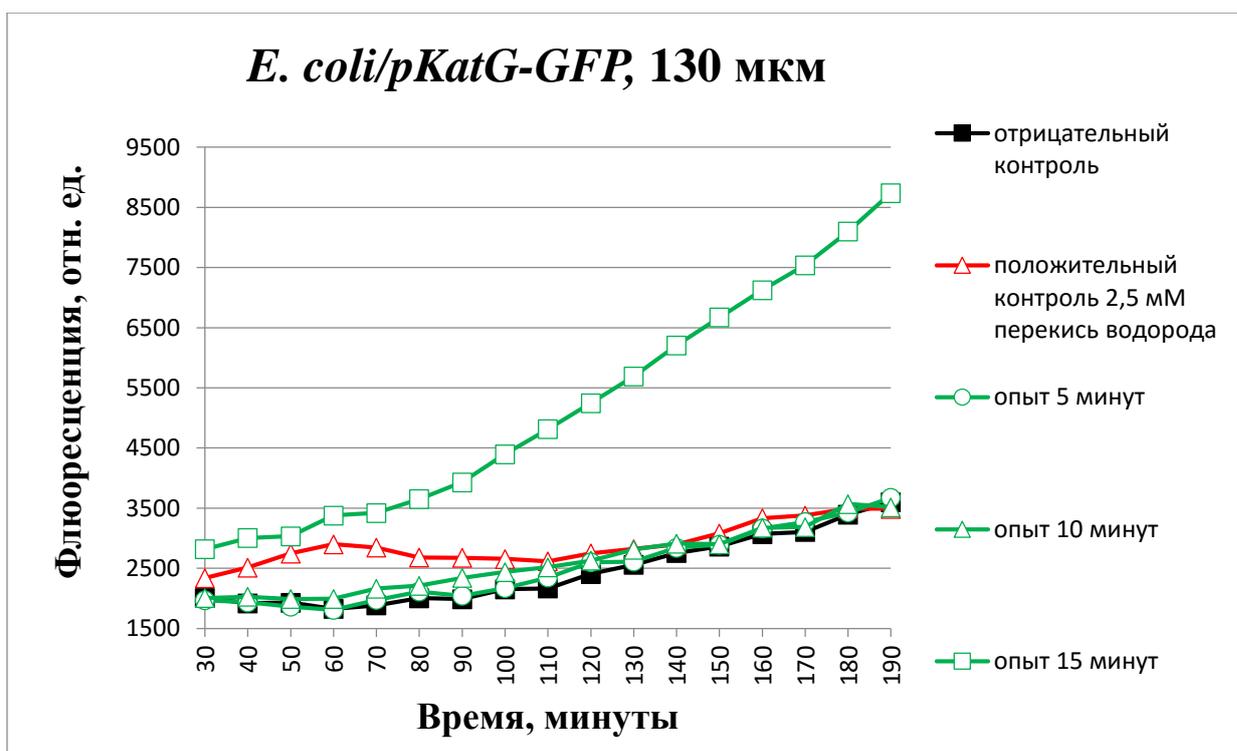


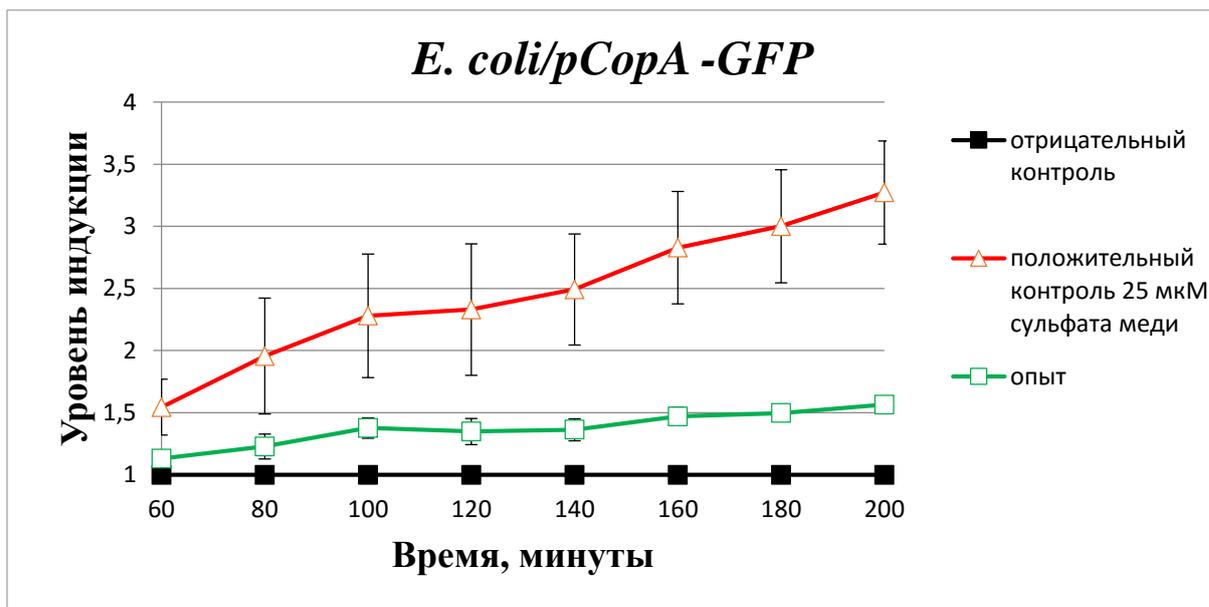
Рисунок 4. Интенсивность флюоресценции белка GFP в клетках геносенсора *E. coli/pKatG-GFP* после 5, 10 и 15 минут нетермического воздействия ТГц излучения с длиной волны 130 мкм и плотностью мощности 1,4 Вт/см².

Облучение геносенсоров *E. coli/pCopA-GFP*, *E. coli/pEmrR-GFP* и их реакция на нетермическое воздействие ТГц излучения

Было проведено по 3 полностью независимых биологических эксперимента по облучению геносенсора *E. coli/pCopA-GFP* и геносенсора *E. coli/pEmrR-GFP* ТГц излучением при длине волны 130 мкм с плотностью мощности 1,4 Вт/см². Для обработки полученных экспериментальных данных был рассчитан **нормированный уровень индукции**, представляющий собой **отношение** интенсивности флюоресценции в опыте и положительном контроле к интенсивности флюоресценции отрицательного контроля в каждой точке измерения.

Из рисунка 5 видно, что однократно облученный в течение 15 минут ТГц излучением с длиной волны 130 мкм и плотностью мощности 1,4 Вт/см² работоспособный геносенсор *E. coli/pCopA-GFP* постоянно синтезирует репортерный белок GFP по крайней мере в течение 200 минут, а геносенсор *E. coli/pEmrR-GFP* не синтезирует белок GFP.

А



Б

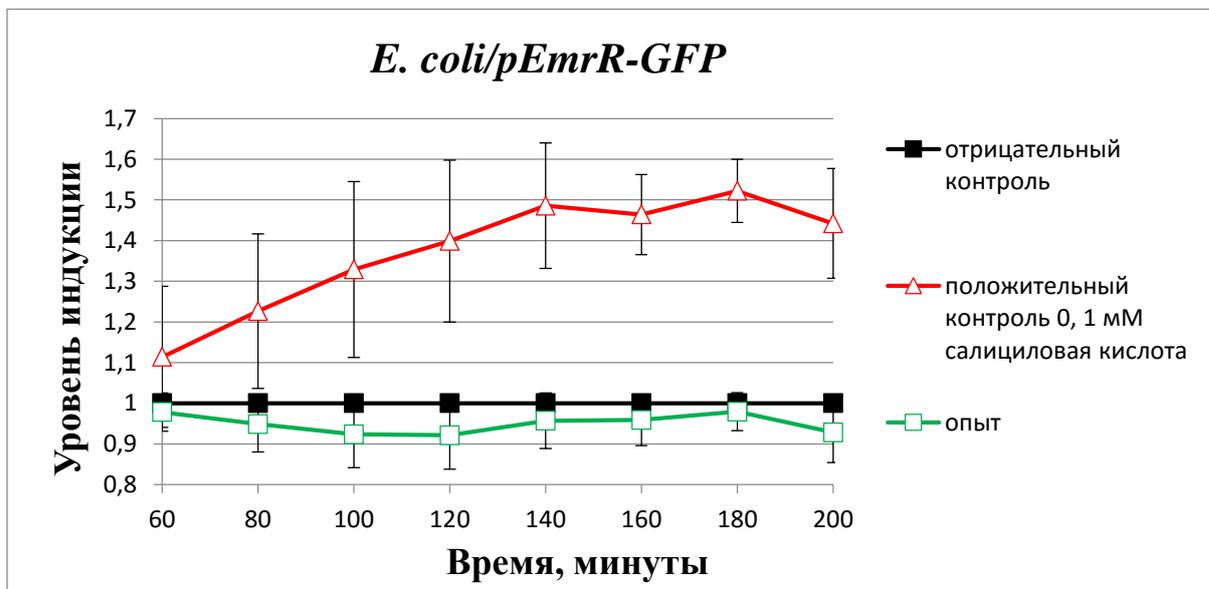


Рисунок 5. Нормированный уровень индукции белка GFP в клетках-сенсорах *E.coli/pCopA-GFP* (А) *E.coli/pEmrR-GFP* (Б) после воздействия в течение 15 минут нетермическим ТГц излучением с длиной волны 130 мкм и плотностью мощности 1,4 Вт/см². Планки погрешностей демонстрируют стандартное отклонение трех биологических повторов.

Облучение геносенсора *E. coli/pGlnA-GFP* и его реакция на нетермическое воздействие ТГц излучения

Был проведен эксперимент по облучению клеток геносенсора *E. coli/pGlnA-GFP* ТГц излучением при длине волны 130 мкм с плотностью мощности 1,4 Вт/см². Было показано, что в однократно облученном в течение 15 минут ТГц излучением с длиной волны 130 мкм и плотностью мощности 1,4 Вт/см² работоспособном геносенсоре *E.coli/pGlnA-GFP* наблюдается

увеличение интенсивности флюоресценции по крайней мере в течение 240 минут.

Таким образом, при анализе флюоресцентного ответа геносенсора *E. coli/pGlnA-GFP* на нетермическое воздействие ТГц излучения для промотора гена *glnA* показана стимуляция на уровне транскрипции.

Сравнение силы ответа геносенсоров на нетермическое воздействие ТГц излучения

Для оценки устойчивости ответа на ТГц излучение для культур геносенсоров *E. coli/pKatG-GFP*, *E. coli/pCopA-GFP* и *E. coli/pEmrR-GFP* было проведено три полностью независимых биологических эксперимента и рассчитаны нормированные уровни индукции.

Из рисунка 6 видно, что отсутствует корреляция нормированных уровней индукции, обусловленных облучением и воздействием естественных индукторов. Нормированный уровень индукции флюоресценции имеет наибольшее значение у геносенсора *E. coli/pCopA-GFP* при воздействии естественного индуктора – ионов меди. При нетермическом воздействии ТГц излучения наибольший нормированный уровень индукции флюоресценции наблюдали у геносенсора *E. coli/pKatG-GFP*. Для геносенсора *E. coli/pEmrR-GFP* определен высокий нормированный уровень индукции флюоресцентного сигнала в случае воздействия салициловой кислотой. Показано отсутствие значимой разницы в уровнях флюоресценции клеток геносенсора *E. coli/pEmrR-GFP* при нетермическом воздействии ТГц излучения и отрицательном контроле.

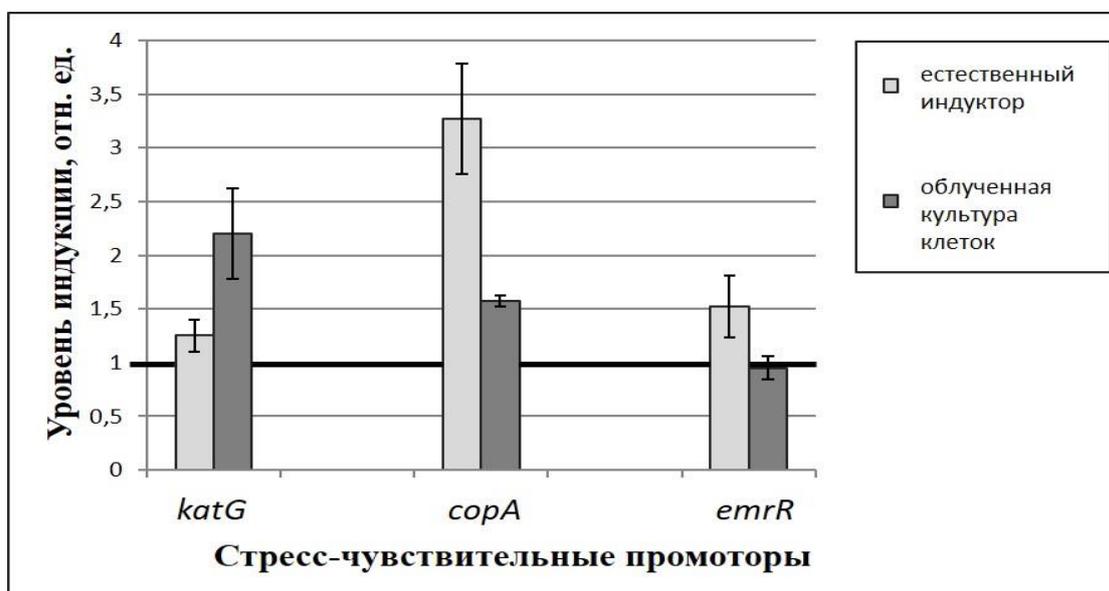


Рисунок 6. Сравнение интенсивности нормированных уровней индукции флюоресценции клеток геносенсоров *E. coli/pKatG-GFP*, *E. coli/pCopA-GFP*, *E. coli/pEmrR-GFP*, через 200 минут после воздействия естественными индукторами: перекись водорода 2,5 мМ, сульфат меди 50 мкМ, салициловая кислота 0,1 мМ соответственно и через 200 минут после облучения в течение 15 минут при длине волны 130 мкм и средней плотности мощности 1,4 Вт/см².

Индукция флюоресцентного ответа при облучении минимальной среды M9 и при отделении облученных клеток от этой среды

Была проведена серия экспериментов, которая заключалась в разделении облученных клеток и облученной минимальной среды M9 для уточнения локализации индуцирующего фактора, вызывающего экспрессию белка GFP в клетках геносенсора. Для этого облучались отдельно минимальная среда M9 и клеточная культура геносенсора *E. coli/pKatG-GFP*.

Индукция белка GFP наблюдалась в случае добавления к клеткам геносенсора облученной минимальной среды M9. В случае добавления необлученной минимальной среды к облученным осажденным клеткам индукция флюоресцентного белка GFP отсутствовала.

Так как нетермическое воздействие ТГц излучения оказалось связано и с воздействием на среду, необходимо было проверить способность ТГц излучения нетермически модифицировать среды другого состава. В результате экспериментов по облучению минимальных сред M9 и ГГМ с использованием необлученных геносенсоров *E. coli/pKatG-GFP* и *E. coli/pCopA-GFP* была продемонстрирована индукция флюоресцентного белка GFP.

Для детализации обнаруженного эффекта был спланирован ряд экспериментов, который включал:

- Изучение влияния средней мощности излучения на приобретение способности среды M9 к индукции экспрессии маркера окислительного стресса *E. coli* при помощи геносенсора *E. coli/pKatG-GFP*.
- Выявление сохранения способности к индукции при разведении облученной среды M9 системы окислительного стресса *E. coli* при помощи геносенсора *E. coli/pKatG-GFP*.
- Исследование способности к индукции стрессовых систем *E. coli* средой M9, полученной на основе облученных раздельно компонентов.
- Изучение длительности сохранения облученной средой M9 способности к индукции стрессовых систем *E. coli*.

Облучение минимальной среды M9 в диапазоне температур от 27 до 45°C показало, что при всех температурах среда M9 приобрела способность к индукции экспрессии флюоресцентного белка GFP у геносенсора *E. coli/pKatG-GFP*. Было показано, что динамика ответа геносенсора *E. coli/pKatG-GFP* на разные разведения минимальной облученной среды M9 обратно пропорциональна разведению облученной минимальной среды M9. Таким образом, существует прямая зависимость между средней мощностью и концентрацией гипотетического фактора индукции. Кроме этого, индукция синтеза белка GFP клетками геносенсора *E. coli/pKatG-GFP* проявлялась при хранении облученных образцов среды M9 в временном диапазоне от 180

минут до 20 часов при температуре 4°C, что свидетельствует об **устойчивости** фактора индукции, образующегося в среде М9 при нетермическом воздействии ТГц излучения.

Для прояснения химической природы фактора индукции была проведена серия экспериментов, посвященная изучению способности компонентов минимальной среды М9 модифицироваться под действием ТГц излучения с образованием устойчивого фактора индукции флюоресцентного ответа клеток геносенсора *E. coli/pKatG-GFP*.

Были проведены эксперименты с минимальной средой М9, полученной на облученных:

- воде
- среде М9 без глюкозы и казаминовых кислот
- десятикратной среде М9 без глюкозы и казаминовых кислот
- среде М9 без глюкозы
- среде М9 без казаминовых кислот.

Проведенные эксперименты продемонстрировали, что ключевая роль в способности к модификации минимальной среды М9 под действием ТГц излучения принадлежит органической составляющей – глюкозе или казаминовым кислотам.

Совокупность представленных данных свидетельствует о разной реакции отдельных элементов стрессовых систем *E. Coli* на нетермическое воздействие ТГц излучения. Известно, что в промоторной области гена *copA* помимо сайта связывания транскрипционного фактора CueR, содержится гипотетический сайт связывания глобального транскрипционного фактора FruR (Fructose repressor) [Рачеев Д. А., 2009], но непонятно в роли активатора или репрессора он выступает. Примечательно, что транскрипционный фактор FruR также является активатором гена *crp* [Zhang Z. et al., 2014], который вовлечен в генную сеть окислительного стресса и опосредованно (через OxyR) способен активировать транскрипцию гена *katG* (рис. 7). В регуляторной области гена *emrR* сайты связывания FruR обнаружены не были [Рачеев Д. А., 2009].

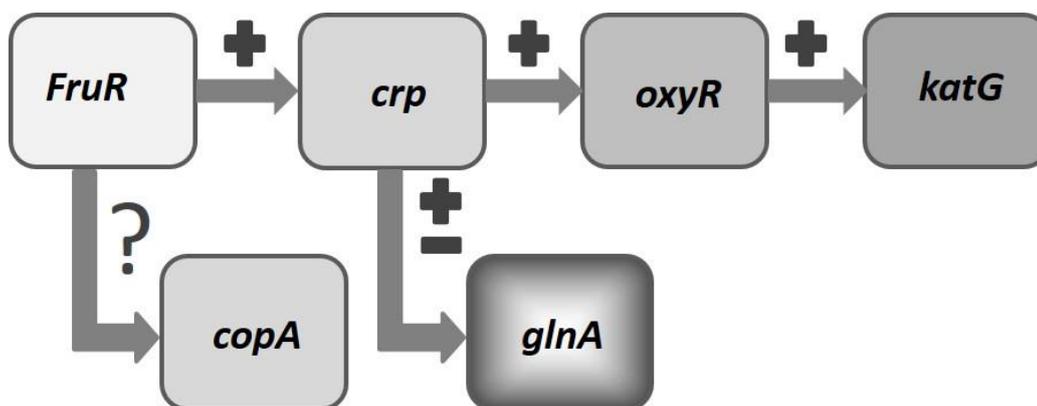


Рисунок 7. Схема влияния транскрипционного фактора FruR на регуляцию генов *katG*, *copA* и *glnA*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исходя из полученных результатов, можно предположить, что при нетермическом воздействии ТГц излучения на минимальную среду М9, в ней происходит образование фактора, который индуцирует экспрессию флюоресцентного белка GFP в клетках геносенсоров *E. coli/pGlnA-GFP*, *E. coli/pCopA-GFP* и *E. coli/pKatG-GFP*, концентрация которого зависит от поглощенной дозы. Образование этого фактора напрямую связано с облучением органической составляющей среды М9. Природа фактора позволяет ему сохранять свою активность в течение по крайней мере суток при 4°C. Культивирование геносенсоров *E. coli/pGlnA-GFP*, *E. coli/pCopA-GFP* и *E. coli/pKatG-GFP* в облученной среде показывает ту же динамику накопления флюоресцентного репортерного белка GFP, что и при непосредственном их облучении ТГц излучением. Сопоставление времени развития максимального ответа геносенсоров на облучение или добавление облученной ТГц излучением минимальной среды М9 позволяет расположить генетические системы реакции на стресс у *E. coli*, маркерами которых являются промоторы генов *glnA*, *copA* и *katG* в порядке их реакции на воздействие ТГц излучения. Согласно нашим данным одной из первых на нетермическое воздействие ТГц излучения реагирует система, контролирующая биосинтез аминокислот, параллельно или с небольшим отставанием реагирует система поддержания гомеостаза меди и, наконец, система, контролирующая окислительный стресс у клеток *E. coli*. При этом наиболее выраженная реакция наблюдается у системы, активирующейся окислительным стрессом.

Основная принятая на сегодняшний день гипотеза воздействия ТГц излучения на живые системы была предложена Фройлихом в 1982 году [Frohlich H., 1982]. Его идея состоит в наличии резонансных частот для некоторых компонентов живых систем (например, комплексов белков) в миллиметровых и, особенно, субмиллиметровых диапазонах. Следует отметить не менее существенный приоритетный вклад отечественных

ученых Девяткова и Голанта в формирование представлений воздействия излучения этого диапазона на живые системы [Девятков Н. Д., Голант М. Б., 1982; Голант и др., 1985]. Ими была сформулирована гипотеза не только о прямом воздействии излучения на живые системы, но и модификации степени гидратации органических молекул в воде [Девятков Н.Д. и др., 1985].

Полученные нами результаты однозначно свидетельствуют о том, что возможно нетермическое влияние ТГц излучения не только непосредственно на бактериальные клетки, но и на органическую компоненту минимальной среды М9. Таким образом, можно переформулировать гипотезу Фройлиха – воздействие осуществляется как через резонансные частоты для отдельных элементов живых систем, так и через модификацию растворов органики в воде. Следует отметить, что как ТГц излучение, так и гипотетический фактор на стрессовые системы *E. coli* воздействуют селективно – одна из главных систем контроля ответа на присутствие антибиотиков не реагирует ни на нетермическое воздействие ТГц излучения, ни на облученную минимальную среду М9. Дальнейшие наши усилия будут сосредоточены на изучении доступными физико-химическими методами образцов глюкозы и казаминовых кислот в водном растворе после нетермического воздействия ТГц излучения, что является самостоятельной задачей и требует отдельного рассмотрения.

ВЫВОДЫ

1. Показан разный уровень ответа стресс-реактивных систем *E. Coli*: при помощи геносенсоров *E. coli/pKatG-GFP* и *E. coli/pCopA-GFP*, маркирующих соответственно окислительный стресс и регуляцию гомеостаза ионов меди, показана индукция этих систем; при помощи геносенсора *E. coli/pEmrR-GFP*, маркирующего систему детоксикации антибиотиков, показано отсутствие индукции этой системы после нетермического воздействия ТГц излучения; для геносенсоров *E. coli/pKatG-GFP* и *E. coli/pCopA-GFP* показан разный качественный уровень индукции флюоресцентного ответа.
2. Нетермическое воздействие ТГц излучения носит ярко выраженный дозовый характер.
3. Создан геносенсор *E. coli/pCopA-GFP*, специфично реагирующий на избыток ионов меди; создан геносенсор *E. coli/pGlnA-GFP*, реагирующий на нетермическое воздействие ТГц излучения.
4. Нетермическое воздействие ТГц излучения на жидкую культуральную среду вызывает образование устойчивого фактора индукции систем гомеостаза ионов меди и окислительного стресса у *E. coli*.
5. Показано, что образование фактора индукции стрессовых систем *E. coli* при нетермическом воздействии ТГц излучения на жидкую культуральную среду М9 связано с ее органическими компонентами.

СПИСОК ОСНОВНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Demidova E.V.**, Goryachkovskaya T.N., Malup T.K., Bannikova S.V., Semenov A. I., Vinokurov N.A., Kolchanov N.A., Popik V.M., Peltek S.E. Studying the non-thermal effects of terahertz radiation on *E. coli/pKatG-GFP* biosensor cells// Bioelectromagnetics. – 2013. – Vol.34 (1). – P. 15-21.
2. **Demidova E.V.**, Goryachkovskaya T.N., Mesheryakova I.A., Malup T.K., Semenov A.I., Vinokurov N.A., Kolchanov N.A., Popik V.M., Peltek S.E. Impact of terahertz radiation on stress-sensitive genes of *E.coli* cell (принято к публикации)// IEEE Transactions on Terahertz Science and Technology. – 2016.
3. **Е. В. Демидова**, Т. Н. Горячковская, Т. К. Малуп, С. В. Банникова, В.М. Попик, А. И. Семенов, С. Е. Пельтек. Исследование нетермического воздействия терагерцового излучения на геносенсорные клетки *E. coli/pKatG-GFP* и *E. coli/pCopA-GFP*//XIX национальная конференция по использованию синхротронного излучения. Всероссийская молодёжная конференция «Использование синхротронного излучения», Новосибирск, 25-28 июня 2012, Книга тезисов, С. 114.
4. Пельтек С.Е., Горячковская Т.Н, **Демидова Е. В.**, Мещерякова И.А., Семенов А.И, Демидов Е.А., Попик В.М., Кулипанов Г.Н., Колчанов Н.А. Протеомный ответ бактериальных клеток на нетермическое воздействие терагерцового излучения//Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине, Казань, 22-24 ноября 2012, сборник тезисов, С. 172.
5. Peltek S.E., Demidov E.A., **Demidova E.V.**, Goryachkovskaya T.N., Kolchanov N.A., Kulipanov G.N., Mesheryakova I.A., Popik V.M., Scheglov M.A., Vinokurov N.A. Novosibirsk FEL terahertz emission for biological application (plenary)//2nd International THz-Bio Workshop, Seoul National University, Seoul, Korea, 19-20 January, 2011. – P. 37.
6. Peltek S.E., Mesheryakova I.A., Goryachkovskaya T.N., **Demidova E.V.**, Demidov E.A., Khlebodarova T.M., Oschepkov D.Yu., Kolchanov N.A., Popik V.M., Scheglov M.A., Vinokurov N.A., Kulipanov G.N., Nikolaev E.N. *E. coli* proteom expression under terahertz irradiation //Terahertz radiation: generation and application: Intern. symp., Novosibirsk, Digest reports. – Budker inst. of nucl. physics. 26-28 July, 2010.– P. 58.