

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ И ГЕНЕТИКИ СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»

На правах рукописи

Демидова Елизавета Вячеславовна

**Изучение воздействия терагерцового излучения на *Escherichia coli* при
помощи геносенсоров**

03.02.07 – генетика

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
кандидат биологических наук,
Сергей Евгеньевич Пельтек

Новосибирск - 2016

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	12
1.1 ТГц излучение: генерация и свойства.....	12
1.2 Электромагнитное излучение – как фактор воздействия на живые организмы.....	18
1.2.1 Геносенсорные конструкции в исследовании устойчивости и адаптации биологической системы к конкретным воздействиям.....	25
1.3 Механизмы регуляции стрессовых реакций <i>E. coli</i>	29
1.3.1 Окислительный стресс	30
1.3.2 Гомеостаз ионов меди	40
1.3.3 Оперон <i>EmrRAB</i>	47
1.4. Глутамин синтетаза в регуляторных контурах <i>E. coli</i>.....	49
1.4.1. Функции глутатиона в <i>E. coli</i>	52
1.5 Заключение по обзору литературы.....	57
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ, МЕТОДЫ И ПРИБОРНАЯ БАЗА.....	59
2. 1 Материалы	59
Реактивы.....	59
Бактериальные штаммы.....	59
Культуральные среды	60
Ферменты	60
Плазмиды	61
2. 2 Методы	62
Дизайн олигонуклеотидов для амплификации фрагментов ДНК.....	62
Полимеразная цепная реакция (ПЦР).....	62
Очистка продуктов ПЦР	63
Лизис <i>E. coli</i>	63
Выделение плазмидной ДНК	63
Электрофорез в агарозном геле.....	64
Выделение фрагментов ДНК из агарозы.....	64
Клонирование	65
Получение базового вектора pUC18-GFP и плазмидных конструкций pCopA-GFP и pGlnA-GFP.....	67
Приготовление компетентных клеток <i>E. coli</i>	68
Трансформация клеток <i>E. coli</i> плазмидной ДНК.....	68
Секвенирование плазмидных ДНК.....	69
Индукция синтеза флюоресцентного белка GFP в клетках геносенсоров.....	70
Измерение уровня флюоресценции клеток геносенсоров	72
Облучение клеток ТГц излучением	72
Подсчет количества клеток на агаризованных средах.....	73
2. 3 Приборная база	73
Источник ТГц излучения.....	73
Рабочая станция для облучения биологических объектов	75
2.4 Статистическая обработка данных	77
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ.....	80
3.1 Плазмидные конструкции.....	80
3.2 Определение оптимальных концентраций естественных индукторов для геносенсоров	83
3.2.1 Тестирование геносенсора на основе промотора гена <i>katG</i>	83
3.2.2 Тестирование геносенсора на основе промотора гена <i>copA</i>	87

3.2.3 Тестирование геносенсора на основе промотора гена <i>emrR</i>	90
3.3 Сравнительное изучение индукции геносенсоров <i>E. coli/pKatG-GFP</i>, <i>E. coli/pCopA-GFP</i>, <i>E. coli/pEmrR-GFP</i>, <i>E. coli/pGlnA-GFP</i> перекисью водорода, сульфатом меди и салициловой кислотой.....	91
3.4 Облучение клеточных культур геносенсоров	94
3.4.1 Облучение геносенсора <i>E. coli/pKatG-GFP</i> и его реакция на нетермическое воздействие ТГц излучения.....	94
3.4.2 Облучение геносенсоров <i>E. coli/pCopA-GFP</i> , <i>E. coli/pEmrR-GFP</i> и их реакция на нетермическое воздействие ТГц излучения.....	101
3.4.4 Облучение геносенсора <i>E. coli/pGlnA-GFP</i> и его реакция на нетермическое воздействие ТГц излучения.....	103
3.5 Сравнение силы ответа геносенсоров на нетермическое воздействие ТГц излучения	104
3.6 Облучение минимальных сред и их влияние на культуры геносенсоров.....	106
3.6.1 Индукция флюоресцентного ответа при облучении минимальной среды и при отделении облученных клеток от минимальной среды.....	106
3.6.2 Индукционный эффект от облученной минимальной среды, подвергавшейся разведениям.....	112
3.6.3 Время сохранения индукционной силы среды	114
3.6.4 Разделение минимальной среды на компоненты	115
3.6.5 Эффект от минимальной среды, облученной с разной мощностью	119
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	121
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	140
ВЫВОДЫ.....	142
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	143
ПРИЛОЖЕНИЯ	169

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- dNTP – дезоксинуклеотид-5'-трифосфаты
LB – среда Лурия-Бертани (lysogeny broth)
MOPS – 3-[N-морфолино]пропансульфоная кислота
X-gal – 5-бром-4-хлор-3-индолил-бета-D-галактопиранозид
АТФ – аденозинтрифосфат
АФК – активные формы кислорода
ГГМ – глицерол-глицерфосфатная минимальная среда
ГТФ – гуанозинтрифосфат
Гц – герц
ДМСО – диметилсульфоксид
ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
ДТТ – дитиотреитол
дцДНК - двухцепочечная ДНК
ИК – инфракрасный,
ИПТГ – изопропил-β-D-тиогалактопиранозид
ЛСЭ – лазер на свободных электронах
НАД(Ф)Н – никотинамидадениндинуклеотидфосфат
ОП – оптическая плотность
п. н. – пар нуклеотидов
ПЦР – полимеразная цепная реакция
ТАЕ – буферный раствор, содержащий трис, уксусную кислоту и ЭДТА
ТГц – терагерц
тнп – тысячи нуклеотидных пар
Трис – трис(гидроксиметил)аминометан
ТФ – транскрипционный фактор
УФ – ультрафиолетовый
цАМФ – циклический аденозинмонофосфат
ЦТК – цикл трикарбоновых кислот
ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота
ЭМИ КВЧ – электромагнитное излучение крайне высокой частоты

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

В связи с тем, что человечество начало эксплуатировать 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 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 выявить не только 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 флюоресценции 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/pCopaA-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/pCopaA-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.

- б) 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

Для проведения исследований использовали Новосибирский ЛСЭ ТГц диапазона, имеющий рекордные параметры средней мощности в 400 Вт. Эта уникальная установка генерирует когерентное ТГц излучение в виде 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 Лаборатории 8-1 ИЯФ СО РАН и молекулярных биотехнологий ИЦиГ СО РАН была разработана специальная кювета для экспонирования биологических образцов. Строгий контроль температуры среды внутри кюветы осуществляли дистанционно при помощи тепловизора, что обеспечивало возможность изучать нетермическое воздействие ТГц излучения на бактериальные клетки.

В настоящей работе впервые изучено нетермическое воздействие ТГц излучения на стрессовые системы клеток *E. coli*. При помощи сконструированных нами геносенсоров *E. coli/pCopA-GFP* и *E. coli/pGlnA-GFP*, а также геносенсоров *E. coli/pKatG-GFP* и *E. coli/pEmrR-GFP* впервые показано, что промоторы генов *copA*, *glnA* и *katG* задействованы в ответе на

нетермическое воздействие ТГц излучения, а промотор гена *emrR* нет. Данные, полученные для геносенсора *E. coli/pGlnA-GFP* полностью согласуются 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 среду, демонстрируют ту же динамику синтеза репортерного белка GFP, что и жидкие культуры геносенсоров, облученные ТГц излучением непосредственно. 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 среды.

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 среды.

Воздействие ТГц излучения на жидкую культуральную среду вызывает образование устойчивого фактора индукции системы гомеостаза ионов металлов и окислительного стресса у *E. coli*. Динамика индукционного ответа геносенсоров, маркирующих эти стресс-реактивные системы, при добавлении облученной среды в точности повторяет динамику ответа непосредственно облученной 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.

Апробация результатов

Результаты работы использованы и опубликованы в отчетах по грантам РФФИ офи-м 09-02-12100-офи_м «Изучение фундаментальных основ селективного воздействия ТГц излучения на пространственную организацию биологических объектов» и 11-04-12093-офи-м-2011 «Изучение эффектов воздействия ТГц излучения на живые объекты разного уровня организации».

Материалы диссертации были представлены и обсуждались на российских и международных конференциях, в том числе: «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине» (Казань, 2012), «Terahertz and Microwave radiation: Generation, Detection and Applications» (Москва, 2012), 2nd International THz-Bio Workshop (Сеул, Корея, 2011), XIX национальная конференция по использованию синхротронного излучения. Всероссийская молодежная конференция «Использование синхротронного излучения» (Новосибирск, 2012).

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 ЛСЭ.

Публикации

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., Mescheryakova 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.

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 ЛСЭ за организацию пользовательских станций, настройку параметров и поддержание режимов работы ЛСЭ. 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 Лаборатории молекулярных биотехнологий Сергею Евгеньевичу Пельтеку.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 ТГц излучение: генерация и свойства

С вхождением в эпоху интенсивного научно-технического прогресса повсеместно используется неионизирующее электромагнитное излучение – в частности и ТГц. Из-за малой энергии кванта ТГц излучение является неионизирующим и перспективным в таких областях, как разработка систем безопасности в аэропортах для обнаружения металлических, пластиковых и других предметов на расстояниях до десятков метров или новых диагностических систем в медицине. Успешное практическое освоение ТГц диапазона подразумевает тщательное исследование его биоопасности с целью предотвращения возможного неблагоприятного воздействия ТГц излучения и последствий такого воздействия. В связи с отсутствием у живых объектов опыта непосредственного контакта с ТГц излучением в естественных условиях необходимым этапом в исследовании биоопасности является выяснение и изучение реакции специфических или общих защитных систем биообъектов разных уровней организации на присутствие ТГц излучения.

Электромагнитное излучение ТГц диапазона располагается между высокочастотным микроволновым и длинноволновым инфракрасным диапазонами в интервале частот примерно от 0,5 до 20 ТГц, также его называют субмиллиметровым или дальним инфракрасным диапазоном (рис. 1) [Майская В., 2011]. Естественным источником этого излучения является реликтовое космическое излучение.

Именно для ТГц диапазона длин волн долгое время отсутствовали как генераторы так и приемники, в связи с этим активное изучение и освоение

этого диапазона, известного также как «ТГц провал», начато сравнительно недавно – лишь в конце двадцатого века [Wilmink G. J., Grundt J. E., 2011].

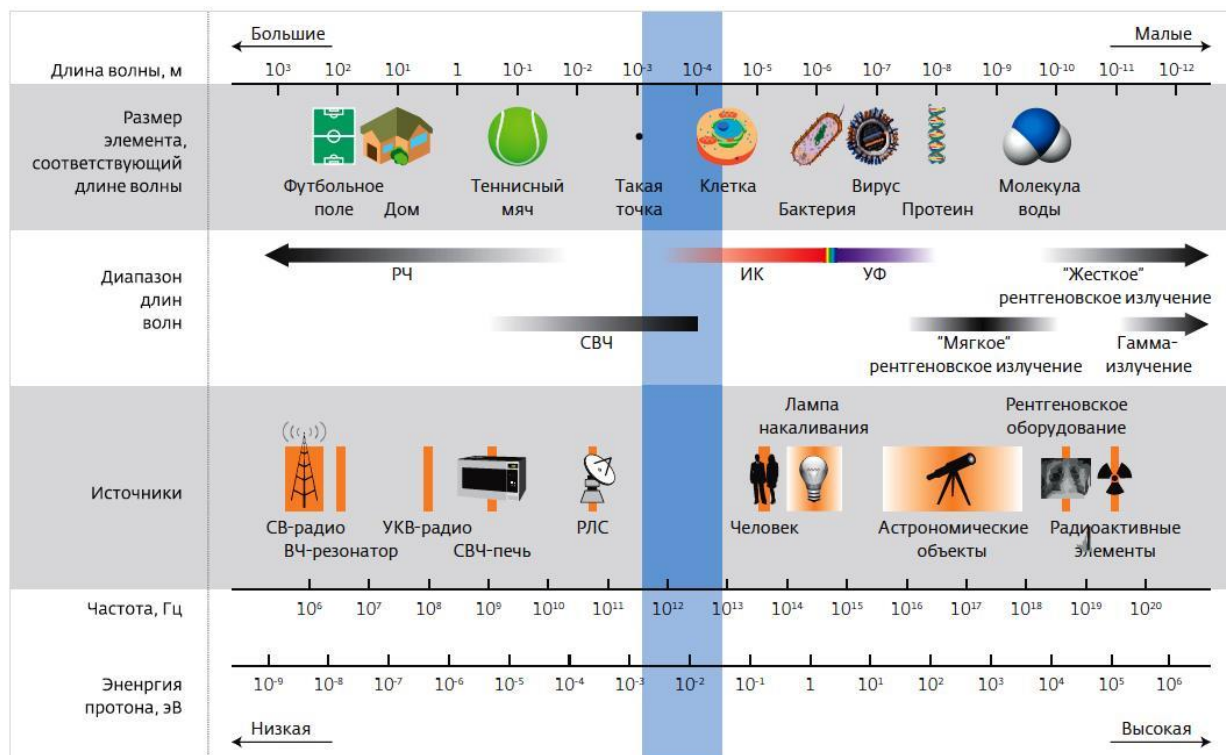


Рисунок 1 [Майская В., 2011]. Электромагнитный спектр.

Сложность генерации ТГц излучения заключается в том, что методы, успешно применимые для соседних инфракрасного и микроволнового диапазонов, плохо подходят ТГц диапазону. Действие оптических генераторов когерентного излучения (лазеров) основано на индуцированном излучении квантовых систем – атомов, ионов, молекул, находящихся в термодинамически неравновесных состояниях. В случае ТГц излучения активная среда многослойного кристалла, которая испускает ТГц излучение, его же и поглощает. В 2002 году в многослойный кристалл внедрили множество волноводов, выводящих излучение «наружу». Впервые был создан ТГц лазер, работающий на частоте 4,4 ТГц с мощностью 2 милливатта, в качестве активной среды у которого была многослойная структура из арсенида галлия и арсенида галлия-алюминия (GaAs/AlGaAs) [Kohler R. et al., 2002]. В данном случае происходящая при комнатной температуре тепловая релаксация лазерных уровней приводила к

выравниванию населенностей уровней электронами и квант ТГц излучения был невелик – эквивалентная температура излучения частотой 1 ТГц составляла всего 50 К. Вариантом решения этого вопроса является использование полусферических кремниевых линз для усиления когерентности излучения в квантаво-каскадном режиме излучения. В работе [Belkin M.A. et al., 2008] в качестве активной среды и резонатора использовалась сложная гетероструктура из чередующихся нанометровых слоев арсенида галлия-индия (GaInAs) и микрометровых слоев фосфида индия (InP). Авторам удалось достичь успеха в создании ТГц лазера, но интенсивность излучения при комнатной температуре была примерно в 30 раз меньше по сравнению с излучением генерируемом при 80 К. Несмотря на то, что квантово-каскадные лазеры являются перспективными источниками, генерировать ТГц излучение для них возможно только в условиях криогенного охлаждения.

Создание ТГц источников с использованием оптико-терагерцового преобразования, т. е. на основе воздействия лазерным излучением на вещество, сделало доступной область частот от сотен гигагерц (ГГц) до нескольких ТГц. Генерация узкого спектра ТГц частот осуществляется с использованием узкополосных или квазинепрерывных источников, спектр же широкополосных импульсных источников перекрывает существенную часть или даже весь ТГц диапазон. Лазерные методы генерации дают возможность не только «адресной» настройки на определенную ТГц частоту, перестройки в широком спектре, или настройки на широкий спектр частот, позволяя при этом работать при комнатной температуре, но и «привязывают» импульсы по фазе к породившему их лазерному импульсу. Это позволяет один и тот же лазерный импульс (разделенный на два) использовать для генерации ТГц импульса и для его детектирования электрооптическими методами. При этом можно измерить электрическое поле быстро осциллирующего ТГц излучения с очень высоким разрешением – порядка длительности фемтосекундного

лазерного импульса. На этом свойстве основан метод ТГц генерации и детектирования – ТГц спектроскопии во временной области (Terahertz Time-Domain Spectroscopy, THz TDS, впервые продемонстрирован в конце 80-х годов), при котором непосредственное измерение электрического поля позволяет извлекать информацию о сдвиге фазы ТГц поля при его взаимодействии с объектом и открывает возможности для исследования сверхбыстрых процессов, происходящих за доли пикосекунд [М. В. Царев, 2011].

В микроволновом диапазоне генерация излучения связана с движением (транспортом) носителей заряда. Для того, чтобы получить осцилляции носителей на ТГц частотах, необходимо приложить действие сильного электрического поля к небольшой области пространства, что имеет технические трудности. Действие синхротронов и ЛСЭ основано на переносе носителей заряда. Впервые ЛСЭ был запущен Элиасом с коллегами в 1975 году, к 1984 году удалось достичь настройки длины волны в пределах 390-1000 мкм и пиковой мощности 10 кВт [Elias L.R. et al., 1985]. Хотя большие размеры и дороговизна препятствуют распространению таких лазеров, они являются наиболее мощными источниками ТГц излучения. В настоящее время ТГц ЛСЭ установлены в России, США, Франции, Нидерландах, Италии. ЛСЭ имеют преимущественно научное значение, с их помощью получают важные результаты в широком кругу дисциплин, включая медицину и биологию [Kimmitt M.F., 2003]. Новосибирский ЛСЭ, работающий в ТГц диапазоне частот, имеет одни из наиболее высоких показателей по средней мощности (до 400 Вт) среди существующих аналогов в мире. Это открывает возможности для постановки и проведения уникальных экспериментов. [Bolotin V.P. et al., 2005].

Несмотря на сложности, связанные с генерацией излучения ТГц диапазона, это направление является одним из наиболее быстро развивающихся.

Интерес к ТГц излучению обусловлен рядом его особенностей. Излучение ТГц диапазона менее подвержено рассеянию по сравнению с видимым и ИК [Назаров М.М. и др., 2008]. В этом диапазоне прозрачны многие сухие диэлектрические материалы, такие как ткани, дерево, бумага. Поэтому ТГц излучение можно использовать для неразрушающего контроля материалов, сканирования в аэропортах, и пр. В ТГц диапазоне лежат резонансы вращательных и колебательных переходов многих молекул, расположены частоты межуровневых переходов некоторых неорганических веществ, являющихся также клеточными метаболитами (NO, CO, активные формы кислорода и др.) [Бецкий О.В. и др., 2003]. Именно ТГц диапазону соответствуют ротационные и вибрационные энергетические уровни полярных молекул, включая ДНК и белки, а также фононные резонансы кристаллических решеток, что позволяет развивать новые методы спектроскопии биологических и полупроводниковых образцов, проводить идентификацию молекул по их спектральным «отпечаткам пальцев». В сочетании с получением изображения (имиджингом) в ТГц диапазоне это позволяет определить не только форму, но и состав исследуемого объекта [Huber R. et al., 2001; Zhang X.C., Xu J., 2010]. Кроме того, это неионизирующее излучение, с различной интенсивностью поглощающееся разными биологическими тканями. Эта особенность открывает перспективы применения в медицине. Однако более опасное «рентгеновское» излучение заменить ТГц все же невозможно – высокое поглощение водой не позволяет ТГц излучению проникать глубоко в ткани, что ограничивает область его применения поверхностью тканей для определения их четких границ. В исследовании [Ангелуц А. А. и др., 2014] наиболее воспроизводимые и информативные измерения для диапазона 0,05-1,0 ТГц наблюдались при

толщине слоя воды 200 мкм, что обеспечивало коэффициент пропускания 0,2–0,5 и десятикратное превышение отношения сигнал/шум. Лидирующей сферой в данном направлении являются новые методы и оборудование диагностики опухолей, что возможно благодаря цитологическим различиям в здоровых и опухолевых клетках, в частности, различной степенью гидратированности. Это позволяет применять ТГц спектроскопию как дополнительный и весьма чувствительный метод детекции опухолей и определения их четких границ. В исследовании [Sim Y.C. et al., 2013] показана корреляция результатов визуализации границ опухолей на образцах ткани слизистой рта при комнатной (20°C) и низкой (-20°C) температуре с результатами гистологического анализа. Данное направление перспективно не только для ранней диагностики опухолей, но и для более точных действий при оперативных вмешательствах [Oh S.J. et al., 2014]. Также ТГц излучение может использоваться в качестве метода количественного анализа компонентов крови, таких как вода, плазма, эритроциты [Jeong K. et al., 2013]. Данное исследование открывает перспективы новых быстрых неинвазивных методов получения данных о крови.

Вследствие того, что ТГц излучение значительно поглощается водой, его свойства применимы для диагностики опухолевых процессов вблизи или на поверхности тела, а также для более четкой визуализации при оперативных вмешательствах. Однако, наряду с этим накладывается ограничение на диагностику внутренних органов. Для решения этой проблемы разрабатывается специальная эндоскопическая система. Ее реализация предполагается за счет миниатюрных модулей, один из которых будет проводить импульс по оптоволокну от титан-сапфирового лазера, а другой считывать сигнал. Размер устройства, контактирующего с телом, составляет 6x8 мм. На основе информации о показателях преломления можно будет делать выводы о состоянии исследуемой поверхности. Однако в коммерческих моделях должен быть продуман отвод жидкости от

исследуемого участка, поскольку на данном этапе показатели преломления от влажных поверхностей (язык, щеки) сопоставимы с показателями преломления от воды [Ji Y.B. et al., 2009]. Также разработан и протестирован с участием 35 человек компактный ТГц спектрометр, предназначенный для измерения уровня гидратации тканей [Echchgadda I. et al., 2013].

Таким образом, речь идет о скором внедрении в повседневную практику приборов на основе ТГц излучения и его непосредственном воздействии на человека.

1.2 Электромагнитное излучение – как фактор воздействия на живые организмы

Воздействия электромагнитных излучений различных спектров сопровождало зарождение и эволюцию живых организмов и оказало значительное влияние на них. Установлено, что электромагнитные поля во всех частотных диапазонах в большей или меньшей степени влияют на процессы жизнедеятельности живых систем. Являясь физическим фактором окружающей среды, электромагнитные излучения могут представлять опасность в отношении биообъектов. Наиболее неблагоприятными и разрушительными в отношении живых систем являются высокомошные ионизирующее, ультрафиолетовое и тепловое излучения, для защиты от которых у всех биообъектов в процессе эволюции были сформированы специфические системы защиты на генном уровне.

С другой стороны, нетермическое воздействие неионизирующих электромагнитных излучений также может оказывать влияние на процессы жизнедеятельности, при этом особняком стоит электромагнитное излучение миллиметрового и ТГц (субмиллиметрового) диапазонов. Длина волны излучения данных диапазонов сопоставима с размерами клеточных (субклеточных структур), и, следовательно, закономерно ожидать, что оно может затрагивать внутриклеточные регуляторные процессы. В настоящее

время доказано, что неионизирующее электромагнитное излучение оказывает действие как на прокариотические, так и на эукариотические клетки [Geletyuk V.I. et al, 1995; Grundier W. et al, 1992; Pakhomov A.G. et al., 1998; Гапеев А.Б., Чемерис Н.К., 2000; Катаев А.А. и др., 1993]. Например, запатентован способ определения воздействия электромагнитного излучения с помощью биолюминесценции бактерий-биосенсоров, заключающийся в определении воздействия электромагнитного излучения частотой 42 ГГц с помощью изменения биолюминесценции бактерий *Photobacterium leognathi* штамма 54 [Дрокина Т. В. и др., 2005]. В медицине существует целое направление – физиотерапия – в котором электромагнитное излучение используется в качестве дополнительного лечебного метода при различных заболеваниях: оно способно ускорять заживление тканей и оказывать противовоспалительный эффект [Девятков Н. Д. и др., 1991; Чубей М.Я., 1991; Дудников. Г.Н., Зайденберг М.А., 1979; Зайцева С.Ю., Донецкая С.В., 1995]. Исследования, направленные на выявление возможного вреда от электромагнитного излучения, показывают неоднозначные результаты. Выявлена положительная корреляция воздействия низкочастотных электромагнитных полей и риском возникновения анемии у детей [Schüz J., Ahlbom A., 2008]. Недавно высокочастотное электромагнитное поле было классифицировано как возможно канцерогенное для человека (группа 2B) Международным агентством по изучению рака (МАИР) [Baan R. et al., 2011].

В настоящее время существует множество гипотез о воздействии электромагнитного излучения на живые системы разного уровня организации [Fröhlich Н., 1982; Бецкий О.В., Лебедева Н.Н., 2001; Бецкий О.В., 1994; Гапеев А.Б., Чемерис Н.К., 2000б], но целостного представления, способного с единых позиций объяснить многообразные эффекты воздействия излучения, до сих пор нет.

Экспериментально определены приблизительные резонансные частоты для самой клетки и некоторых ее структур (таб. 1).

Таблица 1 [Илларионов В.Е., 1998]. **Резонансные частоты некоторых структур живой клетки.**

Клеточная структура	Приблизительная резонансная частота, Гц
соматическая клетка	$2,39 \times 10^{12}$
ядро соматической клетки	$9,55 \times 10^{12}$
митохондрии из клетки печени	$3,18 \times 10^{13}$
геном клетки человека	$2,5 \times 10^{13}$
хромосома интерфазная	$7,5 \times 10^{11}$
хромосома метафазная	$1,5 \times 10^{13}$
ДНК	$(2...9) \times 10^9$
Нуклеосома	$4,5 \times 10^{15}$
Рибосомы	$2,65 \times 10^{15}$
клеточные мембраны	5×10^{10}
цитоскелет	10^8
эритроциты	$(3,5...4,0) \times 10^{10}$

Исследование воздействия электромагнитного излучения ТГц диапазона на живые объекты – один из новых вопросов и актуальных направлений. В 2001-2004 годах был проведен масштабный международный проект «THz-BRIGE», преследующий такие цели как изучение воздействия излучения и его дозовой зависимости в пределах частот от 100 ГГц до 20 ТГц. Некоторые исследования проекта «THz-BRIGE» [<http://www.frascati.enea.it/THz-BRIDGE/>] выявили генотоксический эффект воздействия ТГц излучения. Так, было показано, что экспозиция в течение 6 часов 0,1 ТГц приводит к повышению геномной нестабильности человеческих лимфоцитов [Korenstein-Plan A. et al., 2008]. В исследовании [Ramundo-Orlando A., et al., 2007] воздействие ТГц излучения изменяло проницаемость мембран липосом. В другом исследовании воздействия излучения с параметрами 0,14 ТГц, пиковая мощность между 24 и 62 мВ/см² и временем облучения от 10 минут до 24 часов на человеческие лейкоциты периферической крови, культуру кераноцитов и нервных клеток человека показано отсутствие какого-либо эффекта [Bourne N. et. al., 2008]. Относительно дозовой

зависимости в отчетных материалах проекта «THz-BRIGE» было указано на необходимость проведения дополнительных исследований, поскольку некоторые эффекты наблюдались при дозах, более низких, чем предельно допустимые по ICNIRP (International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection). В других экспериментах, не связанных с «THz-BRIGE», выявлялся положительный эффект ТГц излучения на некоторые аспекты. В экспериментах *in vivo*, было показано, что воздействие излучением 150, 176-150, 664 ГГц стимулировало заживление ожоговых ран [Ostrovskiy, N. V., et al. 2005]. В исследованиях, где модельным объектом являлись растения, было показано, что воздействие стимулировало рост риса, бобов, пшеницы. [Xiong, S., Shaomin P., 1986; Xu M., Xiong S., 1988; Peng S., 1987]. Исследования, проведенные [Titova L. V. et al., 2013], показывают благоприятные согласованные изменения в экспрессии множества генов после воздействия интенсивными пикосекундными импульсами 0,5 ТГц при 220 кВ/см и 70 кВ/см в клетках человеческой кожи, задействованных в опухолевых и воспалительных процессах, что предполагает терапевтическое использование излучения. В работе [Федорова В. И. и др., 2012] показано, что отдаленным результатом воздействия ТГц излучения на стрессированных самок дрозофил является изменение соотношения расщепления полов в потомстве F1. В экспериментах по влиянию ТГц излучения на самцов мышей показано, что облучение с частотой 3,68 ТГц приводит к развитию реакции избегания и повышенному уровню тревожности у животных. Данные изменения в поведении сохраняются в течение суток после эксперимента [Бондарь Н.П. и др., 2008]. Также установлено, что крысы-самцы, которые подвергались ежедневному облучению в течение 5 дней волнами с частотой 167 ГГц, сохраняют нормальные поведенческие реакции поиска, проявления любопытства, активную положительную коммуникацию. Крысы-самцы, которые подвергались облучению той же продолжительности и интенсивности с частотой 144 ГГц, отличаются тревожным, беспокойным,

агрессивным поведением, имеют сниженные показатели аппетита и продолжительности сна [Киричук В. Ф. и др., 2009].

Несмотря на то, что ТГц провал был преодолен сравнительно недавно, смежная с ним область электромагнитного спектра достаточно активно задействована в медицине как миллиметровая крайневисокочастотная терапия (КВЧ), применяющаяся с целью активации саногенеза при лечении различных заболеваний.

Данный вид физиолечения представляет собой воздействие на организм электромагнитных волн с длиной волны от 1 до 10 мм и частотой от 30 до 300 ГГц, что в некоторой степени перекрывается с частотами от 100 ГГц до 20 ТГц, исследованными в международном проекте «THz-BRIGE». Еще Минздравом СССР были одобрены методики применения КВЧ-терапии в клинической практике. Для проведения КВЧ-терапии используется аппарат «Явь-1», сконструированный в НПО «Исток» в середине 1980-х годов на основании исследований, проведенных под руководством Н. Д. Девяткова и М. Б. Голанта [Голант М. Б., Шашлов В. А., 1985; Голант М. Б. и др., 1985; Голант М. Б., 1986; Голант М. Б., Реброва Т.Б., 1986; Девятков Н. Д. и др., 1982; Девятков Н. Д., Голант М. Б., 1982; Девятков Н. Д. и др., 1983а; Девятков Н. Д. и др., 1983б; Девятков Н. Д., Бецкий О. В., 1985]. В конце 1980-х вынесено положительное решение о серийном производстве аппарата [Пославский М. В. и др., 1989; Плетнев С. Д. и др., 1987].

В отношении биологических объектов были выделены следующие особенности взаимодействия ЭМИ КВЧ:

- только волны в КВЧ диапазоне могут возбуждаться в виде акустоэлектрических волн в бислойных мембранах клетки, что может привести к сильному влиянию на все функции клетки [Девятков Н. Д. и др., 1991];

- миллиметровые волны значительно сильнее волн других диапазонов поглощаются водой, которая содержится в том числе в коже человека [Кудряшова В. А. и др., 1999];

- размеры микроанатомической неоднородности кожи оказываются соизмеримыми с длиной волны КВЧ-излучения, что может привести к изменению рассеивающих свойств микронеоднородностей кожи – все это обуславливает сильную частотную зависимость биологического эффекта, при этом взаимодействие имеет узкорезонансный характер [Ситько С. П. и др., 1984];

- происходит поглощение этого излучения в атмосфере Земли (парами воды, молекулярным кислородом), что могло способствовать защите живых организмов в процессе эволюции от возможных внешних электромагнитных полей [Бецкий О. В. и др., 1999].

В некоторых работах теоретического характера показано воздействие излучения ТГц диапазона на модельные объекты. В работе [Alexandrov V. S. et al., 2010], где в основе расчетов лежала модель устойчивости свойств солитонов в биополимерах [Dauxois T. et al., 1993], было показано, что ТГц излучение способно оказывать влияние на образование динамических пространственно локализованных отверстий между комплиментарными цепями дцДНК. Хотя данное излучение является неионизирующим, что делает непосредственно денатурацию крайне маловероятной, согласно проведенным в работе расчетам выдвинуто предположение, что воздействие ТГц излучения на ДНК *in vivo* может существенно влиять на естественные динамические процессы в ДНК и, таким образом, участвовать в регуляции экспрессии генов и репликации. В работах [Hintzsche H. et al., 2012; Hintzsche H. et al., 2013] не выявлено какого-либо эффекта излучения 0,106 ТГц, 0,380 ТГц и 2,520 ТГц на ДНК.

Особняком стоят исследования, выполненные под руководством Киричука В. Ф., посвященные изучению регуляторных эффектов волн ТГц диапазона. Поскольку в ТГц диапазоне электромагнитных волн находятся спектры излучения и поглощения как различных биологических молекул, так и биологически активных веществ (NO, O₂, CO₂, OH⁻ и др.), были проведены исследования физиотерапевтического воздействия излучения при плотности

потока мощности излучения не превышающем 10 мВт/см^2 . В ходе проведенных исследований рассматривалось влияние ТГц терапии на гемодинамику и перфузию у животных, подвергнутых стрессовым воздействиям, а также роли NO-синтазного компонента цикла оксида азота.

Показано, что у белых беспородных крыс-самцов в состоянии острого иммобилизационного стресса под влиянием облучения поверхности кожи площадью 3 см^2 над областью мечевидного отростка грудины на частотах $150,176\text{-}150,664 \text{ ГГц}$ нормализуются показатели гемодинамики в брюшном отделе аорты и бедренной артерии, нормализуется перфузия микроциркуляторного русла, при этом воздействие реализуется при обязательном участии NO-синтазного компонента цикла оксида азота. Показано, что ТГц волны не реализуют своего положительного эффекта на гемодинамику как в магистральных артериях, так и в сосудах микроциркуляции у крыс-самцов, находящихся в состоянии острого иммобилизационного стресса, при блокаде NO-синтазы [Киричук В. Ф. и др., 2011а; Киричук В. Ф. и др., 2011б; Киричук В. Ф. и др., 2011в; Киричук В. Ф. и др., 2011г]. Продемонстрировано положительное влияние ТГц излучения, наиболее эффективное при 30 минутном режиме облучения, на частоте молекулярного спектра излучения и поглощения атмосферного кислорода $129,0 \text{ ГГц}$ на нарушенные коагуляционные свойства крови и процессы фибринолиза у белых крыс-самцов в состоянии иммобилизационного стресса [Киричук В. Ф., Цымбал А. А., 2010].

Также терапия ТГц излучением рассматривалась в клинических экспериментах у больных со стабильной и нестабильной стенокардией, где были получены результаты, свидетельствующие о присутствии положительного эффекта, повышающего антиангинальный и гипотензивный эффекты медикаментозной терапии [Паршина С. С и др., 2012].

1.2.1 Геносенсорные конструкции в исследовании устойчивости и адаптации биологической системы к конкретным воздействиям

Исследование механизмов воздействия ТГц излучения на живые объекты, а также процессов и генов, вовлеченных в эту ответную реакцию, является важной фундаментальной задачей. При этом нужно учитывать тот факт, что эволюционно организмы не сталкивались с данным видом излучения, и, следовательно, не имеют специфичных защитных систем от него. По аналогии с ионизирующим излучением, первоначально логично исследовать закономерности воздействия ТГц излучения у прокариот, что послужит необходимым фундаментом при интерпретации сложных механизмов, лежащих в основе процессов у высших организмов, возникающих как при воздействии ТГц излучения, так и впоследствии такого воздействия. Задачу выяснения механизмов воздействия ТГц излучения на бактериальную клетку можно разделить на две основных: во-первых, непосредственная детекция этой реакции и изучение ее динамики; во-вторых, определение конкретных генов и систем, реагирующих в ответ на воздействие ТГц излучения.

Реализовать этот подход можно с использованием репортерных генетических конструкций – геносенсоров. 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. 2).

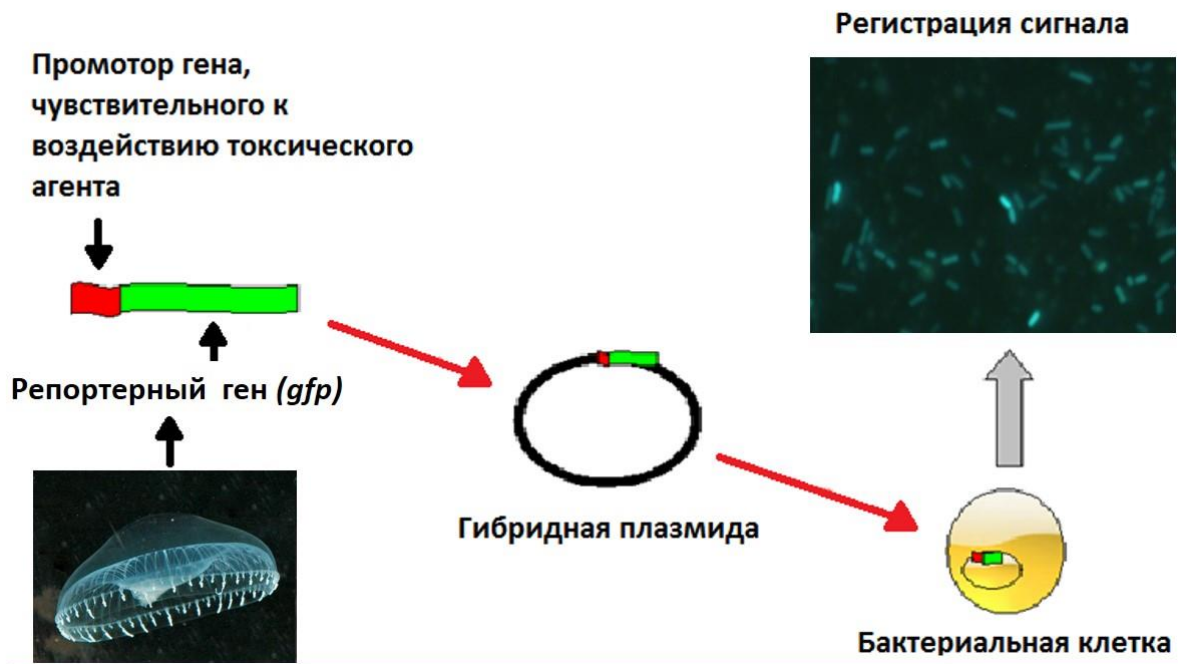


Рисунок 2. Принципиальная схема геносенсора.

В качестве репортерных зачастую используют гены, кодирующие люминесцентные и флюоресцентные белки (*luxAB* бактерии *Vibrio fischeri* или *Photorhabdus luminescens*, *lucFF* светлячка, *gfp* медузы *Aequorea victoria* и *dsred Dictiosoma*), которые легко детектируются [Hakkila, K. et al., 2002]. Кроме того, имеют значение размер репортерного гена и размер его продукта. Важны также время полураспада и время, необходимое для созревания белка.

Одним из наиболее часто используемых репортерных белков является белок GFP, который способен испускать зеленый свет с длиной волны 509 нм при его освещении ультрафиолетовым (395 нм) или синим (475 нм) светом. Белок GFP был открыт в 1961 году группой исследователей во главе с Шимомурой [Shimomura O. et al., 1962] при изучении биолюминесценции медузы *Aequorea victoria*. Белок состоит из 238 аминокислотных остатков и имеет молекулярную массу 26,888 кДа, кодируется тремя экзонами [Sambrook J., Russel D.W., 2001]. Вторичная структура GFP представлена одиннадцатью тесно переплетенными β -складками, которые окружают центральную α -спираль. Хромофор формируется при циклизации Ser-65, Туг-

66, Gly-67 [Cody C. et al., 1993] и располагается внутри α -спирали [Sambrook J., Russel D.W., 2001]. Хромофор GFP не требует специальных путей биосинтеза, он может сформироваться в клетках, которые обычно не испускают свет. Образование хромофора происходит в ходе посттрансляционной автокаталитической внутримолекулярной реакции исключительно в аэробных условиях [Sambrook J., Russel D.W., 2001; Heim R. et al., 1994]. Для GFP дикого типа время протекания этого процесса составляет 4 часа и включает в себя циклизацию и окисление тримера Ser-65, дегидро-Тур-66, Gly-67 [Heim R. et al., 1994]. GFP сохраняет способность к флюоресценции и в других организмах, не требуя антител, кофакторов, субстратов для проявления активности. Поэтому GFP является удобным маркером и используется в качестве репортера экспрессии генов в различных организмах [Sambrook J., Russel D.W., 2001; Elowitz M. B. et al., 1999]. Следует отметить, что флюоресценция GFP чувствительна к изменению pH. В кислом растворе (pH 4–6) она нестабильна и уменьшается во времени, однако в щелочных условиях наблюдаются значительные отличия: начиная с pH 10,0 и до 12,2, интенсивность флюоресценции нативного GFP (из *Aequorea victoria*) резко возрастает, при этом наблюдается большой сдвиг спектра поглощения и возбуждения. Максимум при 395 нм уменьшается по интенсивности, а плечо при 475 нм увеличивается в три раза [Ward W. W., Vokman S. H., 1982]. Такой pH-зависимый сдвиг спектров поглощения и возбуждения в экстремально щелочном диапазоне pH может быть результатом ионизации Тур-66 в хромофоре и/или депротонирования Arg-96, который стабилизирует енольную форму имидазолидона хромофора [Youvan D. C., Michel-Beyerle M. E., 1996].

Таким образом, использование GFP дикого типа ограничено некоторыми неудобствами:

- посттрансляционная модификация, необходимая для образования хромофора протекает медленно из-за того, что он скрыт в глубине β -складчатой структуры;

- невозможно точно предсказать, будет ли в каждом отдельном случае единый белок, сшитый с GFP, генерировать флюорофор, способный функционировать;
- GFP демонстрирует значительные изменения спектра в зависимости от рН, ионной силы и концентрации белка, поэтому важно исследовать GFP в стандартных условиях.

В связи с этим чаще используется ген, кодирующий белок GFP_{aaV} [Andersen J. et al, 1998, Keiler K. C. et al, 1996] с пониженной стабильностью. Предшественником этого белка является GFP_{mut3}, который характеризуется в 20 раз более интенсивной флюоресценцией, чем GFP дикого типа, при максимуме поглощения $\lambda=488$ нм. Кроме того, его флюорофор слабо поглощает ультрафиолет. Из-за такого удачного сочетания свойств именно GFP_{mut3} был выбран для создания нового, нестабильного мутанта. Последовательность гена *gfpmut3* была модифицирована таким образом, что к его 3' концу присоединили *ssrA* РНК последовательность вместо нормального стоп-кодона. Транскрипт *ssrA* в *E. coli* представляет собой молекулу РНК длиной 362 нуклеотида. Система *ssrA*-опосредованной модификации белков была обнаружена как в грамположительных, так и в грамотрицательных бактериях. SsrA-транскрипт связан с белками, транслированными с неполной или поврежденной РНК. Такие белки становятся субстратами для специфической протеазы в периплазме или для ее гомолога в цитоплазме. За счет изменения трех последних аминокислот в последовательности, узнаваемой протеазой, были получены белки с пониженными стабильностями, в том числе GFP_{aaV}, (далее GFP) время полужизни которого составляет 60 мин [Andersen J. et al, 1998; Keiler K. C. et al, 1996]. Ген, кодирующий именно этот белок, был использован в качестве репортерного в данной работе.

Геносенсорные конструкции показали себя удобными и исключительно чувствительными системами. Их применяют как в научных исследованиях,

так и для разработок, имеющих практическую ценность. На основе подобных конструкций разрабатываются тест-системы для определения крайне низких концентраций разнообразных субстанций в среде, например, для контроля чистоты сточных вод [Kibena E. et al., 2012; Kim C., Gu M. B., 2003; D'Souza S.F., 2001]. Эффективные биосенсоры, представляющие собой репортерные плазмидные конструкции на основе промоторов генов, индуцирующихся в ответ на окислительный стресс [Belkin S. et al., 1996; Khlebodarova T. M. et al., 2007], присутствие тяжелых металлов [Tauriainen S. et al., 1998] и антибиотиков [Melamed S. et al., 2012], уже были разработаны и протестированы в различных исследовательских работах. Следует отметить, что для этого направления важной частью является теоретический подход, который включает биоинформационные методы распознавания потенциальных сайтов связывания в структуре промоторов различных генов, что позволяет подобрать оптимальные промоторы для создания целевых конструкций [Khlebodarova T. M. et al., 2007]. В свою очередь, изучение реакции геносенсоров дает материал для понимания и прогнозирования механизмов взаимодействия различных систем стрессовых ответов в клетке и характеристики параметров конкретного геносенсора в условиях определенного эксперимента [Rogers J. K. et al., 2015].

1.3 Механизмы регуляции стрессовых реакций *E. coli*

В течение жизни бактериальная клетка постоянно подвергается воздействиям как со стороны собственных метаболитов, избыток или недостаток которых может быть губителен, так и со стороны окружающей среды вследствие резких изменений условий обитания: температуры, осмотического давления, рН, содержания кислорода, облучения солнечным светом и некоторыми другими факторами. В процессе эволюции бактерии развили механизмы, позволяющие адаптироваться к неблагоприятным условиям и сохранять жизнеспособность путем активации определенных, координировано экспрессирующихся генов и за счет наработки/изменения

активности регуляторных белков. Совокупность таких генов, их белковых продуктов и взаимосвязей между ними объединяется в генную сеть.

Описано более десятка генных сетей, которые активируются в ответ на различные виды стресса [Hengge-Aronis R., 1999]. Это позволяет клетке снизить или ликвидировать повреждающий эффект токсических агентов на ее структуру и функции. Известно, что иногда один и тот же стрессирующий фактор способен индуцировать как специфичную генную сеть, характерную именно для этого фактора, так и генные сети, характерные для других видов стресса. Таким образом, в ответ на определенный вид стресса активируется несколько генных сетей, что помогает клетке справиться с последствиями воздействия.

Воздействие высоких доз ТГц излучения является новым фактором, отсутствующим в природных условиях, следовательно, живые организмы не имеют слаженных и устоявшихся систем сигнализации и защиты при его воздействии. Тем не менее, реакцию бактериальной клетки на ТГц излучение возможно зарегистрировать и интерпретировать, опираясь на уже известные механизмы стрессовых ответов *E. coli* – детально изученного модельного объекта в экспериментальной биологии.

1.3.1 Окислительный стресс

Окислительному стрессу подвержены все организмы с аэробным дыханием, поскольку образование АФК является следствием нормального метаболизма. Большинство АФК, таких как пероксид водорода, супероксидный и гидроксильный радикалы, являются побочными продуктами в электронно-транспортной цепи в процессе окислительного фосфорилирования [González-Flecha B., Demple B., 1995; Lushchak Vl., 2011] (рис. 3).

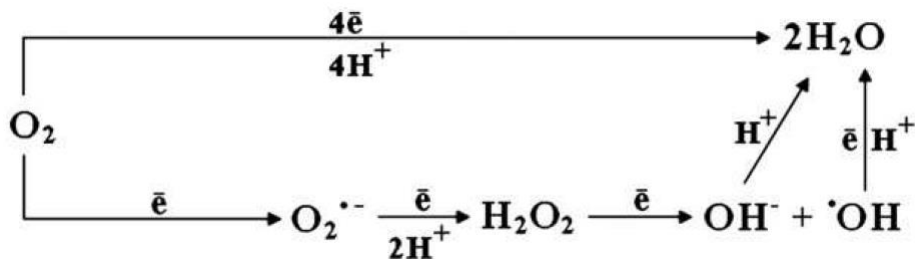


Рисунок 3 [Lushchak V.I., 2011]. Пути восстановления кислорода в биологических системах.

При этом АФК оказывают негативное действие на все биомолекулы – ДНК, РНК, белки и липиды, вызывая изменения в их функциональности: например, «дисульфидный стресс» у белков в результате образования нежелательных дисульфидных связей [Aslund F. et al., 1999] или перекисное окисление липидов, приводящее к повышению текучести мембран и, в конечном итоге, нарушению целостности и гибели клеток [Cabisco E. et al., 2000]. Закономерно, что в бактериальных клетках, подверженным в том числе и множеству сторонних воздействий, выработались механизмы поддержания АФК на определенном уровне со стационарной концентрацией $<10^{-8}$ М [Gutteridge J. M., Halliwell B., 1992], а также способы репарации повреждений вследствие воздействия АФК.

Адаптивный ответ клеток *E. coli* на окислительный стресс заключается в активации двух механизмов, координирующихся глобальными транскрипционными регуляторами – системой SoxRS и ТФ OxyR, в результате чего происходит индукция экспрессии множества генов, кодирующих белки с антиоксидантной и репарирующей активностью.

1.3.1.1. Механизм с участием регулона *oxyR*

Регулон OxyR играет центральную роль в защите клеток *E. coli* против эндогенного окислительного стресса от пероксида водорода, образующегося в результате активного аэробного роста [González-Flecha B., Demple B., 1995; González-Flecha B., Demple B., 2000] (рис. 4).

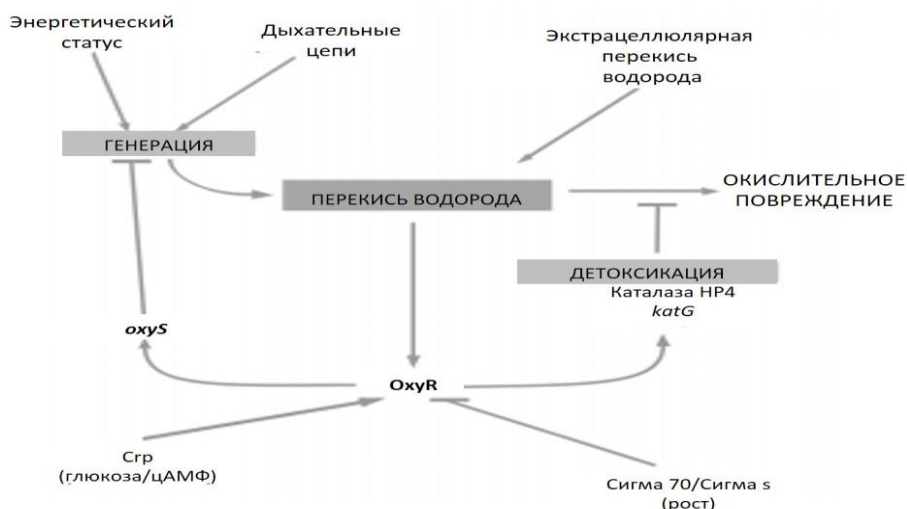
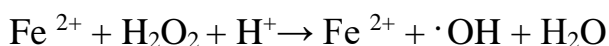
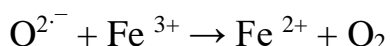


Рисунок 4 [González-Flecha В., Demple В., 2000]. **Уровни регуляции внутриклеточной концентрации перекиси водорода.** (→): активация, (⊥): ингибирование.

Повреждающее действие пероксида водорода связано прежде всего с реакцией Фентона – прямым окислением несвязанных внутриклеточных ионов восстановленного железа, что приводит к образованию гидроксильного радикала [Imlay J.A., Linn S., 1988; Henle E.S. et al., 1999]:

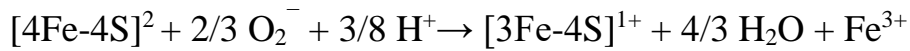


Гидроксильный радикал, образующийся в этой реакции – короткоживущий, но чрезвычайно активный и способный к дальнейшему взаимодействию с биомолекулами вблизи сайта своего образования [Park S. et al., 2005; Lushchak V.I., 2011]. Восстановителями окисленного железа являются НАД(Ф)Н, тиолы, свободные восстановленные флавины [Rowley D.A., Halliwell В., 1982; Woodmansee A.N., Imlay J.A., 2002]. Также эффективным восстановителем железа считают цистеин [Park S., Imlay J.A., 2003]. Супероксидный радикал способен напрямую восстанавливать трехвалентное железо:



Однако ввиду малой концентрации радикала, вклад этой реакции незначителен [Henle E.S., Linn S., 1997]. Более того, супероксидный радикал оказывает повреждающее действие, связанное со способностью высвобождать железо из центров железо-серных дегидратаз. В ходе этого

процесса происходит инактивация железосерных (Fe-S) кластеров ферментов и накопление несвязанного железа в цитоплазме, что потенцирует реакцию Фентона [Liochev S.I., Fridovich I. 1994; Jang S., Imlay J.A. , 2007; Flint D. H. et al., 1993]:



Под контролем ТФ *OxyR* находятся 9 из примерно 30 белков, которые являются основными звеньями в метаболических путях разложения пероксида водорода в бактериальных клетках. Прежде всего, это каталаза НРІ (hydroperoxidase I) – продукт гена *katG*, играющий большую роль при аэробном росте и каталаза НРІІ (hydroperoxidase II) – продукт гена *katE*, также индуцирующийся в стационарной фазе роста альтернативным сигма фактором σ^s (RpoS) – субъединицей РНК-полимеразы [Loewen P.C. et al., 1998]. Следует отметить, что для промотора гена *katG* помимо сайта связывания ТФ *OxyR* показано наличие гипотетического сайта связывания ТФ FNR, который отвечает за индукцию в анаэробных условиях таких ферментов цикла Кребса как сукцинат дегидрогеназа, фумараза, изоцитрат дегидрогеназа, участвующих в производстве энергии путем окислительного фосфорилирования. FNR также активирует экспрессию ферментов анаэробного дыхания, которые используют альтернативные конечные акцепторы электронов, такие как ДМСО, фумарат или нитрат. Помимо активации экспрессии необходимых в анаэробных условиях белков, FNR репрессирует такие аэробные респираторные ферменты как цитохромоксидаза и НАД(Ф)Н дегидрогеназа. Кроме дыхания, FNR также регулирует транскрипцию множества генов с другими функциями, такими как устойчивость к кислотам, хемотаксис и некоторыми другими [Kang Y. et al., 2005; Salmon K. et al., 2003].

Также к регулону *OxyR* относятся Mn-супероксид дисмутаза, алкилгидропероксидредуктаза (*ahpFC*), глутатионредуктаза (*gorA*), глутаредоксин 1 (*grxA*), связывающийся с ДНК белок (*dps*), копропорфириноген III редуктаза, арилсульфатаза, регулятор синтеза

капсулярного полисахарида, а также несколько белков теплового шока [Zheng M. et al., 2001].

OxyR в окисленной форме активирует транскрипцию OxyS — маленькой нетранслируемой РНК, которая косвенно регулирует примерно 20 генов, нарушая стабильность РНК или эффективность трансляции [Altuvia S. et al., 1997]. В частности OxyS является репрессором гена альтернативного сигма фактора σ^s – *rpoS* [Altuvia S. et al., 1998; Zhang A. et al., 1998].

ТФ OxyR – хорошо изученный белок размером 34,4 кДа, принадлежит к семейству LysR бактериальных ТФ. Очищенный белок OxyR существует в растворе как тетрамер [Kullik I. et al., 1995] и относится к активаторам класса I, которые взаимодействуют с альфа-субъединицей РНК-полимеразы на промоторе, активируя транскрипцию [Тao К. et al, 1993].

Синтез OxyR происходит и в отсутствие воздействия перекиси водорода, более того, при воздействии перекиси его экспрессия не увеличивается. Этот факт свидетельствует о том, что OxyR активируется посттрансляционно [Storz G. et al., 1990]. OxyR осуществляет регуляцию генов, распознавая тетрануклеотиды АТАG, разделенные спейсером 10 п. н. в промоторных областях генов. В восстановленной или окисленной форме OxyR связывается с этими сайтами по-разному. В восстановленной форме OxyR контактирует с двумя парами мотивов в больших бороздках, пространственно **разнесенных** (между парами один поворот спирали ДНК). В окисленной форме OxyR контактирует с четырьмя тетрануклеотидами расположенными также в больших бороздках, но **подряд**, при этом только окисленная форма способна активировать транскрипцию, связываясь с карбоксиконцевым доменом α -субъединицы РНК-полимеразы [Toledano M. B. et al., 1994].

In vivo транскрипционная активация OxyR в ответ на перекись водорода зависит от 2 цистеиновых остатков (Cys199 и Cys208), формирующих дисульфидные мостики [Zheng et al., 1998; Tao К., 1999; Imlay J. A., 2013] (рис. 5) и вызывающих конформационное изменение, которое влияет на

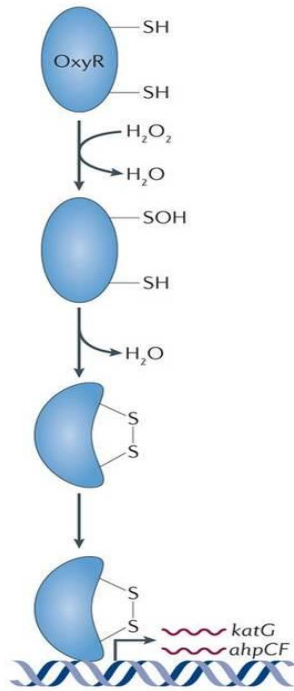


Рисунок 5 [Imlay J. A., 2013]. Активация OxyR перекисью водорода.

связывание с ДНК. Замена цистеинового остатка в позиции 199 на остаток серина инактивирует белок [Storz et al., 1990]. Существует точка зрения, что активность ТФ OxyR контролируется также путем различных модификаций цистеинового остатка Cys199 в ответ на различные стрессы.

При окислительном стрессе образуется производное сульфеновой кислоты C199SOH, при воздействии нитрозотиолов образуется C199SNO, при дисульфидном стрессе формируется смешанный дисульфид с глутатионом C199SSG, то есть присутствует глутатионирование [Kim S.O. et al., 2002 Hausladen A. et al., 1996]. Таким образом, возможно, что различные модификации Cys199 способны инициировать различные транскрипционные ответы при действии разных стрессов, а связь Cys199 и Cys208 не играет роли в его регуляции.

Транскрипция генов регулона *OxyR* происходит параллельно при появлении и поддержании окисленной формы OxyR *in vivo*. ТФ OxyR чувствителен как к перекиси водорода, так и к изменениям в клеточном тиоловом статусе [Pomposiello et al., 2001]. И в окисленной, и в восстановленной формах OxyR выступает в качестве репрессора собственной транскрипции [Toledano M. V. et al., 1994].

Существуют две различных реакции, определяющих статус OxyR. Экспериментально показано, что глутаредоксин I восстанавливает OxyR *in vivo*. Это выявлено по пролонгированному ответу мутантных клеток по гену *grxA* (глутаредоксин I) на воздействие перекиси водорода. В условиях нормального роста осуществляется равновесие окисленной и восстановленной форм, преобладает первый путь (рис. 6,1). При увеличении внеклеточной концентрации перекиси более 5 мкМ, доминирует вторая

реакция, и окисленная форма становится основной. Эта окислительная реакция происходит очень быстро, примерно за 30 секунд; после удаления из среды перекиси водорода окисленную форму OxyR можно обнаружить в клетке еще в течение 5 минут (рис. 6,2) [Aslund F. et al., 1999].

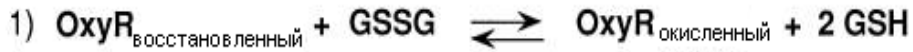


Рисунок 6 [Aslund F. et al., 1999]. Пути восстановления и окисления OxyR.

1) В условиях нормального роста при низкой концентрации пероксида водорода преобладает первый путь с участием глутатиона.

2) При увеличении внеклеточной концентрации перекиси >5 мкМ доминирует вторая реакция.

С окислительным стрессом связан и метаболизм железа: OxyR является положительным регулятором железо-связывающего репрессора переноса железа Fur [Zheng M. et al., 1999]. Таким образом, через OxyR может осуществляться непрямая активация генов, регулятором которых является Fur.

1.3.1.2 Механизм с участием регулона SoxRS

Регулон *SoxRS* – это система из двух транскрипционных факторов SoxR и SoxS. Активация этого регулона происходит исключительно в условиях окислительного стресса и может быть вызвана агентами, генерирующими супероксид-анионы, такими, например, как паракват и менадион [González-Flecha B., Demple B., 2000].

Гены *soxS* и *soxR* кодируют два транскрипционных активатора, которые, в конечном счете, модулируют экспрессию более 16 других генов, таких как *sodA* (Mn-содержащая супероксид-дисмутаза), *zwf* (глюкозо-6-фосфат дегидрогеназа), *fldA* и *fldB* (2 флаводоксина), *fpr* (НАД(Ф)Н-ферредоксин редуктаза), *fur* (железо-связывающий репрессор переноса железа), *nfo* (эндонуклеаза IV, участвующая в репарации ДНК), *acrAB* (экспортирующий насос) и *micF* (нетранслируемая РНК, которая уменьшает экспрессию порина

OmpF). Белки, экспрессия которых индуцируется системой SoxRS, действуют совместно и устраняют возможный ущерб от оксидативного стресса, используя механизмы удаления оксидантов (супероксид дисмутаза), репарацию ДНК (эндонуклеаза IV), восстановление окисленных металлов в простетических группах (флаводоксин и ферредоксин редуктаза) и системы НАДФН (глюкозо-6-фосфат дегидрогеназа), снижение проницаемости (*micF*) и экскрецию токсинов (порины). Активация генов регулона *SoxRS* увеличивает устойчивость клетки не только к супер-оксид генерирующим агентам, но и к органическим растворителям, а также оксиду азота (NO), который может генерироваться антибиотиками [Pomposiello P. J., Demple B., 2001].

Чувствительным звеном этой системы является белок SoxR, который продуцируется постоянно на низком уровне примерно 100 молекул на клетку. В ответ на появление супероксид-образующих агентов он приобретает свойства TF за счет окисления кластера $[2Fe-2S]^+$ и активирует ген *soxS* [Hidalgo E. et al., 1996], продукт которого в свою очередь индуцирует экспрессию всех вышеперечисленных генов.

SoxR – полипептид размером 17 кДа [Tsaneva I.R., Weiss B., 1990], принадлежащий к семейству белков MerR, к нему же относятся некоторые регуляторы устойчивости к антибактериальным веществам, например, TirA и BmrR [Wu J. et al., 1995], а также металл-чувствительные регуляторы, в том числе CueR – регулятор гомеостаза меди в *E. coli*. Характерными особенностями белков, принадлежащих к семейству MerR, является связывающий ДНК домен спираль-поворот-спираль на N-конце и активация транскрипции путем белок-зависимого изгибания ДНК промоторов регулируемых генов [Brown N.L. et al., 2003]. Большинство белков MerR семейства являются активаторами транскрипции.

SoxR формирует в растворе димер, каждый мономер которого содержит $[2Fe-2S]$ кластер [Hidalgo et al., 1995; Wu J. et al., 1995]. В этом состоянии белок неактивен. Окисленная форма $[2Fe-2S]$ кластера – $(Fe^{3+}-Fe^{3+})$ –

изменяет структуру белка SoxR, и он становится способен к активации транскрипции. Следует отметить, что гены *soxR* и *soxS* расположены рядом друг с другом и транскрибируются в противоположные стороны, причем их промоторные области перекрываются. В условиях окислительного стресса SoxR, связывается со своим сайтом, находящимся в области между нуклеотидами

–10 и –35 в промоторной области локуса *SoxRS* (рис. 7), блокирует собственную транскрипцию и изменяет структуру промотора таким образом, что РНК-полимераза становится способной к активации транскрипции гена *soxS* [Hidalgo et al., 1994]. SoxS имеет сайты связывания в промоторах других генов, которые он и активирует в условиях стресса [González-Flecha B., Demple B., 2000].

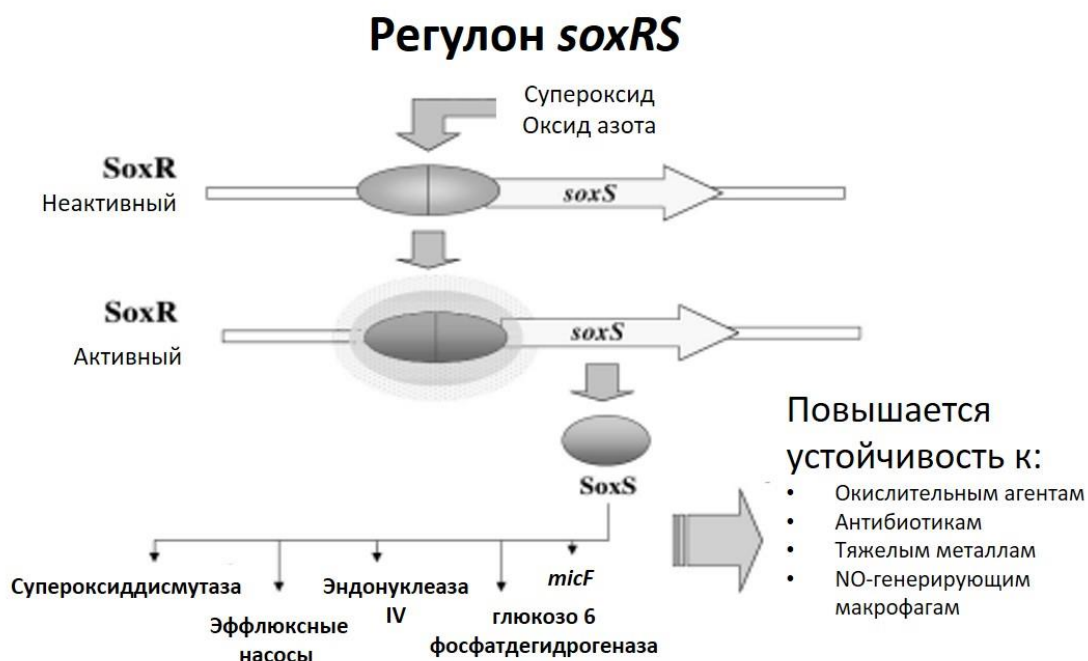


Рисунок 7 [González-Flecha B., Demple B., 2000]. **Схема локуса *SoxRS*.**

В условиях длительного стресса накопление мРНК *soxS* прекращается, ее стабильность падает и ее количество в клетке резко уменьшается [Ding B., Demple H., 1997]. По-видимому, это один из механизмов восстановления работы клетки даже в условиях длительного стресса. Не исключено, что и низкая аффинность (т.е. необходимость высокой концентрации ТФ SoxS для

активации генов-мишеней) SoxS является необходимым компонентом прекращения стрессорной реакции в условиях длительного стресса.

Активация гена *soxR* возможна также NO· радикалом с образованием динитрозил-железо/дителиоловых производных. Такая активация не зависит от присутствия кислорода. Поэтому NO – более эффективный активатор SoxR в анаэробных условиях. Таким образом, кислород-зависимые продукты NO, такие как пероксинитрит, не включены в передачу сигнала к SoxR [Nunoshiba et al., 1995].

Механизм NO-зависимой активации SoxR осуществляется следующим образом: NO реагирует с железо-сульфитными центрами белка, продуцируя смешанные динитрозил-железо-дителиол комплексы. Нитрозилированная форма SoxR примерно также активирует транскрипцию гена *soxS in vitro* как окисленный SoxR [Ding B., Demple H., 2000]. *In vivo* нитрозилированный SoxR имеет активность, сравнимую с той, которую имеет окисленный SoxR. Динитрозил-железо-дителиол комплексы активно распадаются *in vivo* и замещаются нормальными [2Fe-2S] кластерами [Pomposiello P. J., Demple B., 2001].

В антиоксидантную защиту клеток вовлечен еще один регулятор – альтернативный сигма фактор σ^s , регулирующий адаптационный ответ в стационарной фазе. Он кодируется геном *rpoS* и регулирует активность большого числа генов, в том числе антиоксидантных генов *katG*, *dps* и *gor* [Hengge-Aronis R. et al., 2002].

В таблице 2 представлены основные защитные системы *E. coli*, активируемые окислительным стрессом.

Таблица 2. Основные защитные механизмы клетки *E. coli* от окислительного стресса

Регулон <i>SoxRS</i> (индуцируемый супероксид анионом)	Регулон <i>OxyR</i> (индуцируемый перекисью водорода)	Регулон σ^s (индуцируемый перекисью водорода и супероксид анионом)
<i>sodA</i> – супероксид дисмутаза <i>nfo</i> – эндонуклеаза IV; <i>acnA</i> – аконитаза	<i>katG</i> – каталаза (гидропероксидаза I) <i>ahpCF</i> – алкилгидропероксид	<i>katE</i> – гидропероксидаза II; <i>xthA</i> – эндонуклеаза III;

<p><i>tolC</i> – внешний мембранный белок</p> <p><i>micF</i> – регуляторная РНК, репрессия экспрессии внешнего мембранного белка</p> <p><i>fldA</i> – флаводоксин А</p> <p><i>fpr</i> – ферредоксин/флаводоксин NADP⁺ редуктаза</p> <p><i>ribA</i> – ГТФ циклогидролаза II</p> <p><i>zwf</i> – глюкозо-6-фосфат дегидрогеназа</p> <p><i>inaA</i> – неизвестная функция;</p> <p><i>pqi5</i> – неизвестная функция</p> <p><i>fumC</i> – фумараза участвует в ЦТК</p> <p><i>fur</i> – центральный регулятор метаболизма железа</p> <p><i>acrAB</i> – эффлюксный насос токсичных веществ</p>	<p>редуктаза</p> <p><i>grxA</i> – глутаредоксин I</p> <p><i>gorA</i> – глутатион редуктаза</p> <p><i>oxyS</i> – регуляторная РНК (защита от мутагенеза)</p> <p><i>dps</i> – неспецифический белок, связывающийся с ДНК</p> <p><i>hemF</i> – копропорфиноген III оксидаза</p> <p><i>rscC</i> – регулятор капсулярных полисахаридсинтезирующих генов</p> <p><i>f497</i> – белок, гомологичный арилсульфатаз ферментам;</p> <p><i>fur</i> – центральный регулятор метаболизма железа</p>	<p><i>sodC</i> – супероксид дисмутаза;</p> <p><i>sodB</i> – супероксид дыисмутаза.</p>
---	---	--

1.3.2 Гомеостаз ионов меди

Медь является важнейшим микроэлементом, необходимым для нормального протекания множества биопроцессов. Механизмы, благодаря которым медь поступает в *E. coli*, остаются неясными, но известно, что в клетке содержится около 10^4 атомов меди (примерно 10 мкМ) – так называемая «медная квота», необходимая для нормальной физиологии [Finney L.A., O'Halloran T.V., 2003]. Например, медь входит в состав супероксиддисмутазы SodC, или CuZnSOD, выполняющей важную роль в преобразовании супероксидных радикалов до перекиси водорода и воды [Pena M. M. et al., 1999]. Избыток меди, также как и недостаток, способен приводить к серьезным патофизиологическим состояниям, поэтому в бактериальных клетках существуют системы, контролирующие содержание этого металла.

Регуляция гомеостаза ионов меди в *E. coli* осуществляется с помощью транскрипционного фактора CueR и двухкомпонентной системы CusRS.

ТФ CueR также как и SoxR является димером и принадлежит к семейству MerR. Для CueR также характерно наличие связывающего ДНК домена спираль-поворот-спираль и активация транскрипции путем белок-зависимого изгибания ДНК промоторов регулируемых генов [Brown N.L. et al., 2003].

Под регуляторным контролем CueR находятся ген мультимедной оксидазы CueO, которая осуществляет детоксикацию ионов меди и ген *copA*, кодирующий АТФ-азный насос Р-типа, который является центральным компонентом поддержания гомеостаза меди и осуществляет экспорт ионов в периплазматическое пространство [Outten F.W. et al., 2000; Petersen S., Moller, L.B., 2000]. При пролонгированном воздействии 0,5 мМ CuSO₄ уровень CueR повышается примерно в 5 раз и составляет 320-400 молекул на клетку [Yamamoto K., Ishihama A., 2005].

Двухкомпонентная система CusRS регулирует транскрипцию оперона *cusCFBA*.

Гены, кодирующие ТФ CusR и CusS направлены противоположно регулируемым ими генов оперона *CusCFBA*, при этом CusR – ответный регулятор, CusS – сенсорная киназа (рис. 8).

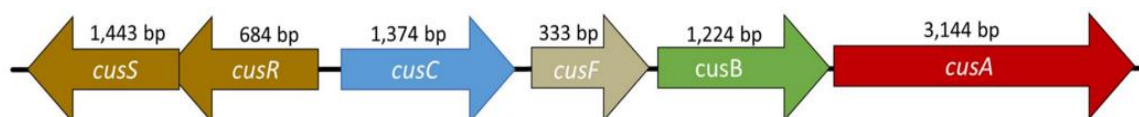


Рисунок 8 [Anes J. et al., 2015]. Схематичное изображение позиции и размеров генов двухкомпонентной системы CusRS и регулируемого ей оперона *CusCFBA*.

Продукты генов *cusC*, *cusB* и *cusA* оперона *CusCFBA* образуют систему из трех компонентов, охватывающую внутреннюю и внешнюю мембраны, и при помощи CusF осуществляют функцию экспорта ионов меди из цитоплазматического и периплазматического пространства во внешнюю среду. Функции белков оперона *CusCFBA* распределены следующим образом: CusC – белок, который обеспечивает канал во внутренней мембране, CusA – пермеаза, осуществляющая транспорт ионов меди в цитоплазме и периплазме, CusB – член семейства белков, встраиваемых в

мембрану (membrane fusion protein, MFP), CusF – периплазматический шаперон, взаимодействующий с CusC и CusB [Franke S. et al., 2003]. Нуль-мутанты по гену *cusR* показывают высокий уровень чувствительности к меди только в анаэробных условиях. Уровень индукции CusC при низких концентрациях меди выше также в анаэробных условиях, в аэробных условиях незначительная активация происходит при концентрации ионов меди выше 0,5 мМ. В среднем количество молекул CusR при стрессе от избытка ионов меди меняется мало и составляет 50-100 молекул на клетку. Таким образом, система CusSR участвует в обеспечении устойчивости к ионам в анаэробных условиях, где происходит увеличение их токсичности, но только в дополнение к эффлюксу меди при помощи CopA, экспрессия которого в анаэробных условиях также увеличивается [Thieme D. et al., 2008; Outten F.W. et al., 2001].

Анализ транскрипционного геномного профиля при помощи ДНК-микрочипа в исследовании [Yamamoto K., Ishihama A., 2005] показал быстрое (в течении 5 минут) изменение экспрессии для ряда генов. Для 9 генов: *cysK* (цистеин синтаза А), *cysN* (сульфат аденилилтрансфераза), *cysP* (тиосульфат-связывающий протеин), *hyfG* (формат гидрогеназа), *htrA/degP* (периплазматическая серин протеаза), *ubiK* (аспарагиназа), *yeeD* (не выясненная белковая активность), *yeeE* (не выясненная белковая активность), и *zntA* (цинковый АТФазный экспортер Р-типа) были выявлены изменения экспрессии, аналогичные воздействию ионов цинка. Специфичное повышение (только для *aldH* –понижение) мРНК в результате воздействия ионов меди на *E. coli* было выявлено для 30 генов [Yamamoto K., Ishihama A., 2005] (таб. 3).

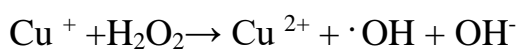
Таблица 3. Изменение экспрессии генов при воздействии ионов меди на *E. coli*.

Ген	Функция
Регулон CusR	
<i>cusB</i> *	Транспорт ионов меди и серебра
<i>cusC</i> *	Транспорт ионов меди и серебра
<i>cusF</i> *	Периплазматический медь-связывающий

	белок
<i>yedV</i>	Предполагаемая сенсорная киназа
<i>yedW</i>	Предполагаемый ответный регулятор
Регулон <i>cueR</i>	
<i>copA</i> *	Экспорт ионов меди
<i>cueO</i> *	Периплазматическая мультимедная оксидаза
<i>toaB</i>	Молибденовый кофактор синтеза, белок В
<i>toaC</i>	Молибденовый кофактор синтеза, белок С
<i>toaD</i>	Молибдоптериновый конвертирующий фактор, Субъединица 1
<i>toaE</i>	Молибдоптериновый конвертирующий фактор, Субъединица 2
Регулон <i>CpxR</i>	
<i>cpxP</i>	Периплазматический белок, экстраплазматический стрессовый ответ
<i>ebr</i>	Устойчивость к бромистому этидию
<i>spy</i>	Периплазматический белок
<i>yccA</i>	Мембран-ассоциированный предположительный транспортер
<i>yecI</i>	Ферритино-подобный белок
<i>ybaJ</i>	Неизвестно
<i>ycfS</i>	Неизвестно
<i>ydeH</i>	Неизвестно
<i>yebE</i>	Неизвестно
<i>yqjA</i>	Неизвестно
JW1832	Неизвестно
Неклассифицированные гены	
<i>aldH</i> **	Альдегиддегидрогеназа
<i>aphA</i>	Кислая фосфатаза
<i>mutL</i>	Репарирующий энзим (methyl-directed mismatch)
<i>tesA</i>	Ацил-КоА тиоэстераза I
<i>htpX</i>	Мембранная протеаза, индуцируемая тепловым шоком
<i>soxS</i>	Транскрипционный фактор регулона ответа на супер оксид
<i>yciW</i>	Предположительная оксидоредуктаза
<i>yeeF</i>	Предположительный транспорт аминокислот
<i>yncJ</i>	неизвестно

*повышение экспрессии более чем в 3 раза; **понижение экспрессии более чем в 3 раза.

Несмотря на то, что избыток ионов меди очевидно токсичен для бактерий, фундаментальные механизмы клеточных повреждений вследствие такого воздействия до сих пор остаются не до конца понятными. Предполагается, что из-за особенностей свойств окислительно-восстановительного статуса ионов меди они похожи на ионы железа. Ионы меди аналогично и даже легче железа могут участвовать в реакциях, в том числе реакции Фентона, приводящих к образованию супероксид аниона, перекиси водорода, а также гидроксил радикала, крайне токсичного для клетки [Thomas C. et al., 2009; Hessel M. E., Franz K. J., 2015].



Однако в исследовании [Macomber L. et al., 2007] показано, что медь, окисленная перекисью водорода, в основном локализована в периплазме. Окислительный стресс при добавлении перекиси водорода индуцировал белки секвестрации железа, но не индуцировал белки, контролирующие уровень меди. Таким образом опровергалась гипотеза об окислительном повреждении ДНК при участии внутриклеточной меди. В работе [Grobe C. et al., 2014] показано, что связывающийся с ДНК белок Dps, участвующий в защите ДНК от повреждений, не играет роли в развитии устойчивости к избытку меди.

В другом исследовании [Macomber L., Imlay J., 2009], посвященном выяснению механизмов токсичности меди, использовались мутантные линии *E. coli* по генам *copA*, *cueO*, *cus*. В работе была показана блокировка ферментов, содержащих Fe-S кластеры, таких как ферменты биосинтеза аминокислот – дегидратаз, (изопропилмалат, дегидратаза и дигидроксикислая дегидратаза), а также фумаразы А, насыщение субстратом (малатом) которой защищало активный центр фермента от инактивации. Аналогичные данные получены в работе [Fung D.K. et al., 2013] (рис. 9).

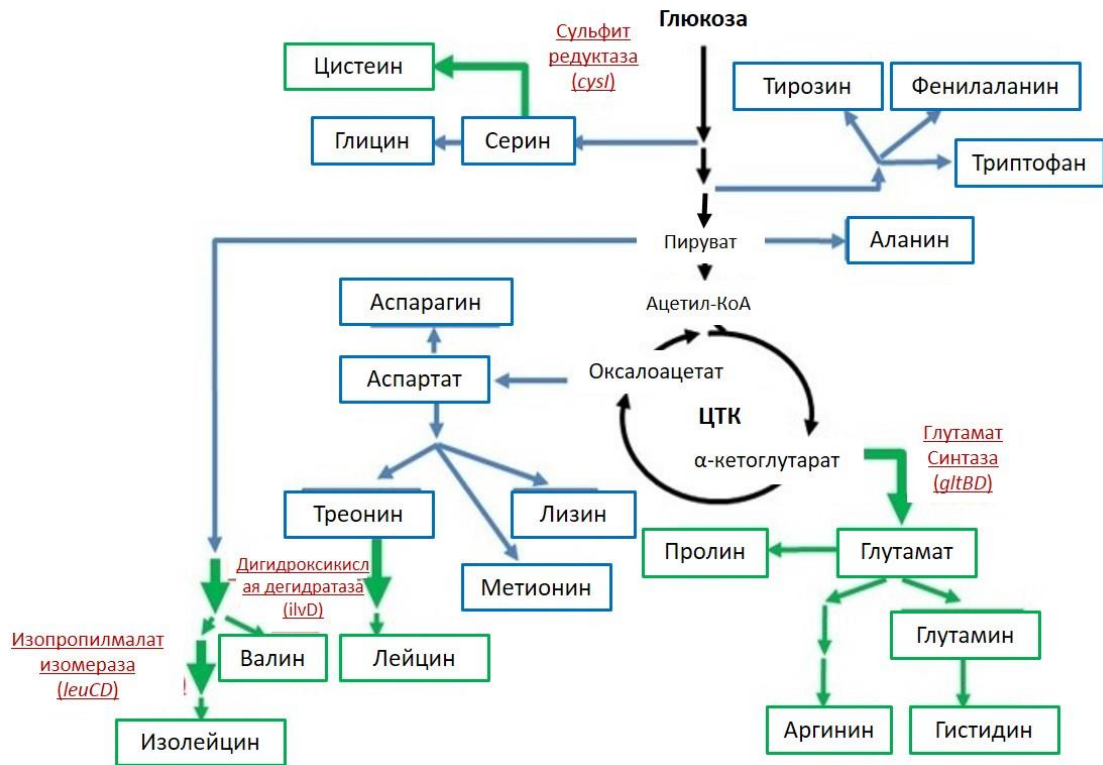


Рисунок 9 [Fung D.K. et al., 2013]. **Схема биосинтеза аминокислот с участием ферментов, содержащих Fe-S кластеры в селективных путях биосинтеза.** Аминокислоты, биосинтез которых происходит с вовлечением ферментов содержащих Fe-S кластеры показаны в зеленых рамках. Этапы, катализируемые ферментами, содержащих Fe-S кластеры, обозначены зелеными стрелками, сами ферменты – подчеркнутым красным шрифтом. Аминокислоты, биосинтез которых не требует ферментов, содержащих Fe-S кластеры показаны в голубых рамках, пути их биосинтеза обозначены синими стрелками.

Также были исследованы системы синтеза *de novo* и переноса Fe-S кластеров в *E. coli*. Основной системой, осуществляющей эти процессы в нормальных условиях является система ISC (iron-sulfur cluster). Механизмы процессов до конца не ясны, но эта система не обладает достаточной помехоустойчивостью и ингибируется перекисью водорода и супероксид анионом [Macomber L., Imlay J., 2009]. В *E. coli* при подавлении системы ISC, индуцируется другая система сборки кластеров Fe-S – Suf, которая устойчива к перекиси водорода и супероксид аниону. Для проверки необходимости системы Suf в условиях стресса от ионов меди были протестированы клетки, мутантные по системе Suf, которые выращивались на среде содержащей глицерин и нитрат, для удовлетворения потребности в ферментах кластеров

Fe-S. Мутант оказался более чувствителен к меди, чем клетки дикого типа, что свидетельствует о влиянии меди и на систему ISC.

Было показано подавление роста клеточных культур *E. coli*, мутантных по гену *gshA* – первому в цепи биосинтеза глутатиона, для которого была продемонстрирована способность к образованию комплексов с медью *in vitro*, что означает потребность в глутатионе при стрессе от избытка ионов металла также *in vivo* [Grobe C. et al., 2014]. Следует отметить, что глутатион вообще играет важную роль в поддержании гомеостаза не только меди, но и Zn(II) и Cd(II), причем бактериальные клетки, содержащие лишь предшественник глутатиона – γ -глутамилцистеин – демонстрируют меньшую устойчивость к меди и кадмию, нежели в отсутствие и глутатиона, и γ -глутамилцистеина [Helbig K. et al., 2008].

Взаимодействие систем гомеостаза разных металлов в клетках бактерий остается предметом тщательного изучения. Известно, что при анаэробном росте бактерий одновременное воздействие меди и железа в концентрациях, характерных для окружающей среды соответственно 1 мкМ и 200 мкМ имеет синергический эффект, приводящий к задержке роста бактерий [Bird L.J., 2013]. При взаимодействии систем гомеостаза меди и железа важную роль играет мультимедная оксидаза CueO. Помимо ионов меди естественным субстратом для этого фермента является энтеробактин – белок, синтезируемый бактерией для активного транспорта железа из окружающей среды. Показано, что смесь энтеробактина и меди *in vitro* токсична для клетки, что, вероятно, является следствием перехода меди из формы Cu(II) в прооксидантную, более токсичную форму Cu(I), но добавление очищенной оксидазы CueO способствовало выживанию клеток. Добавление меди совместно с энтеробактином приводило к более выраженной индукции репортерной конструкции *cueO-lacZ*, чем добавление только меди [Grass G. et al., 2004]. И, наконец, делеция гена *fur* – центрального регулятора метаболизма железа в *E. coli* – приводила к гипречувствительности бактерий к воздействию ионов меди, которая ослаблялась при делеции гена

энтеробактина *entC*. Таким образом, CueO может играть центральную роль во взаимодействии между гомеостазом меди и железа [Grass G. et al., 2004].

1.3.3 Оперон *EmrRAB*

В *E. coli* существует несколько систем, формирующих устойчивость клетки к различным антибактериальным веществам [Grkovic S. et al., 2002] (таб. 4).

Таблица 4 [Grkovic S. et al., 2002]. Системы *E. coli*, формирующие устойчивость к антибактериальным веществам.

Регуляторный белок(ки)	Регуляторное семейство	Функция регулятора	Лиганд(ы) регуляторного белка	Регулируемые гены эффлюкса
EmrR	MarR	репрессор	СССР, DNP, Eb, FCCP, Na, Sa, TCS	<i>emrAB</i> * и <i>mcbABCDEFG</i>
EvgA-EvgS	двухкомпонентная система		?	<i>emrKY</i>
TetR	TetR	репрессор	Tc	<i>tetA</i>
ArlR-AlrS	двухкомпонентная система		?	<i>morA</i> *; 18-кДа белок

EmrRAB – оперон, участвующий в формировании мультилекарственной устойчивости *E. coli* посредством удаления из клетки таких структурно непохожих веществ, как протонофоры и антибиотики типа тиолактомицина и налидиксовой кислоты. *EmrR* или *mprA* – первый ген оперона, принадлежит к семейству marR транскрипционных репрессоров и кодирует белок размером 20,6 кДа. Под его регуляторным контролем находятся гены *emrA* и *emrB*. Мутации в гене *emrR* приводят к повышенной экспрессии EmrA и EmrB, что в свою очередь, увеличивает устойчивость бактерий к антимикробным агентам, соответственно EmrR является негативным регулятором оперона [Miller P. F., Sulavik M.C., 1996; Seoane A. S., Levy S.B., 1995; Lomovskaya O. et al., 1995].

Продукт гена *emrB* выполняет функцию насоса при транспорте соединений через цитоплазматическую мембрану. Продукт гена *emrA* связывает токсичные соединения и, вероятно, осуществляющий их передачу от EmrB к TolC – порину наружной мембраны, вовлеченному в эффлюкс некоторых гидрофобных и алифатических молекул [Borges-Walmsley M.I. et

al., 2003]. TolC является общим компонентом для нескольких систем экспорта лекарств из клетки, в том числе EmrRAB, но не находится под регуляторным контролем EmrR [Morona R. et al., 1983].

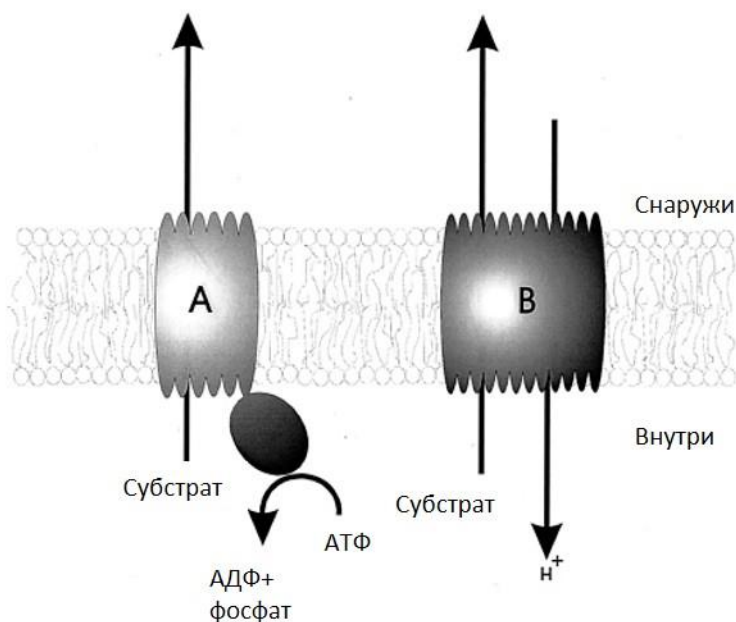


Рисунок 10 [Putman et al., 2000]. Два основных класса транспортеров, выводящих антибиотики. А – использование энергии АТФ, В – использование градиента протонов.

Эффлюкс соединений системой EmrAB-TolC осуществляется с использованием градиента протонов [Putman M. et al., 2000] (рис. 10).

Негативная регуляция оперона *EmrRAB* осуществляется путем прямого связывания ТФ EmrR, имеющем в своей структуре мотив спираль-поворот-спираль (в районе от 87 до 121 аминокислотных остатков), с последовательностью ДНК промотора гена *emrR*. Связывание с ДНК промотора осуществляется в районе -10 -35 п. н. от сайта начала транскрипции, для этого участка ДНК показано наличие несовершенного инвертированного повтора (СТGTCGТТА-СТА-ТАТСGGCTG). Индукторы оперона *EmrRAB*, такие как карбонилцианид М хлорфенилгидразон, 2,4-динитрофенол, тетрахлорсалициланилид и налидиксовая кислота связываются с EmrR, при этом карбонилцианид М хлорфенилгидразон и тетрахлорсалициланилид являются наиболее эффективными, т.к. при концентрации уже в 25 мкМ полностью ингибируют взаимодействие

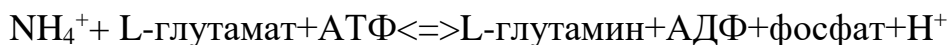
промотор-репрессор. Для остальных индукторов такой эффект достигается при концентрации в 50 мкМ [Xiong A. et al., 2000].

Также под регуляторным контролем EmrR находятся гены оперона *mcb*, расположенного в плазмиде и кодирующего микроцин В17. Микроцин В – антибактериальный пептид, который клетки используют во внутривидовой и межвидовой борьбе [Ваquero F. et al., 1978]. В исследовании [Lomovskaya O. et al., 1996] показано, что соединения, индуцирующие оперон *EmrRAB* подавляют оперон *mcb*. Также, EmrR необходим для позитивной регуляции второго промотора *mcb*, который контролирует экспрессию генов, чьи продукты вовлечены в экспорт некоторых антибиотиков.

Недавно для *E. coli* было показано, что полиамины (путресцин, спермидин и спермин) вовлечены в преодоление окислительного стресса путем стимулирования синтеза на уровне трансляции ТФ SoxR, EmrR и GshA вместе с RpoS, ранее обнаруженном члене полиаминового модулона в стационарной фазе. Полиамины стимулировали синтез EmrR главным образом в логарифмической фазе роста, тогда как для SoxR и GshA стимуляция синтеза была характерна для стационарной фазы. Таким образом, оперон *EmrRAB* входит в полиаминный модулон – группу генов, регулируемых полиаминами [Yoshida M. et al., 2004; Sakamoto A. et al., 2015].

1.4. Глутамин синтетаза в регуляторных контурах *E. coli*

Глутамин синтетаза (ГС) катализирует реакцию биосинтеза глутамина с участием L-глутамата и аммиака:



Фермент имеет массу 51, 9 кДа и состоит из 12 идентичных субъединиц, каждая из которых связана с 2 каталитически важных иона Mn(II). Субъединицы расположены в виде двух сложенных стопкой гексамерных колец [Stadtman E.R. et al., 1968]. Механизм регуляции этого фермента является сложным, многофакторным процессом [Nelson D. L, Cox M. M.,

2008], которому посвящено большое количество исследований. Среди механизмов регуляции активности фермента можно выделить 4 основных:

- 1) Репрессия и активация синтеза фермента различными ТФ на уровне транскрипции;
- 2) Ингибирование активности ГС по типу отрицательной обратной связи 8 конечными продуктами метаболизма глутамина;
- 3) Изменение сродства к дивалентным ионам и эффекторам отрицательной обратной связи путем ферментного аденилирования/деаденилирования ГС;
- 4) Активность ГС может модулироваться различными концентрациями Mn(II), АТФ и других нуклеотид трифосфатов [Stadtman E.R. et al., 1968].

Регуляция ГС осуществляется в бициклическом каскаде [Stadtman E.R., 1990; Garcia E., Rhee S.G., 1983], в котором участвуют GlnB (белок PII), GlnD (PII уридилтрансфераза/уридил удаляющий фермент) и GlnE (ГС аденилилтрансфераза/ГС деаденилаза).

Первоначально GlnB (PII) – регулятор метаболизма азота и биосинтеза жирных кислот – уридилирование/деуридилирование которого происходит при помощи GlnD (PII уридилтрансферазы/уридил удаляющего фермента) [Garcia E., Rhee S.G., 1983]. Уридилированный GlnB в качестве активатора взаимодействует с GlnE [Rhee S.G., Chock P.V., 1989].

Второй каскад связан с действием GlnE, заключающимся в аденилировании/деаденилировании субъединиц ГС, в ходе которого возможно ковалентное присоединение аденозинмонофосфата (АМФ) к уникальным остаткам тирозина в каждой субъединице [Garcia E., Rhee S.G., 1983].

Аденилирование инактивирует субъединицу ГС, деаденилирование возвращает активность, таким образом, ферментативная активность обратно пропорциональна числу групп, ковалентно связанных с АМФ [Pahel G., Tyler V., 1979].

Также активность ГС снижает повышение концентрации глутамин, стимулирующее аденилирование и блокирующее деаденилирование. [Mecke D. et al., 1966; Mura U., Stadtman E.R., 1981]. Напротив, 2-кетоглутарат блокирует аденилирование, усиливая активность ГС [Jiang P. et al., 1998; Mura U., Stadtman E.R., 1981]. Фермент наиболее активен в присутствии двухвалентных катионов, таких как Mg^{2+} , Mn^{2+} , и Co^{2+} [Gushima H. et al., 1983]. Оптимум pH для ГС расположен в диапазоне 8-6,5 с обратной зависимостью от степени аденилирования фермента (чем более аденилирован фермент, тем ниже оптимум pH) [Luo S. et al., 2005].

Глутамин – одна из наиболее распространенных пищевых свободных аминокислот. В работе [Lu P. et al., 2013] показано, что только две аминокислоты – глутаминовая кислота и глутамин – при добавлении в культуральную среду с pH 2,5 заметно повышают выживаемость *E. coli* в условиях эксперимента. Одним из предложенных механизмов, обеспечивающих такую устойчивость к кислой среде при добавлении этих аминокислот, является выделение свободного аммиака, нейтрализующего протон, в результате преобразования L-глутамин в L-глутамат ферментом глутаминазой (YbaS):



Таким образом, образование L-глутамата в *E. coli* может осуществляться различными способами: реакция с участием ГС может идти как в прямом, так и в обратном направлениях, образование глутамата может происходить с участием глутаминазы (YbaS). Еще один путь заключается в образовании L-глутамата из L-глутамин и 2-оксоглутарата с участием глутамат синтазы, состоящей из 2х субъединиц (GltB, GltD) [Miller R.E., Stadtman E.R., 1972; Berberich M.A., 1972; Lozoya E. et al., 1980]. Для эффективного протекания последней реакции необходимо присутствие флавинов, выступающих в качестве активатора глутамат синтазы, и железа – выступающего в качестве кофактора фермента.

Глутамат синтаза, в дополнение к реакции с L-глутамином, также может катализировать синтез L-глутамата из α -кетоглутарата, используя аммиак в качестве источника азота без присутствия флавинов и железа, но эта реакция имеет только 5-7% активности L-глутамин-зависимой реакции [Mantsala P., Zalkin H., 1976].

1.4.1. Функции глутатиона в *E. coli*

L-глутамат является источником для биосинтеза такого важного соединения в бактериальной клетке, как глутатион или трипептид L- γ -глутамил-L-цистеинилглицин с молекулярной массой 307 кДа. Следует отметить, что транспорт глутатиона у многих организмов является составной частью его метаболического цикла, который включает в себя внутриклеточный синтез, выход во внеклеточную среду и последующее возвращение в клетки в виде целой молекулы или ее фрагментов. Биологическая значимость этого процесса не до конца ясна, тем не менее, весь цикл или его отдельные элементы обнаружены у всех живых организмов, содержащих глутатион [Смирнова Г.В., Октябрьский О.Н., 2005].

При физиологических значениях pH глутатион имеет две отрицательно заряженные карбоксильные группы и положительно заряженную аминогруппу. Наличие γ -глутамильной связи защищает глутатион от деградации внутриклеточными пептидазами, а сульфгидрильная группа цистеина может служить донором электронов, придавая глутатиону свойства восстановителя и способность удалять свободные радикалы.

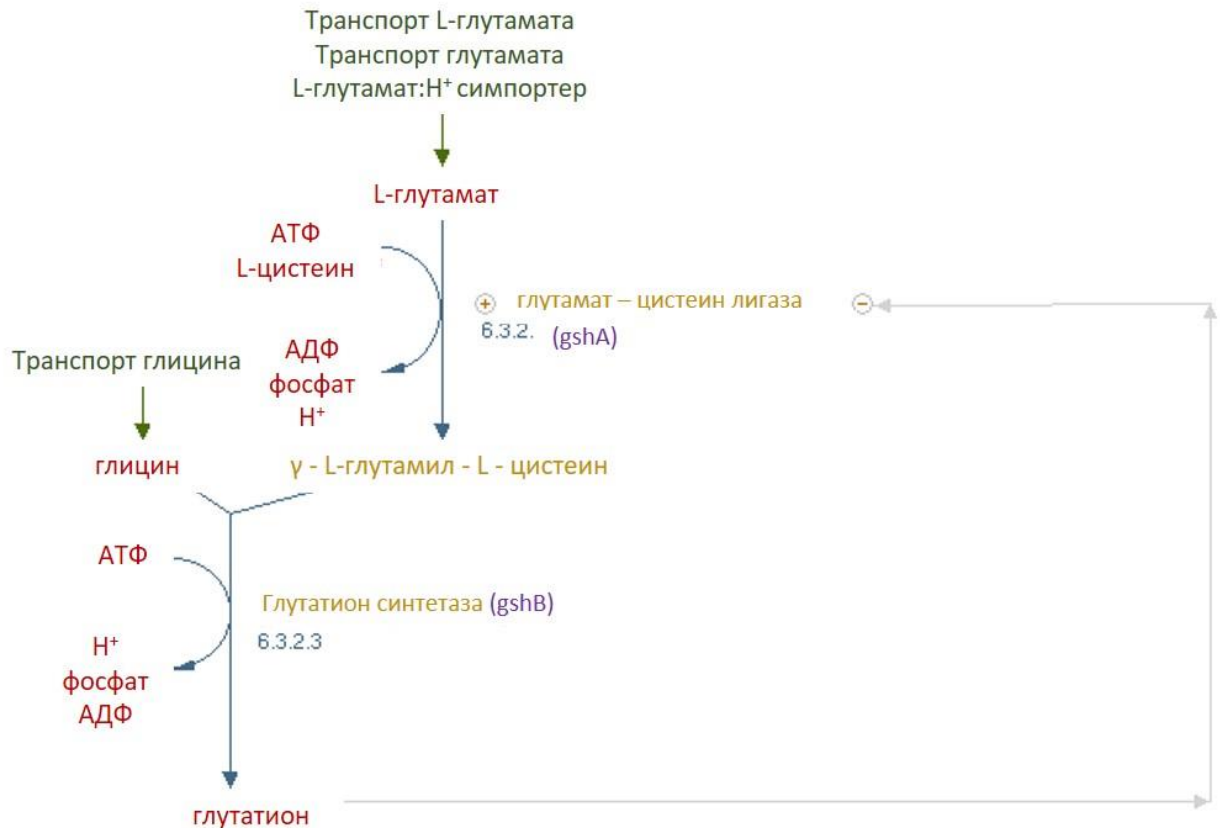


Рисунок 11. Биосинтез глутатиона [<http://biocyc.org/ECOLI/NEW-IMAGE?type=PATHWAY&object=GLUTATHIONESYN-PWY>].

Окислительно-восстановительные реакции с участием глутатиона можно разделить на 3 типа.

В первом типе реакций, одноэлектронная реакция глутатиона со свободными радикалами приводит к образованию тиольного радикала, который при димеризации с другим радикалом образует дисульфид глутатиона [Pavarino E. C. et al., 2013].

Второй тип окислительно-восстановительных реакций с глутатионом – это реакции тиолдисульфидного обмена, играющие главную роль при образовании смешанных дисульфидов с белками [Kosower N.S., Kosower E.M., 1978].

В окислительно-восстановительных реакциях третьего типа происходит двухэлектронное окисление с образованием промежуточного продукта, который затем реагирует со второй молекулой, идентичной или отличной от

первой. При этом в первом случае образуется дисульфид глутатиона, а во втором – смешанный дисульфид [Cohen G., Hochstein P., 1963].

Нужно отметить, что дисульфид глутатиона является очень токсичным соединением для клетки, т. к. легко реагирует со свободными сульфгидрильными группами. Глутатион в восстановленной форме составляет 99,5% от общего внутриклеточного глутатиона, в окисленной только 0,17–0,33% [Fahey R.C. et al., 1978].

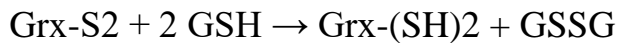
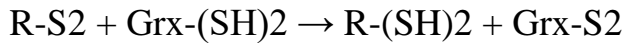
В клетках *E. coli* глутатион является главным низкомолекулярным тиолом, имеющим относительно высокую концентрацию (около 10 мМ) по сравнению с другими бактериями, сопоставимую с концентрациями в клетках животных [Kosower N.S., Kosower E.M., 1978]. Глутатион входит в главную клеточную буферную редокс-систему, которая также включает глутаредоксины (Grx) и глутатионоксиоредуктазу (Gor).

Система глутаредоксинов в *E. coli* представлена ферментами Grx1, Grx2 и Grx3, которые соответственно кодируются генами *grxA*, *grxB* и *grxC* соответственно [Aslund F. et al., 1994]. Экспрессия гена *grxA* находится под регуляторным контролем ТФ OxyR, продукт гена *grxA* – Grx1 – участвует в восстановлении ТФ OxyR [Zheng M. et al., 2001; Aslund F. et al., 1999]. Об антиоксидантных свойствах всех трех глутаредоксинов свидетельствует возрастание их уровней в штамме *E. coli*, дефицитном по каталазам KatE и KatG [Смирнова Г. В., 2005].

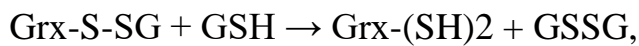
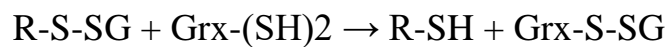
Глутатионоксиоредуктаза (Gor) в *E. coli* кодируется геном *gor* и принадлежит к семейству флавоферментов пиридиннуклеотиддисульфидоксидоредуктаз. Gor относится к антиоксидантным ферментам, регуляция экспрессии которого осуществляется как через OxyR-зависимый механизм, так и через альтернативный сигма фактор σ^s (OxyR-независимый механизм) [Michan C. et al., 1999]. Глутатионоксиоредуктаза катализирует реакцию переноса восстановительных эквивалентов от НАД(Ф)Н на дисульфид глутатиона [Schirmer R.H. et al., 1989].

При помощи глутаредоксинов происходит восстановление дисульфидных связей в системе, сопряженной с глутатионом, НАД(Ф)Н и Gor [Holmgren A., Aslund F., 1995].

В дитиоловом – основном – механизме участвуют соседние цистеиновые остатки активного центра глутаредоксина [Bushweller J.H. et al., 1992]:

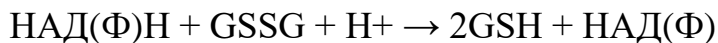


По монотиоловому – альтернативному – механизму могут восстанавливаться только смешанные дисульфиды [Bushweller et al., 1992]:



где R-S-SG – смешанный дисульфид с глутатионом [Holmgren A. et al., 2005].

Далее Gor с участием НАД(Ф)Н восстанавливает глутатион:



Хотя редокс-система глутатиона является основной, в значительной мере ее функции перекрываются и могут дублироваться функциями редокс-системы тиоредоксина, к которой принадлежат тиоредоксины и тиоредоксинредуктаза [Das K.S., White C. W., 2002]. По этой причине достаточно сложно изучать отдельные компоненты системы, поскольку дефекты в компонентах одной из систем часто никак не проявляются фенотипически, и только множественные мутации ведут к существенным нарушениям метаболизма.

Данные относительно чувствительности самого глутатиона к окислительному стрессу у бактерий противоречивы, тогда как для эукариотических клеток глутатион является одним из сильных антиоксидантов и защищает клетки от окислительного стресса, вызываемого перекисью водорода. Этот процесс сопровождается снижением уровня восстановленного глутатиона и его окислением [Meister A., Anderson M.E., 1983]. У *E. coli* лишь летальные дозы перекиси приводят к изменению

соотношения восстановленной/окисленной форм глутатиона, вызывая значительное повышение окисленной формы [Greenberg J.T., Demple B., 1986]. Мутантные клетки *E. coli*, дефицитные по синтезу глутатиона, устойчивы к действию перекиси водорода в той же степени, что и клетки дикого типа [Apontoweil P., Berends W., 1975; Owens R. A., Hartman P. E., 1986]. В некоторых ситуациях, мутантные линии проявляли даже большую устойчивость к перекиси водорода [Greenberg, Demple, 1986; Imlay J. A., Linn S., 1987]. Также было показано, что клетки *E. coli*, мутантные по гену каталазы *katG*, имеют такую же чувствительность к перекиси водорода как и клетки дикого типа [Greenberg J.T., Demple B., 1986], тем не менее скорость биосинтеза глутатиона у мутантных клеток заметно выше по сравнению с клетками дикого типа. И лишь двойные мутанты *E. coli*, по генам *katG* и *gsh*, сверхчувствительны к обработке перекисью водорода [Alonso-Moraga A. et al., 1987].

Одной из важных функций глутатиона в бактериальных клетках является регуляция внутриклеточного содержания ионов K^+ : клетки *E. coli*, дефицитные по синтезу глутатиона, быстро теряют K^+ при переносе в среду, не содержащую K^+ , и не могут расти на среде с низким содержанием калия в отсутствие экзогенного глутатиона, возможно глутатион является частью воротного механизма, закрывающего калиевый канал [Meury J., Kepes A., 1983].

Показано, что глутатион в *E. coli* вовлечен в процессы гомеостаза и развитие толерантности к таким переходным металлам как хроматы, Zn(II), Cd(II) и Cu(II) [Helbig K. et al., 2008]. Для двойных мутантов *E. coli* по генам *copA* и *gshA* была показана более быстрая инактивация на твердых медных поверхностях по сравнению с клетками дикого типа [Grobe C. et al., 2014].

Таким образом, глутатион включен в глобальную регуляторную сеть, обеспечивающую адаптацию бактерий к различным стрессовым условиям.

1.5 Заключение по обзору литературы

Изучение воздействия ТГц излучения на живые объекты является актуальной задачей, реализовать которую в полной мере можно лишь разносторонними и комплексными подходами. При этом необходимо помнить, что воздействие любого излучения на живые системы зависит от двух общих факторов: во-первых, от параметров облучения (частота, мощность, время воздействия и т.д.) и, во-вторых, от структуры и/или свойств биологического материала [Wilmink G. J., Grundt J. E., 2011].

Использование геносенсорных конструкций на основе *E. coli* для данных целей является доступным и удобным способом, позволяющим однозначно качественно выявить бактериальные стрессовые системы, участвующие в каскаде реакций, разворачивающихся в ответ на нетермическое воздействие ТГц излучения.

Интерпретация результатов и выявление возможных механизмов нетермического воздействия излучения на бактериальные клетки представляет достаточно сложную задачу, которая требует глубоких современных знаний о регуляторных циклах *E. coli* и различных метаболических путях.

Например, в отношении окислительного стресса, существуют доказательства того, что активность ТФ OxyR, являющегося одним из центральных регуляторов в условиях воздействия перекиси водорода у *E. coli*, контролируется путем различных модификаций цистеинового остатка Cys199 в ответ на различные стрессы. При окислительном стрессе образуется производное сульфеновой кислоты – C199SOH, при воздействии нитрозотиолов образуется – C199SNO, при дисульфидном стрессе формируется смешанный дисульфид с глутатионом – C199SSG, т.е. присутствует глутатионирование. [Kim S.O. et al., 2002 Hausladen A. et al., 1996]. Из этого следует, что различные модификации Cys199 способны инициировать различные транскрипционные ответы при действии разных стрессов.

Таким образом, нужно принимать во внимание внутренние факторы, способные оказать влияние на характер ответа геносенсора при различных стрессорных воздействиях.

Кроме того, при изучении реакции геносенсора необходимо учитывать следующие факторы:

- 1) Отношение между силой стимула и активацией системы геносенсора;
- 2) Время реакции в ответ на стимул;
- 3) Гетерогенность активации геносенсора в разных клетках изогенной линии;
- 4) Кросс-реактивность в отношении стимулов для других геносенсоров [Rogers J. K. et al., 2015].

Существует широкий ряд механизмов, при помощи которых клеткам удается корректировать то или иное губительное воздействие и избежать гибели. При этом, участвующие в них регуляторные белки могут быть как специфическими к данному процессу, так и с более широкой функцией, принимающие участие во многих метаболических путях. Тестирование нетермического воздействия ТГц излучения при помощи геносенсоров, специфичных к каким-либо конкретным стрессовым воздействиям, позволит определить чувствительность конкретных генетических систем. Использование панели таких геносенсоров на основе промоторов специфичных стрессовых генов *E. coli*, позволит не только наглядно выявить воздействие на транскрипционном уровне в виде увеличения экспрессии флюоресцентного белка, но и, с учетом всех факторов, поможет в более детальной проработке возможных механизмов влияния ТГц излучения на бактериальные клетки.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ, МЕТОДЫ И ПРИБОРНАЯ БАЗА

2.1 Материалы

Реактивы

В работе использовались реактивы:

Агароза (Bio-Rad, США); агар (Difco, США); бактотриптон (Difco, США); бромистый этидий (Serva, Германия); бромфеноловый синий (Bio-Rad, США); глицерин (Sigma, США); глюкоза (Новосибхимфарм, Россия); дрожжевой экстракт (Fluka, Швеция); dNTP (Sigma, США); ИПТГ (Сибэнзим, Россия); казаминовые кислоты (Диаэм, Россия); MOPS (Sigma, США); трис (Serva, Германия); ЭДТА (Serva, Германия); наборы реактивов «Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System» (Promega, США), «GeneJET PCR Purification Kit» (Thermo Scientific, Евросоюз), «GeneJET Plasmid Miniprep Kit» (Thermo Scientific, Евросоюз).

Все остальные использованные реактивы (соли и кислоты, использованные при приготовлении буферов) были произведены в ВО «Реахим» и имели квалификацию не ниже «ОСЧ» и «ХЧ».

Бактериальные штаммы

Escherichia coli JM103 (endA1, hsdR, supE, sbcB15, thi-1, strA, Δ (lac-proAB), [F', traD36, proAB, lacIqZ Δ M15]) из коллекции ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор».

Буфер для электрофореза в агарозном геле

ТАЕ x1: 40 мМ Трис-уксусная кислота; 1 мМ ЭДТА, 0,005 мМ бромистого этидия, рН 8,0.

Раствор для нанесения проб на агарозный гель

Раствор для нанесения проб ДНК на агарозный гель: 0,25% бромфеноловый синий, 30% глицерин.

Культуральные среды

Среда LB

На 1 литр раствора: бактотриптон – 10 г, NaCl – 10 г, дрожжевой экстракт – 5 г, довести pH до 8,0 добавлением NaOH.

Бессолевая среда YENB для приготовления электрокомпетентных клеток

На 1 литр раствора: бактотриптон – 8 г, дрожжевой экстракт – 7,5 г, довести pH до 7,5 добавлением NaOH.

Среда SOC

На 1 литр раствора: бактотриптон – 20 г, NaCl – 0,58 г, дрожжевой экстракт – 5,5 г, KCl – 0,75 г, глюкоза – 3,6 г, довести pH до 7,5 добавлением KOH.

Агаризованная среда LB

На 1 литр раствора: бактотриптон – 10 г, NaCl – 10 г, дрожжевой экстракт – 5 г, агар - 15г, довести pH до 8,0 добавлением KOH.

Минимальная среда M9

На 1 литр раствора: Na₂HPO₄ – 6 г, KH₂PO₄ – 3 г, NaCl – 0,5 г, NH₄Cl – 1 г, глюкоза – 8 г, MgSO₄ – 0,12 г, CaCl₂ – 0,011 г, казामीновые кислоты – 2 г, довести pH до 7,5 добавлением NaOH.

Глицерол-глицерфосфатная минимальная среда (ГГМ)

На 1 литр раствора: MOPS – 8,37 г, NH₄Cl – 1 г, KCl – 1 г, K₂SO₄ – 0,87 г, β-Глицерин фосфата динатриевая соль – 1,65 г, MgCl₂ – 0,02 г, CaCl₂ – 0,01 г, глюкоза – 5 г [Riether K.V. et.al., 2001].

Ферменты

Для проведения ПЦР использовалась ДНК-полимераза «pfu turboСх» (AgilentTechnologies).

В процессах клонирования продукты ПЦР обрабатывались набором «USER Enzyme» (New England Biolabs).

В процессах клонирования продукты ПЦР обрабатывались эндонуклеазой рестрикции *Mal I* (SibEnzyme).

Для осуществления лигирования продуктов ПЦР использовалась T4 ДНК-лигаза (Fermentas).

Плазмиды

pUC18 – исходная многокопийная плаزمида для создания базового вектора pUC18-GFP. pUC18 несет ген устойчивости к ампициллину, лактозный промотор, ген репрессора *lacI* [Perron C. Y., 1985].

pCopA-GFP и pGlnA-GFP – рекомбинантные плазмиды, полученные в ходе данной работы. Геносенсорная плазмидная конструкция pCopA-GFP содержит ген, кодирующий флюоресцентный белок GFP [Andersen J. et al, 1998], находящийся под регуляторным контролем промотора гена *copA E. coli*, обеспечивающего продукцию флюоресцентного белка GFP в присутствии избытка ионов меди в бактериальных клетках. Геносенсорная плазмидная конструкция pGlnA-GFP содержит ген, кодирующий флюоресцентный белок GFP, находящийся под регуляторным контролем промотора гена *glnA*, остро реагирующего увеличением экспрессии при быстром ответе *E. coli* на нетермическое воздействие ТГц излучения (данные протеомного анализа Лаборатории молекулярных биотехнологий).

pKatG-GFP и pEmrR-GFP – рекомбинантные плазмиды, предоставленные [Khlebodarova T. M. et. al., 2007] (pKatG-GFP) и Лабораторией молекулярно-генетических систем (pEmrR-GFP). Геносенсорная конструкция pKatG-GFP содержит ген, кодирующий флюоресцентный белок GFP [Andersen J. et al, 1998], находящийся под регуляторным контролем промотора гена *katG E. coli*, обеспечивающего продукцию флюоресцентного белка GFP в присутствии веществ, индуцирующих окислительный стресс у бактериальных клеток. Геносенсорная конструкция pEmrR-GFP содержит ген, кодирующий флюоресцентный белок GFP, находящийся под регуляторным контролем промотора гена *emrR*, обеспечивающего продукцию флюоресцентного белка

GFP в присутствии таких противомикробных агентов, как салициловая или налидиксовая кислоты.

2. 2 Методы

Дизайн олигонуклеотидов для амплификации фрагментов ДНК

Дизайн олигонуклеотидов, использовавшихся в качестве праймеров осуществлялся на основе метода [Geu-Flores F. et al., 2007], позволяющего упростить процедуру клонирования и повысить ее эффективность. Согласно приведенному методу были разработаны праймеры, содержащие одиночный урацил около 5'-конца (таб. 5). Температура плавления для комплекса праймер-матрица (T_m) рассчитывалась с помощью программы Oligo Calc (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>). Олигонуклеотиды, использовавшиеся в качестве праймеров, были синтезированы в Лаборатории медицинской химии ИХБФМ СО РАН.

Таблица 5. Праймеры, использованные при создании молекулярно-генетических конструкций.

ПЦР-матрица/ полученный фрагмент ДНК	Нуклеотидная последовательность праймеров (5' -> 3')
Плазмида pUC18/ фрагмент ДНК плазмиды pUC18 (1)	Прямой atagctgtUtcctgtgtg Обратный aaagggccUcgtgatac
pKatG-GFP/ фрагмент ДНК гена <i>gfp</i> (2)	Прямой aacagctaUatgcgtaaaggagaagaactt Обратный aggccttUttaaactgctgcagcgtagt
Базовый вектор pUC18-GFP/ фрагмент ДНК базового вектора <i>pUC18-GFP</i> (3)	Прямой атаасааттUсасасаgгааа Обратный агсггтаUсagctcactc
Геномная ДНК <i>E. coli</i> JM103/ фрагмент ДНК промотора гена <i>copA</i> (4)	Прямой атаccгсUатccactgсctgtgtgтаа Обратный ааатггтаUаааасactcctтааgасag
Геномная ДНК <i>E. coli</i> JM103/ фрагмент ДНК промотора гена <i>glnA</i> (5)	Прямой атаccгсUсaggcattаgааатagсгсгттattg Обратный ааатггтаUtтаagggatagtгacgtgctgttc

Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

С использованием описанных олигонуклеотидов в качестве праймеров после ПЦР были получены фрагменты ДНК (таб. 5), необходимые для создания геносенсорных конструкций pCopA-GFP и pGlnA-GFP. Для всех реакций прямой и обратный праймеры были разбавлены до концентрации 20 пМ. Для оптимизации процесса ПЦР первоначально выставлялся градиент T_m в диапазоне 48⁰С-62⁰С с интервалом в 2⁰С.

Очистка продуктов ПЦР

После проведения ПЦР проводилась очистка полученных фрагментов ДНК с использованием набора реактивов GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Scientific, Евросоюз) согласно инструкции производителя. Для этого к реакционной смеси добавляли binding buffer в пропорции 1:1. Полученную смесь наносили на колонку, входившую в комплект набора, и центрифугировали на максимальных оборотах (Microcentrifuge 5415D, Eppendorf, далее использовалась она же) в течение 60 секунд, прошедшую через колонку жидкость удаляли. Следующий этап состоял в отмывании связавшегося с колонкой материала ДНК. Для этого на колонку наносили 700 мкл wash buffer. После центрифугирования на максимальных оборотах в течение 60 секунд, фильтрат удаляли и пустую колонку дополнительно центрифугировали в течение 60 секунд. Затем колонку помещали в чистую микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл, добавляли 50 мкл elution buffer и центрифугировали в течение 60 секунд. Очищенный продукт ПЦР хранили при температуре -20°C .

Лизис *E. coli*

Клетки бактериального штамма *Escherichia coli* JM103 лизировали при высоких температурах. Для этого колонию с агаризованной среды помещали в 50 мкл бидистиллированной воды и тщательно ресуспендировали, пробирку с ресуспендированными клетками помещали на кипящую водяную баню на 1 минуту. Охлажденный лизат использовали для проведения ПЦР, хранили при температуре -20°C .

Выделение плазмидной ДНК

Выделение плазмидной ДНК осуществляли с помощью набора реактивов GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific, Евросоюз) согласно инструкции производителя. Для этого 1 мл ночной культуры *E. coli* осаждали в микроцентрифужной пробирке в течение 3 минут при 8 тыс. оборотах (Microcentrifuge 5415D, Eppendorf, далее использовалась она же на

максимальных оборотах), супернатант удаляли. К клеткам добавляли 250 мкл resuspension solution, содержащего РНКазу А, и тщательно перемешивали. Затем добавляли 250 мкл lysis solution, перемешивали осторожным переворачиваем пробирку 4-6 раз, до момента когда раствор становился вязким и прозрачным. После этого добавляли 350 мкл neutralization solution, перемешивали осторожным переворачиваем пробирку 4-6 раз и центрифугировали 5 минут. Супернатант переносили на колонку, входившую в комплект набора, и центрифугировали 60 секунд. Фильтрат удаляли, и отмывали (дважды) связавшийся материал путем добавления 500 мкл wash solution и удаления фильтрата после 60 секунд центрифугирования. Затем для удаления остатков этанола, содержащегося в отмывающем растворе, пустую колонку центрифугировали в течение 60 секунд. После этого колонку переставляли в чистую микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл, добавляли 50 мкл elution buffer и после 2 минут инкубирования при комнатной температуре, центрифугировали в течение 2 минут. Выделенную плазмиду хранили при температуре -20°C .

Электрофорез в агарозном геле

Выделенные плазмиды и полученные продукты ПЦР анализировали при помощи электрофореза в 1% агарозном геле. Раствор ДНК смешивали с раствором для нанесения проб. Электрофорез проводили в буфере TAEх1 в течение 40 минут при напряженности электрического поля 10 В/см.

Выделение фрагментов ДНК из агарозы

Выделение фрагментов из агарозы осуществляли с помощью набора реактивов Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, США) согласно инструкции производителя. Для этого после проведения электрофореза из агарозного геля вырезали нужный фрагмент ДНК. Полоску геля помещали в микроцентрифужную пробирку, взвешивали, добавляли membrane binding solution из расчета 10 мкл раствора на 10 мг геля и инкубировали при температуре 65°C , периодически перемешивая, до полного растворения геля.

Затем полученную смесь переносили на колонку, входившую в комплект набора. Колонку помещали в пробирку объемом 2 мл, и центрифугировали в течение 60 секунд на максимальных оборотах (Microcentrifuge 5415D, Eppendorf). Фильтрат сливали, колонку помещали в ту же пробирку и промывали 700 мкл wash solution и центрифугирования в течение 60 секунд на максимальных оборотах. Повторяли этот шаг с использованием 500 мкл wash solution. После удаления фильтрата пустую колонку центрифугировали в течение 60 секунд для удаления остатков этанола. Затем колонку помещали в чистую микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл, добавляли 50 мкл free nuclease water и после 60 секунд инкубирования при комнатной температуре, элюировали фрагмент центрифугированием в течение 60 секунд. Выделенный фрагмент ДНК хранили при температуре -20°C .

Клонирование

Клонирование целевых продуктов ПЦР в плазмиду осуществлялось в 3 этапа. Все 3 этапа были применены сначала для получения базового вектора pUC18-GFP с использованием продукта ПЦР гена *gfp* и продукта ПЦР плазмиды pUC18, затем для создания геносенсорных конструкций pCopA-GFP и pGlnA-GFP на основе продуктов ПЦР базового вектора и промоторов генов *copA* и *glnA*.

1. Обработка продуктов ПЦР набором USER Enzyme

Для выщепления урацила вблизи 5' концов наработанных продуктов ПЦР готовили реакционную смесь следующего состава:

40 мкл продуктов ПЦР после очистки

5 мкл буфера x10 для ДНК-полимеразы TaqSE

3 мкл USER

3 мкл эндонуклеазы рестрикции

Общий объем смеси доводили до 50 мкл. Смесь инкубировали 1 час при 37°C .

2. Лигирование фрагментов ДНК

Для проведения лигирования готовили реакционную смесь следующего состава:

По 10 мкл каждого фрагмента ДНК, обработанного USER Enzyme

2 мкл лигазного буфера x10

2 мкл АТФ 10 мкМ

18 мкл воды

Смесь тщательно перемешивали и добавляли 3 мкл T4 ДНК-лигазы.

Пробирку со смесью общим объемом 45 мкл инкубировали при следующих условиях:

3 минуты при 43⁰С

Далее 30 циклов:

15 секунд при 43⁰С

15 секунд при 35⁰С

15 секунд при 30⁰С

20 секунд при 25⁰С

30 секунд при 19⁰С

3. Переосаждение ДНК

Для переосаждения ДНК к 45 мкл раствора с ДНК добавляли изопропиловый спирт в объемном соотношении 1:1 и 1,5 мкл гликогена (20 мг/мл, Fermentas), выдерживали 20 минут при комнатной температуре и центрифугировали на максимальных оборотах 15 минут (Microcentrifuge 5415D, Eppendorf). Затем супернатант удаляли, добавляли 200 мкл 70% этанола и центрифугировали 10 минут на максимальных оборотах. Этанол аккуратно сливали, осадок подсушивали до удаления запаха спирта. После этого к осадку добавляли 8 мкл воды и ресуспендировали. Полученную смесь использовали для трансформации электрокомпетентных клеток методом электропорации.

Получение базового вектора pUC18-GFP и плазмидных конструкций pCopA-GFP и pGlnA-GFP

Для получения базового вектора pUC18-GFP на основе плазмиды pUC18 и флюоресцентного белка GFP использовались праймеры (1) и (2) (таб. 5).

В качестве матрицы для основного базового вектора использовалась плазида pUC18. Амплифицированный участок содержал лактозный промотор, под регуляторный контроль которого встраивался ген *gfp*. Для получения продуктов ПЦР гена *gfp* в качестве матрицы использовалась геносенсорная конструкция pKatG-GFP [Khlebodarova T. M. et. al., 2007]. Трансформация осуществлялась методом электропорации с использованием электрокомпетентных клеток *E. coli* JM103 как описано в Главе 2.

Трансформированные клетки высевались на агаризованную среду LB с 5% X-gal и 0,3 mM ИПТГ. Выросшие колонии анализировали при помощи сине-белой селекции. Из неокрашенных колоний была выделена плазмидная ДНК pUC18-GFP, которая использовалась для создания плазмидных конструкций pCopA-GFP и pGlnA-GFP.

Для получения фрагмента ДНК базового вектора pUC18-GFP использовались праймеры (3) (таб. 5). В амплифицированный фрагмент не входил лактозный промотор.

Для получения промоторных областей генов *copA* и *glnA* амплифицировались фрагменты -297...-1 и -362...+105 (см. Приложение 1) соответственно относительно сайтов начала трансляции с использованием праймеров (4) и (5) (таб. 5). В качестве матрицы использовалась геномная ДНК бактериального штамма *Escherichia coli* JM103. Далее проводилось объединение продуктов ПЦР согласно описанным этапам. После трансформации методом электропорации, выросшие колонии анализировали на способность к индукции флюоресцентного ответа при воздействии естественных индукторов. Правильность встройки подтверждали секвенированием.

Приготовление компетентных клеток *E. coli*

Для приготовления электрокомпетентных клеток 3 мл ночной культуры *E. coli* JM103 помещали в 250 мл бессолевой среды YENB в колбу объемом 1 литр и выращивали при 200 об/минуту (Шейкер–инкубатор ES-20/60, Biosan, Латвия) и температуре 37⁰С до достижения ОП=0,6-0,7. Дальнейшие манипуляции проводились на холоде. Колбу с культурой охлаждали во льду в течение 5 минут, затем культуру помещали в центрифужные пробирки объемом 50 мл и центрифугировали 4,5 тыс. об/минуту 7 минут при 4⁰С. Жидкость удаляли, для наиболее тщательного удаления жидкости дополнительно центрифугировали 5 секунд 3 тыс. об/минуту. После этого клетки в каждой пробирке дважды промывали 50 мл заранее охлажденной до 4⁰С бидистиллированной воды, центрифугируя как описано ранее. Затем клетки аналогично промывали 20 мл заранее охлажденного 10% глицерина, после этого добавляли объем 10% глицерина, равный объему клеток. Ресуспендировали и получали в общем около 0,5 – 1 мл клеточной суспензии. Суспензию по 40 мкл (объем на одну электропорацию) замораживали в жидком азоте. Аликвоты хранили при температуре –70⁰С.

Трансформация клеток *E. coli* плазмидной ДНК

Трансформацию компетентных клеток *E. coli* JM103 проводили методом электропорации на электропораторе PowerPac™ HC Power Supply (Bio-Rad) [Dower, W.J. et al., 1988] при следующих параметрах: 1,8 кВ, 25 мкФ, 200 Ом, зазор ячейки кюветы 1 мм. После импульса к клеткам добавляли питательную среду SOC и инкубировали 1 час при 37⁰С. После этого клетки высевали на агаризованную среду LB, содержащую селективный антибиотик – ампициллин 100 мкг/мл (Новосибхимфарм).

Следует отметить, что клеточная культура *E. coli* JM103, трансформированная геносенсорными конструкциями, сохраняет свойства геносенсоров в среднем в течение 2 недель. Поэтому для проведения экспериментов использовались колонии с чашки не позднее чем через 14 дней

с момента трансформации. Вновь трансформированные колонии перед экспериментами с нетермическим воздействием ТГц излучения тестировались на способность к индукции флюоресцентного белка естественными индукторами, что обеспечивало адекватный положительный контроль в условиях эксперимента.

Секвенирование плазмидных ДНК

Правильность конструирования подтверждали секвенированием области встройки промоторных областей генов *copA* и *glnA* в геносенсорных конструкциях *pCopA-GFP* и *pGlnA-GFP*. Для проведения реакции секвенирования использовался «The ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit».

Реакцию секвенирования проводили в режиме:

3 минуты при 95⁰С,

30 циклов:

8 секунд при 98⁰С,

10 секунд при 54⁰С,

4 минуты при 60⁰С,

дополнительная элонгация

5 минут при 60⁰С.

Реакционная смесь объемом 30 мкл содержала:

1 мкл BigDye

0,5 мкл праймера (2 пкмоль/мкл)

1 мкл плазмидной ДНК (100-200 нг ДНК)

6 мкл буфера x5

21,5 мкл H₂O

После реакции секвенирования осуществляли очистку ее продуктов. Для этого в 1,5 мл пробирку добавляли 2 мкл 0,5 М ЭДТА и 92 мкл этанола, тщательно перемешивали и оставляли на 10 минут при комнатной температуре. После этого центрифугировали в течение 20 минут на максимальных оборотах. Супернатант удаляли и добавляли 180 мкл 75% этанола. Центрифугировали 3 минуты на максимальных оборотах. Супернатант удаляли при 70°C 10-15 минут. Секвенирование осуществлялось на автоматическом секвенаторе ABI PRISM 3100-Avant Genetic Analyzer в «Межинститутском центре секвенирования ДНК СО РАН».

Индукция синтеза флюоресцентного белка GFP в клетках геносенсоров

Для получения нужного геносенсора *E. coli* JM103 трансформировали путем электропорации соответствующей плазмидой – pKatG-GFP, pCopA-GFP, pEmrR-GFP или pGlnA-GFP. Ночные культуры клеток геносенсоров подращивали в свежей среде LB с 100 мкг/мл ампициллина до ОП=0,6. Поскольку среда LB, в которой препаративно нарабатываются клетки геносенсора, имеет собственную флюоресценцию в диапазоне флюоресценции белка GFP клетки геносенсоров отмывали от культуральной среды LB. Для этого 1 мл бактериальной культуры осаждали в течение 3 минут при 8 тыс. оборотах (Microcentrifuge 5415D, Eppendorf) удаляли супернатант, добавляли 1 мл минимальной среды M9 или ГГМ (в зависимости от задач эксперимента) ресуспендировали и снова осаждали в течение 3 минут при 8 тыс. оборотах. Клеточный осадок ресуспендировали в 1 мл минимальной среды. Полученная жидкая клеточная культура использовалась для проведения дальнейших экспериментов.

Для тестирования клеток геносенсора на восприимчивость к токсическим веществам, аликвоты по 50 мкл вносили в лунки планшета, содержащие 50 мкл минимальной среды с различными титрами токсических веществ. Флюоресценцию клеток, вносимых в аликвоту минимальной среды

без токсических агентов рассматривали в качестве отрицательного контроля, также в трехкратном повторе.

Для тестирования динамики синтеза флюоресцентного белка GFP в клетках геносенсоров при проведении экспериментов по облучению каждый раз использовали свежетрансформированную культуру клеток геносенсора, отмытую от культуральной среды LB и переведенную на минимальную среду, как описано раньше. Клеточная культура доставлялась на экспериментальную станцию ЛСЭ в термостате «Гном» при 37⁰С. Сразу после проведения облучения к культуре клеток геносенсора добавляли минимальную среду в объемном соотношении 1:1. Флюоресценцию клеток, подвергавшихся воздействию токсических агентов, рассматривали в качестве положительного контроля, аналогично смешивая в объемном соотношении 1:1 с минимальной средой, содержащей эти токсические агенты. Флюоресценцию клеток геносенсора, к которым добавлялась минимальная среда в объемном соотношении 1:1 без токсических агентов рассматривали в качестве отрицательного контроля. В процессе эксперимента на ЛСЭ культура находилась в термостате «Гном» (ДНК-Технология) при температуре 37⁰С. На луночный планшет культура геносенсоров раскапывалась после эксперимента на ЛСЭ, при этом флюоресценцию клеток, вносимых в аликвоту минимальной среды без токсических агентов, рассматривали в качестве отрицательного контроля. Значение флюоресценции клеток, вносимых в аликвоту минимальной среды с оптимальной концентрацией индуктора для конкретного геносенсора, рассматривали в качестве положительного контроля. Значение флюоресценции облученных клеток, вносимых в аликвоту минимальной среды без токсических агентов рассматривали в качестве опыта.

Для тестирования динамики синтеза флюоресцентного белка GFP в экспериментах по облучению только минимальной среды, сначала собирали и накапливали материал – минимальную среду, которая в процессе сбора также помещалась в термостат «Гном» (ДНК-Технология) при температуре

37⁰С. Для проведения эксперимента использовали свежетрансформированную культуру клеток геносенсора, отмытую от культуральной среды LB и переведенную на минимальную среду, как описано раньше. Добавление облученной среды к клеткам осуществлялось после облучения образцов на ЛСЭ, непосредственно перед началом измерения флюоресценции. Для этого пробы культуры геносенсоров по 50 мкл вносили в лунки планшета, содержащие 50 мкл облученной минимальной среды (опыт) с различными титрами токсических веществ (положительный контроль), или минимальной среды без токсических веществ (отрицательный контроль).

Измерение уровня флюоресценции клеток геносенсоров

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. Для измерения уровня индукции в лунки планшета помещали по 100 мкл культуры геносенсора. Измерение на флюориметре проводилось каждые 15 или 20 минут. Клетки культивировались при температуре 37⁰С и 500 об/минуту на термошейкере (Biosan).

Облучение клеток ТГц излучением

Для проведения эксперимента по облучению ночные культуры геносенсоров подращивали в свежей среде LB с 100 мкг/мл ампициллина до среднелогарифмической стадии ОП=0,6. Клетки отмывали от культуральной среды LB (см. «Индукция синтеза флюоресцентного белка GFP в клетках геносенсоров») и помещали в термостат «Гном» (ДНК-Технология) при температуре 37⁰С до начала эксперимента. Для облучения 50 мкл культуры геносенсора в минимальной среде помещали в специальную кювету для экспонирования (см. ГЛАВА 2, приборная база, рабочая станция для

облучения биологических объектов) между двумя натянутыми полипропиленовыми пленками и проводили облучение клеток. Такие параметры как время, длина волны, температурный режим контролировались и зависели от требований конкретного эксперимента. Положительным контролем служила культура клеток, к которым добавляли специфические токсические агенты: перекись водорода – для геносенсора *E. coli/pKatG-GFP*, сульфат меди для *E. coli/pCopA-GFP* и салициловая кислота для *E. coli/pEmrR-GFP*, для *E. coli/pGlnA-GFP* положительного контроля не было. В качестве отрицательного контроля служила культура клеток, которая находилась в кювете в течение 15 минут при 37⁰С и не подвергалась каким-либо воздействиям.

Подсчет количества клеток на агаризованных средах

Для того, чтобы оценить выживаемость клеток в эксперименте был проведен посев клеток на плотную агаризованную среду с ампициллином 100 мкг/мл после облучения и после окончания измерения флюоресценции (интервал 3-4 часа). Перед посевом проводилось последовательное разведение культуры каждого образца в 10⁵ раз, затем пробу объемом 50 мкл наносили в чашку Петри диаметром 10 см, содержащую плотную агаризованную среду, с последующим равномерным распределением по поверхности стерильным шпателем и инкубированием в термостате при 37⁰С в течение 16 часов. Всего было проведено 5 экспериментов с посевом, где использовались клетки отрицательного контроля и облученного образца.

2.3 Приборная база

Источник ТГц излучения

Облучение клеток геносенсоров проводилось на уникальной установке Сибирского центра синхротронного и ТГц излучения ЛСЭ на ускорителе-рекуператоре (NovoFEL, FEL - Free Electron Laser), [Gavrilov N.G. et al.,

2007]. ТГц лазер разработан и запущен в действие в ИЯФ СО РАН. Новосибирский ЛСЭ имеет уникальные параметры (таб. 6), характеризующиеся прежде всего высокой средней и спектральной мощностью. Диапазон длин волн лежит в пределах 5-240 мкм, это позволяет проводить уникальные эксперименты по воздействию ТГц излучения на различные биологические объекты. Для измерения мощности излучения использовали измеритель мощности лазерного излучения ИМО-4 (Эталон).

Таблица 6. Параметры излучения Новосибирского ЛСЭ

Параметр	Значение
Длина волны, мкм	5 –240
Длительность импульса, пикосекунды	50
Период следования импульсов, наносекунды	180
Средняя мощность, Вт	до 400
Относительная ширина линии	$3 \cdot 10^{-3}$

На рис. 12 приведена схема Новосибирского ЛСЭ. Электронный пучок выходит из электронной пушки и проходит через систему резонаторов. Энергия пучка на входе в резонаторы составляет порядка 2 МэВ, на выходе – 12 МэВ. Затем поворотными магнитами пучок направляется к ондуляторам, где происходит излучение. Поворотными магнитами пучок снова направляется на каскад резонаторов, где замедляется и направляется в поглотитель.

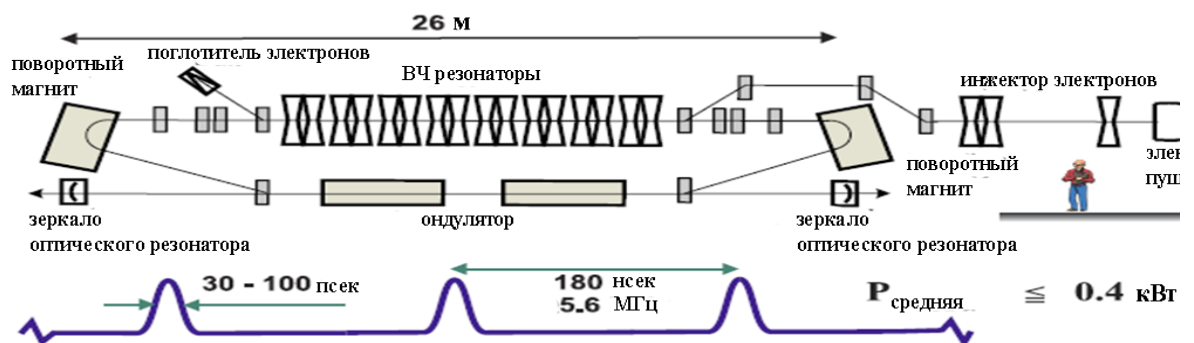


Рисунок 12. Схема Новосибирского ЛСЭ.

Излучение имеет форму импульсов длительностью от тридцати до ста пикосекунд, с интервалами между импульсами 180 наносекунд.

Рабочая станция для облучения биологических объектов

С целью регулирования и контроля точной дозы облучения биологических объектов была проведена модернизация пользовательской станции. ТГц излучение доставляется на рабочую станцию через стандартный модуль распределения излучения на рабочие станции. Общий вид биологической станции представлен на рисунке 13.



Рисунок 13. Биологическая станция в Сибирском центре синхротронного и ТГц излучения ИЯФ СО РАН.

Для регулировки средней мощности излучения при условии неизменности пиковой мощности был изготовлен обтюратор, состоящий из двух медных кругов диаметром 20 см, имеющих общую ось вращения и вращающихся при помощи электромотора. В каждом круге сделано по одному секторному отверстию, имеющему 1:30 площади круга. Поворотом кругов друг относительно друга можно регулировать площадь открытого отверстия, меняя при этом среднюю мощность излучения и оставляя неизменной пиковую. Для изменения плотностей средней и пиковой

мощностей образец позиционировался в разных точках фокусировки излучения после обтюратора. Проведены предварительные измерения поглощения ТГц излучения водных слоев различной толщины (рис. 14). Видно, что слой воды толщиной 40 мкм поглощает примерно половину излучения.

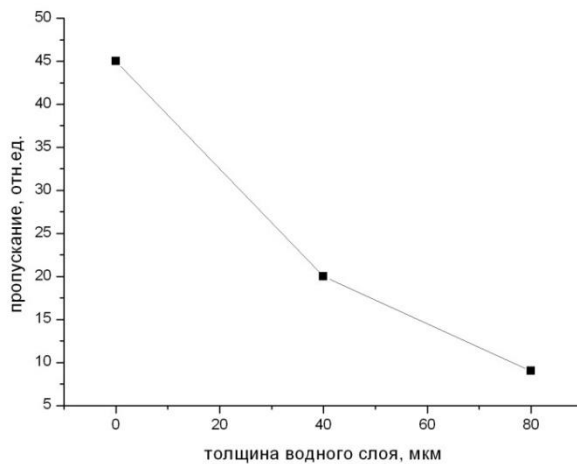


Рисунок 14. Зависимость пропускания излучения с длиной волны 130 мкм от толщины водного слоя.

Для облучения биологических образцов использовали специально разработанную кювету (рис. 15). Объем кюветы составляет 50 мкл при расстоянии между пленками в 40 мкм и диаметром кюветы – 50 мм (рис. 15). Сечение пучка излучения в плоскости кюветы представляет собой вытянутый эллипс. Для обеспечения равномерного экспонирования образца по всему объему, кювету вращали с помощью специального механизма – вращающего столика. Ось вращения проходила через край эллипса.

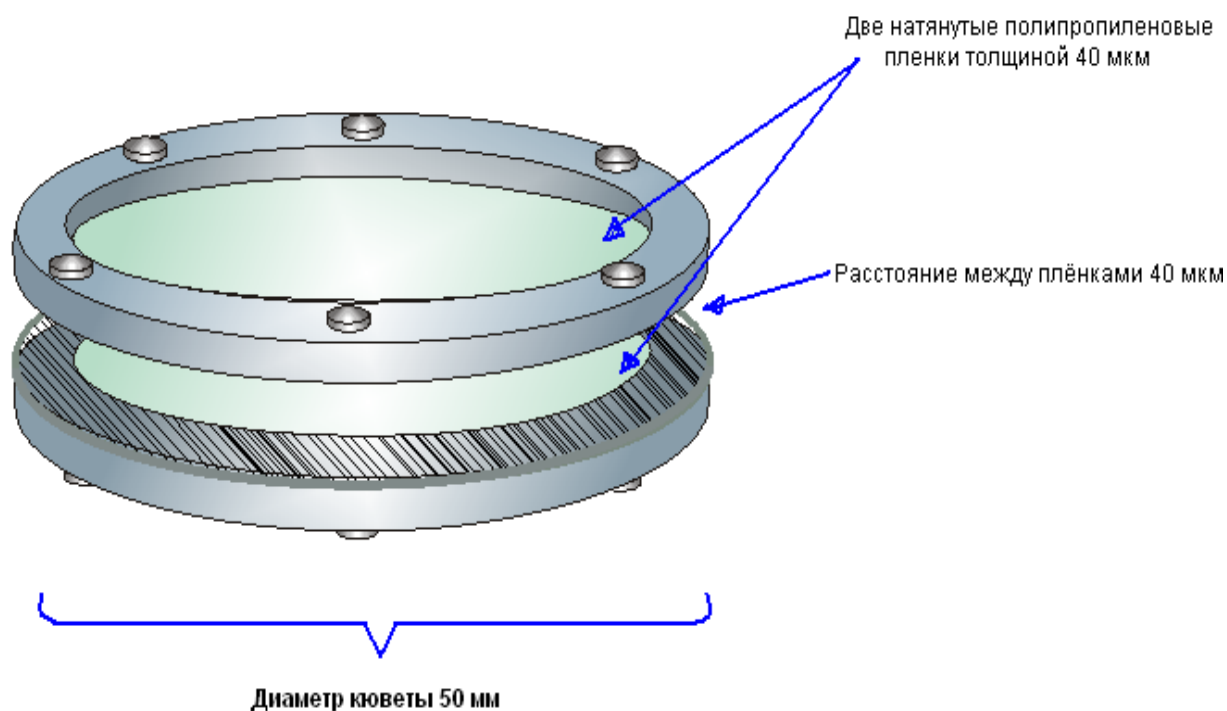


Рисунок 15 [Demidova E. V. et al., 2013]. Схематическое изображение кюветы для экспонирования биологических образцов.

Температуру среды в кювете контролировали при помощи тепловизора «ТКВр-СВИТ 101» (ИФП СО РАН) и поддерживали при помощи регулировки средней мощности путем изменения площади открытого отверстия обтюратора на уровне, требуемом условиями эксперимента с погрешностью $\pm 2^{\circ}\text{C}$.

Время экспозиции и плотность мощности излучения в дальнейших экспериментах подбирали, исходя из данных для поглощения ТГц излучения, приведенных на рисунке 14.

2.4 Статистическая обработка данных

Тестирование геносенсоров касательно влияния на них токсических агентов проводилось с использованием трех технических повторов. Для каждого эксперимента были рассчитаны стандартные отклонения, отображенные на рисунках в виде черных планок. На некоторых рисунках отклонения незначительны и планки перекрываются точками на графиках.

При облучении культур геносенсоров *E. coli/pCopA-GFP* и *E. coli/pEmrR-GFP* было проведено по три биологических повтора и рассчитаны нормированные уровни индукции, представляющий собой **отношение** интенсивности флюоресценции в опыте и положительном контроле к интенсивности флюоресценции отрицательного контроля в каждой точке измерения. Для полученных данных были рассчитаны стандартные отклонения. При сравнении силы ответа геносенсоров на естественные индукторы и ТГц излучение было проведено по три биологических повтора для каждого геносенсора и рассчитаны нормированные уровни индукции в точке 200 минут. Для полученных данных были рассчитаны стандартные отклонения.

Для обработки результатов экспериментов исследования нетермического воздействия ТГц излучения с облучением клеточной культуры (в ряде экспериментов) или минимальной среды был использован метод линейной регрессии. Для этого использовался программный пакет OriginPro 7.5 (OriginLab Corporation). С помощью него по алгоритму «linear fit» для значений флюоресценции в каждой точке отрицательного контроля и опыта (всего n точек) в каждом отдельном эксперименте производился расчет коэффициента B , следующего из формулы $Y = A + B * X$, и ошибка (Error) коэффициента B .

Коэффициент B 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.

Расчет осуществлялся по следующей формуле :

$$t = \frac{|B - B_0|}{\sqrt{Error^2 + Error_0^2}},$$

где B и Error – параметры для опыта, B_0 и Error₀ – параметры для отрицательного контроля.

Эксперименты, которые подвергались подобному анализу, параметры V_0/Error_0 , V/Error и уровень значимости в зависимости от n представлены в Приложении 1 [Дерффель К.,1994] (см. Приложение 2).

В эксперименте, показанном на рисунках 19 В(1), 19 В(2), графики приводились к линейному виду согласно формуле $y = x^{1/3}$.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1 Плазмидные конструкции

При изучении воздействия нетермического ТГц излучения были использованы плазмидные геносенсорные конструкции, предоставленные Лабораторией молекулярно-генетических систем [Khlebodarova T. M. et al., 2007], а также сконструированные в данной работе (таб. 7).

Таблица 7. 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 [Khlebodarova T. M. et al., 2007]	Сконструирована в данной работе	Была сконструирована ранее (Лаборатория молекулярно-генетических систем)	Сконструирована в данной работе
Естественный индуктор	Перекись водорода	Сульфат меди	Салициловая кислота	ТГц излучение

Создание плазмидных конструкций на основе промоторов генов *copA* и *glnA* осуществлялось на основе базового вектора pUC18-GFP, сконструированного также в рамках данной работы.

В качестве основы базового вектора pUC18-GFP была использована многокопийная плаزمида pUC18 [Perron C. Y. et al., 1985]. Амплификация плазмиды pUC18 (2686 п. н.) была проведена таким образом, что в полученном продукте ПЦР плазмиды pUC18 (2228 п. н.) исключалась нуклеотидная последовательность, содержащая ген *lacZ*, но сохранялся промотор гена *lacZ* (праймеры 1). Для амплификации гена белка GFP в качестве матрицы была использована геносенсорная конструкция pKatG-GFP (праймеры 2) (рис. 16). Далее проводились молекулярно-генетические манипуляции, согласно протоколам, описанным в Главе 2 (см. «Клонирование»). Трансформация осуществлялась методом электропорации с использованием электрокомпетентных клеток *E. coli* JM103 как описано в Главе 2. Колонии анализировали при помощи сине-белой селекции. Из

неокрашенных колоний была выделена плазмидная ДНК pUC18-GFP, которая использовалась в дальнейшем для создания плазмидных конструкций pSorA-GFP и pGlnA-GFP.

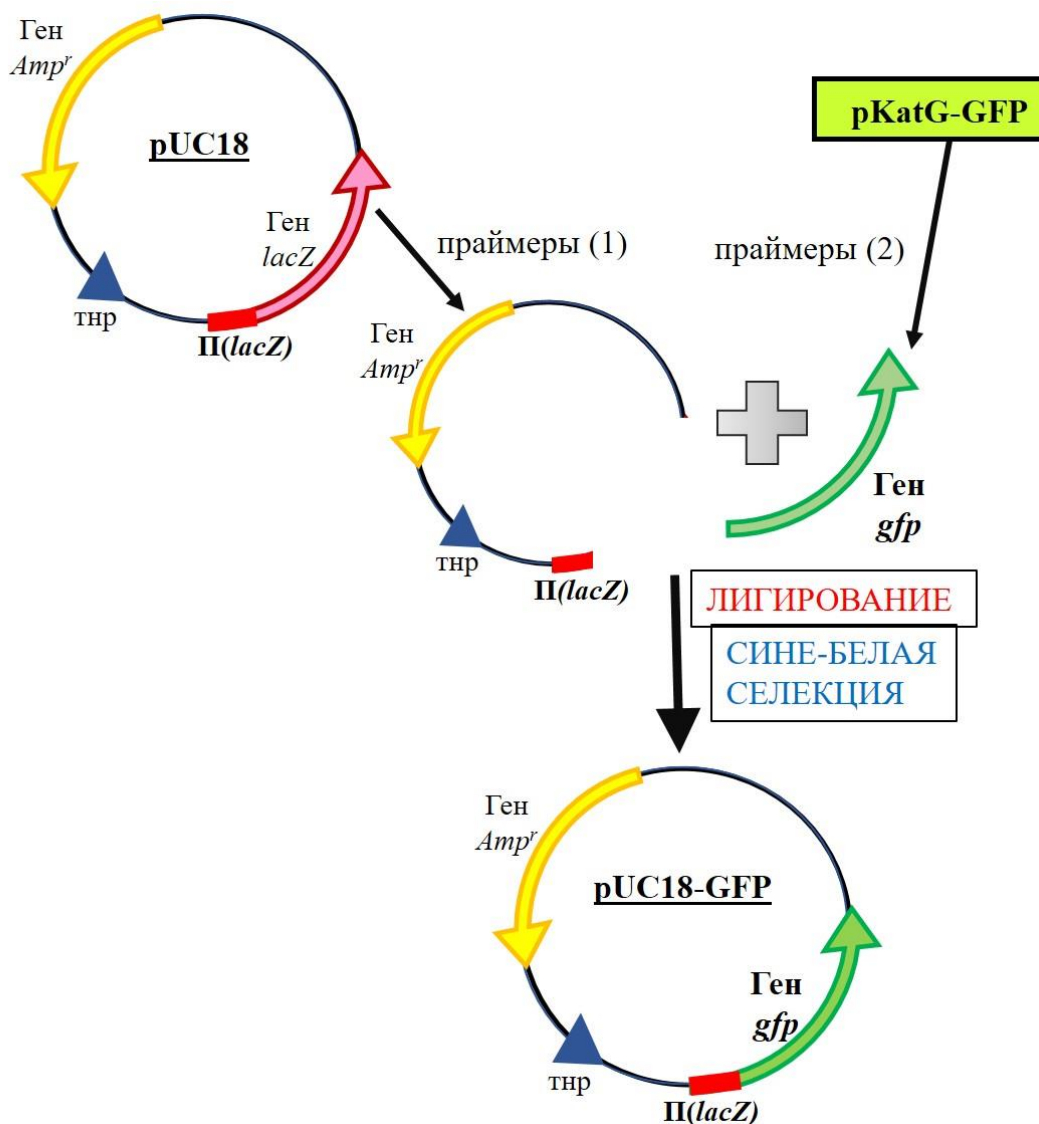


Рисунок 16. Схема получения базового вектора pUC18-GFP. $\Pi(lacZ)$ – промотор гена *lacZ*, *thr* – точка начала репликации.

Получение геносенсорных конструкций на основе промоторов генов *sorA* и *glnA* заключалось в амплификации продукта ПЦР полученной базовой плазмидной конструкции pUC18-GFP с исключением промотора гена *lacZ* и встройкой вместо него промоторной последовательности гена *sorA* (Приложение 1, пункт 1) или *glnA* (Приложение 1, пункт 2).

Для этого была проведена амплификация плазмиды pUC18-GFP с использованием праймеров (3). Фрагменты ДНК расчетной длины

выделялись непосредственно из агарозного геля согласно методике, описанной в Главе 2. Для получения фрагментов ДНК, содержащих промоторную последовательность генов *copA* или *glnA* использовали соответственно праймеры (4) или (5), в качестве матрицы использовалась геномная ДНК *E. coli* JM103. Далее проводились объединение продуктов ПЦР согласно протоколам, описанным в Главе 2 (см. «Клонирование») (рис. 17).

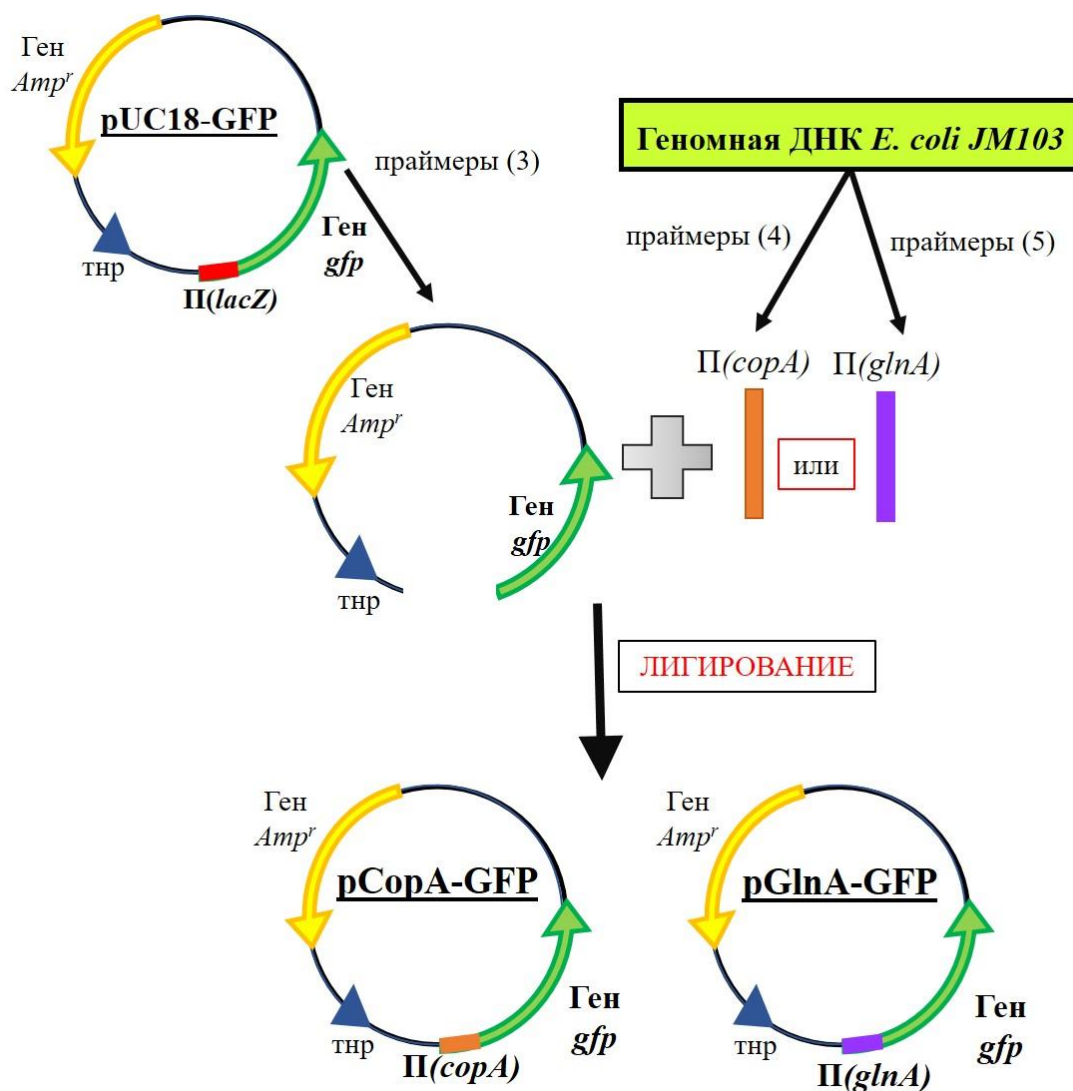


Рисунок 17. Схема получения геносенсорных конструкций pCopA-GFP и pGlnA-GFP. П(*copA*) – промотор гена *copA*, П(*glnA*) – промотор гена *glnA*, тнр – точка начала репликации.

3.2 Определение оптимальных концентраций естественных индукторов для геносенсоров

3.2.1 Тестирование геносенсора на основе промотора гена *katG*

Для тестирования динамики флюоресцентного ответа у геносенсора *E. coli/pKatG-GFP* при добавлении в среду перекиси водорода была подготовлена культура клеток геносенсора в минимальной среде М9. Индукция синтеза белка GFP осуществлялась добавлением в минимальную среду М9 перекиси водорода в концентрациях 1,25 мМ, 2,5 мМ и 5 мМ. Ответная реакция геносенсора *E. coli/pKatG-GFP* на естественный индуктор – перекись водорода – представлена на рисунке 18.

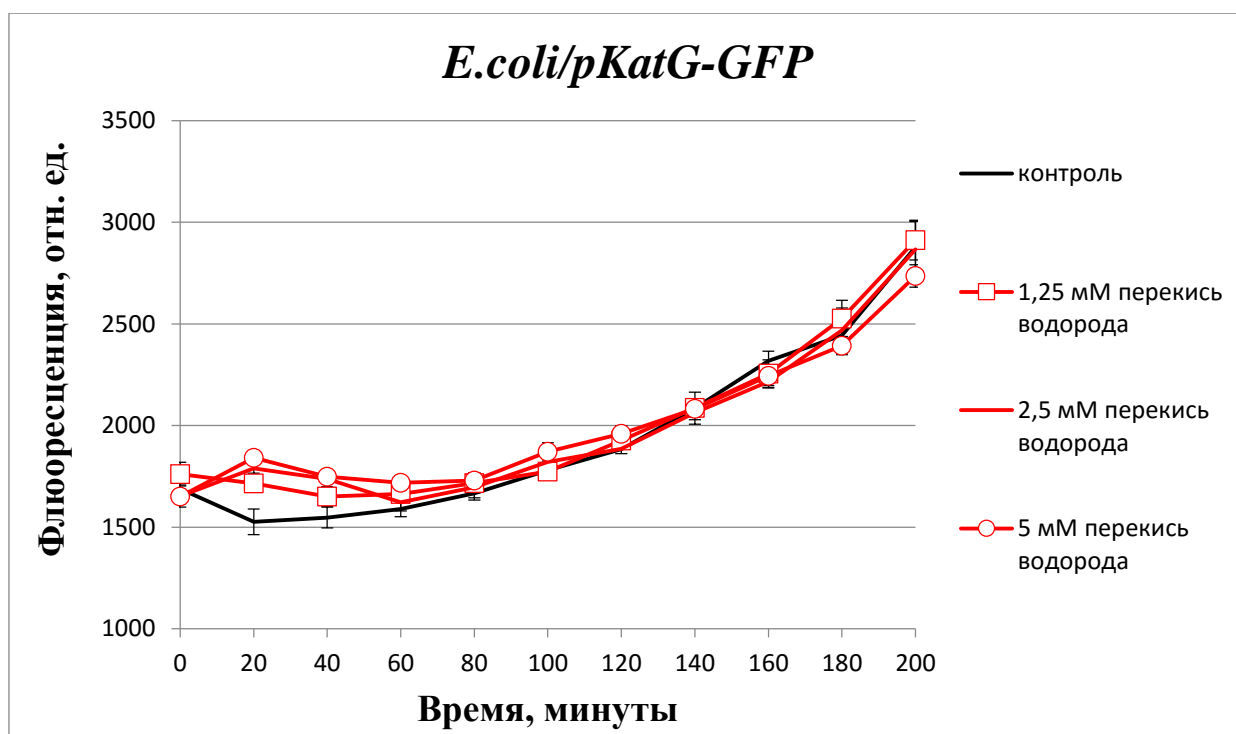


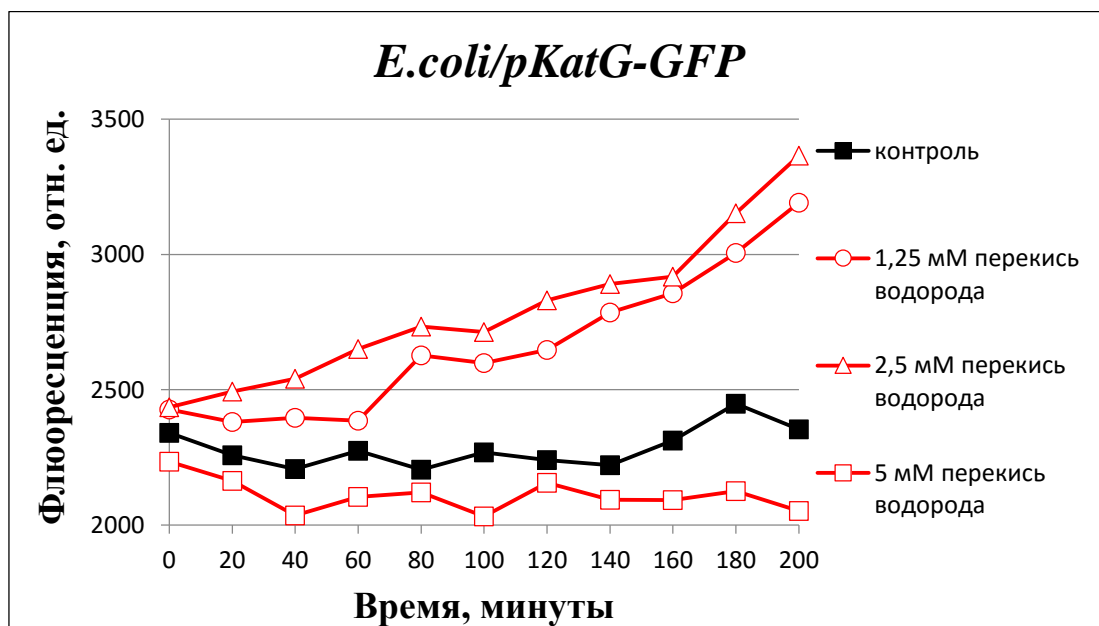
Рисунок 18. Влияние различных концентраций перекиси водорода на геносенсор *E. coli/pKatG-GFP* при температуре 37⁰С. Планки погрешностей демонстрируют стандартное отклонение трех технических повторов. В некоторых местах планки перекрываются графическими компонентами рисунка (точками).

Следует отметить, что тестирование всех геносенсоров, в том числе, геносенсора *E. coli/pKatG-GFP* проводилось регулярно после трансформации клеток *E. coli* JM103, перед экспериментами по нетермическому воздействию ТГц излучения. Результаты всегда демонстрировали повышение флюоресценции после добавления перекиси водорода в минимальную среду

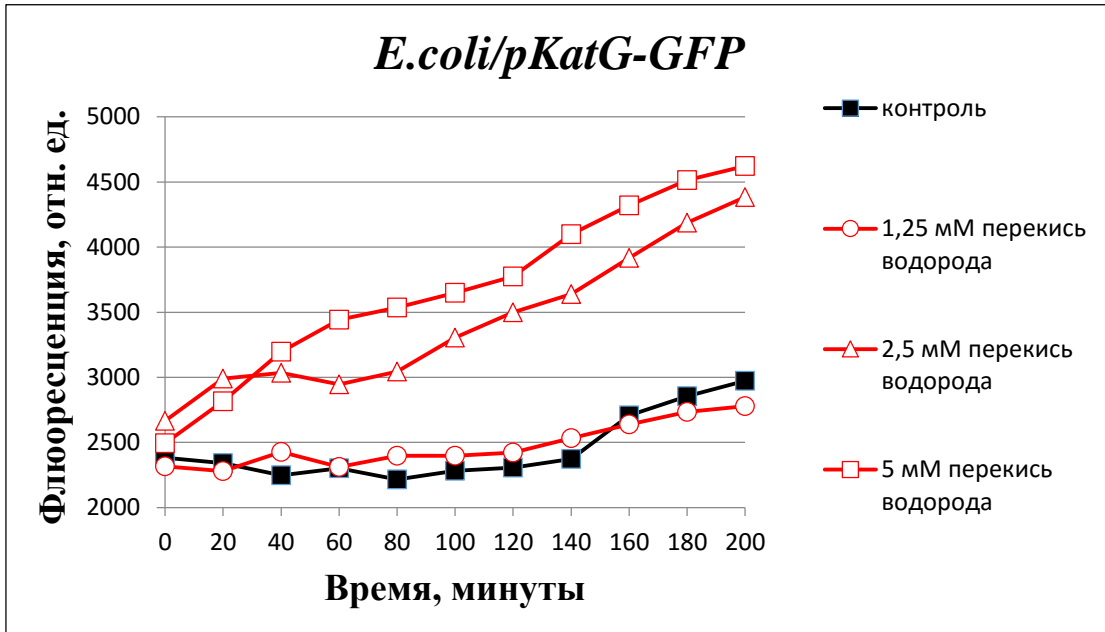
M9, но характер флюоресцентного ответа геносенсора имел отличия в разных экспериментах (рис. 19).

Во-первых, наблюдалась разная реакция геносенсора на одни и те же концентрации перекиси (рис. 19 А, Б). Увеличение флюоресценции клеток геносенсора при добавлении в минимальную среду перекиси водорода в концентрации 1,25 мМ наблюдалось не всегда. При добавлении перекиси водорода в концентрации 5 мМ иногда наблюдалось падение уровня флюоресценции относительно фонового уровня – клеток геносенсора, на которые не было оказано воздействия специфическим токсическим агентом, что предположительно может свидетельствовать об угнетении клеточной культуры. Объяснение наблюдаемых эффектов (рис. 19 А, Б) и описанная нестабильность флюоресцентного ответа может быть вызвана гетерогенностью активации геносенсора в разных клетках изогенной линии (в каждом эксперименте использовалась новая колония *E. coli/pKatG-GFP* [Rogers J. K. et al., 2015]). Кроме того, для геносенсора *E. coli/pKatG-GFP* характерны достаточно высокие фоновые значения и относительно небольшое повышение флюоресценции при воздействии перекиси, что также может вносить определенные погрешности и играть роль в визуализации результатов.

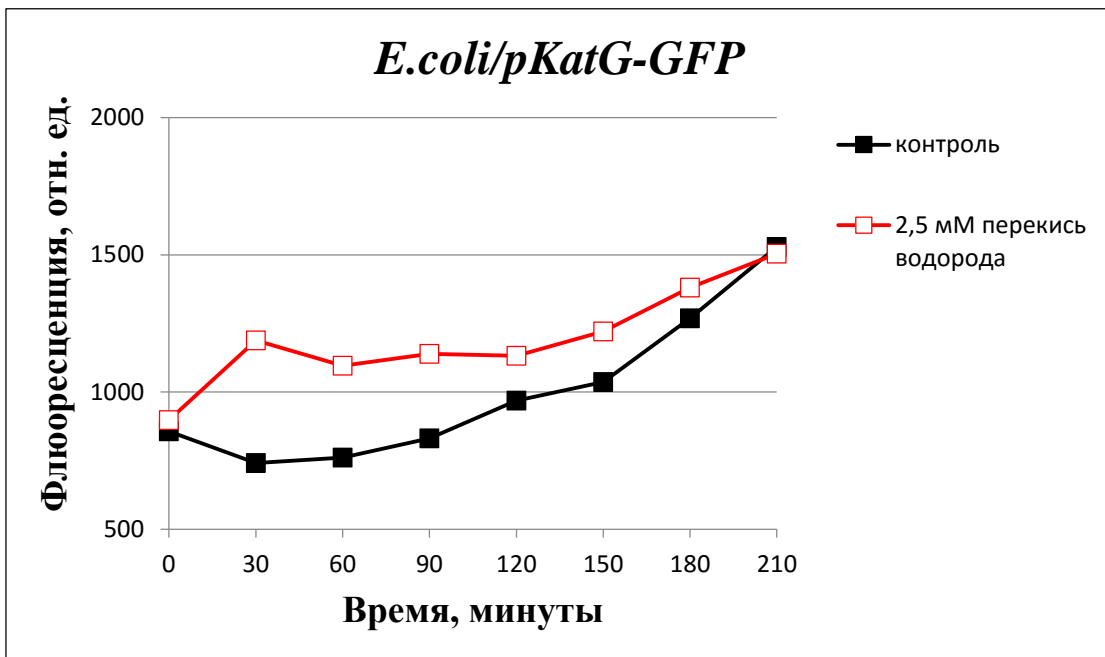
А



Б



В



Г

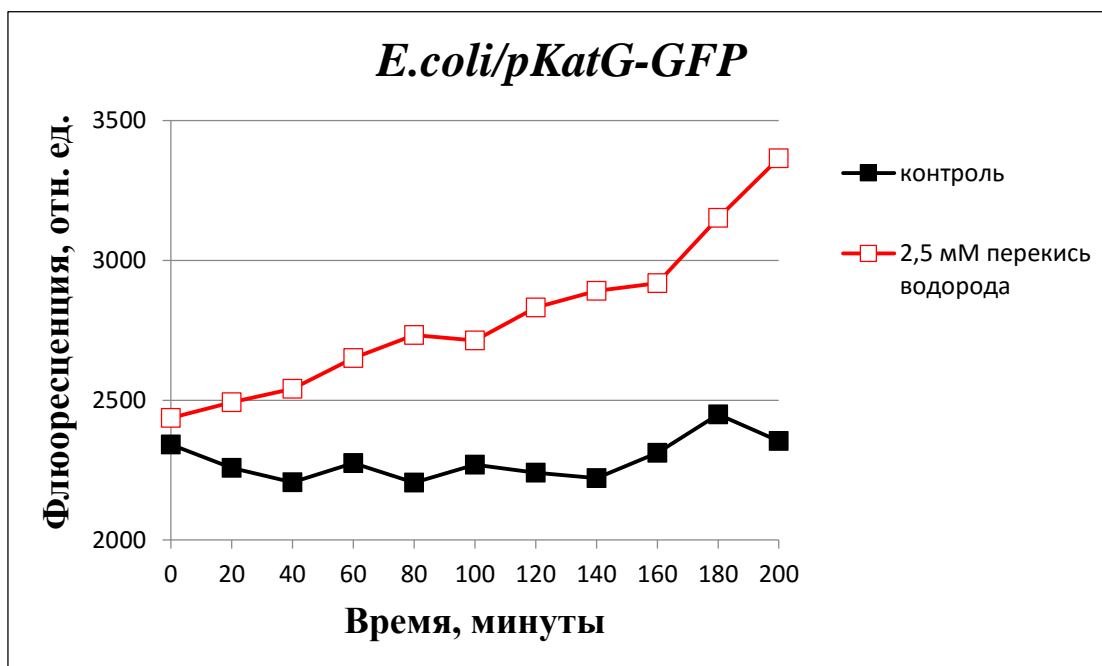


Рисунок 19. Влияние перекиси водорода на геносенсор *E. coli/pKatG-GFP*. Разное влияние одинаковых концентраций перекиси водорода на геносенсор *E. coli/pKatG-GFP* (А, Б); характер кинетической кривой при воздействии перекиси водорода на геносенсор *E. coli/pKatG-GFP* (В, Г).

Во-вторых, не всегда можно было наблюдать зависимость флуоресцентного ответа геносенсора от времени культивации, описанную в [Khlebodarova T. M. et. al., 2007] (рис.19 В, Г): кинетические кривые ответной реакции геносенсора *E. coli/pKatG-GFP* на перекись водорода могли иметь куполообразный вид (рис. 19 В), похожий на представленный в работе [Khlebodarova T. M. et. al., 2007] но менее выраженный, или демонстрировать постоянное увеличение флуоресценции относительно контрольного образца (рис. 19 Г). Возможно, это обстоятельство связано с нестабильностью перекиси водорода. Кроме того, в работе [Khlebodarova T. M. et. al., 2007] температура культивирования геносенсора *E. coli/pKatG-GFP* составляла 26⁰С, а в наших экспериментах – 37⁰С, возможно, это являлось одним из факторов, оказывающих влияние на характер развития флуоресцентного ответа или того факта, что наблюдаемое нами куполообразное повышение флуоресценции было менее интенсивным, чем в работе [Khlebodarova T. M. et. al., 2007]. В исследовании, посвященном изучению кинетики регулона

оксидативного стресса с использованием репортерных систем на основе GFP [Lu C. et al., 2005], эксперименты проводились при 35⁰С и полученные кинетические кривые совпадают с рис. 19 Г.

В проведенных нами тестах оптимальная концентрация перекиси водорода для индукции геносенсора *E. coli/pKatG-GFP* составила 2,5 мМ, именно эта концентрация обеспечивала наиболее стабильный флюоресцентный ответ клеток-сенсоров.

Также была протестирована температурная реакция клеток-сенсоров *E. coli/pKatG-GFP*. Для этого культуру нагревали при помощи термостата «Гном» до 42⁰С в течение 15 минут после чего измеряли уровень интенсивности флюоресцентного ответа. Было показано отсутствие индукции белка GFP у геносенсора *E. coli/pKatG-GFP* вследствие теплового шока (рис. 20).

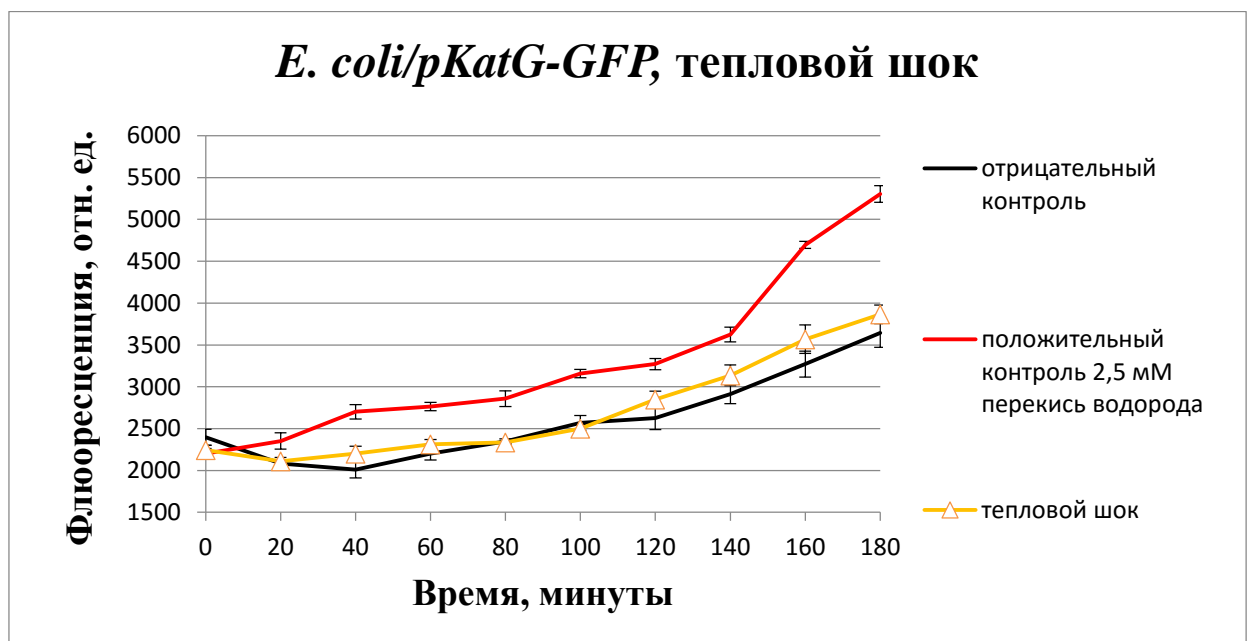


Рисунок 20. Проверка реакции геносенсора *E. coli/pKatG-GFP* на тепловой шок. Интенсивность флюоресценции белка GFP в клетках-сенсорах *E. coli/pKatG-GFP* после воздействия температурой 42⁰С в течение 15 минут. В качестве положительного контроля к геносенсору добавляли 2,5 мМ перекись водорода. Планки погрешностей демонстрируют стандартное отклонение трех технических повторов.

3.2.2 Тестирование геносенсора на основе промотора гена *copA*

Для анализа индукции флюоресцентного ответа, клетки геносенсора *E. coli/pCopA-GFP* подготовили описанным в Главе 2 способом с

использованием минимальной среды ГТМ [Riether K.B. et al., 2001]. Индукция синтеза белка GFP осуществлялась добавлением в минимальную среду ГТМ сульфата меди в концентрациях 12,5 мкМ, 25 мкМ и 50 мкМ (рис. 21).

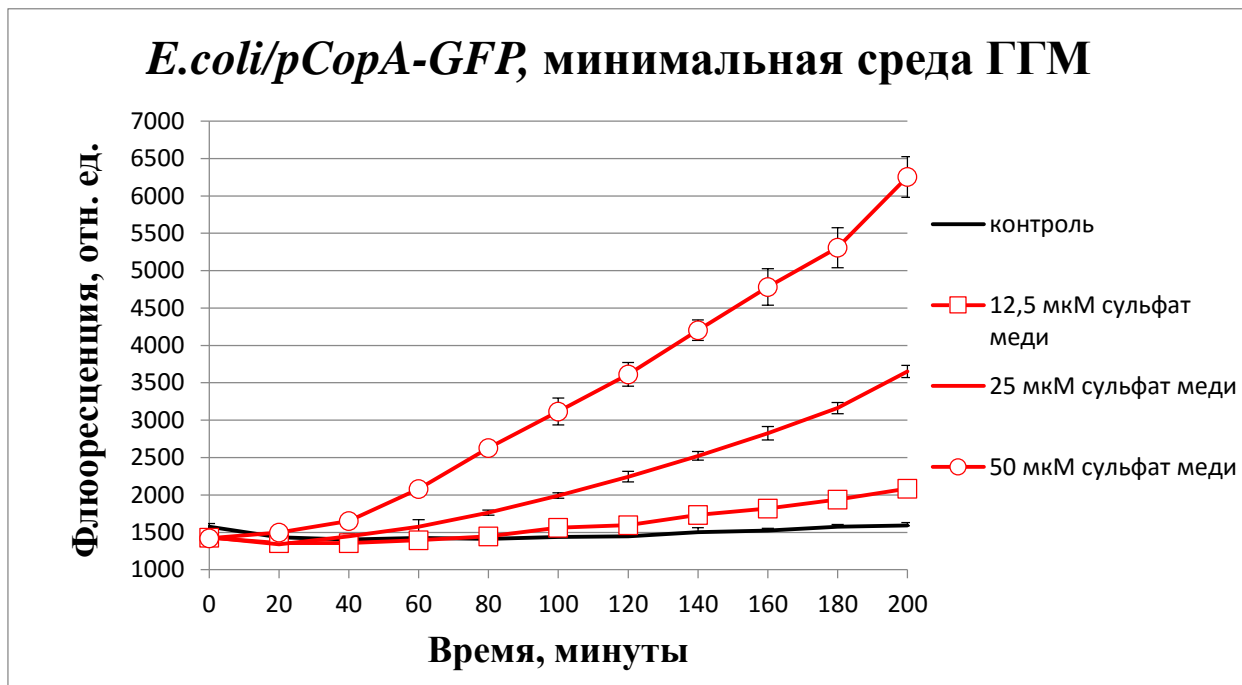


Рисунок 21. Влияние различных концентраций сульфата меди на геносенсор *E. coli/pCopA-GFP* в минимальной среде ГТМ при температуре 37⁰С. Планки погрешностей демонстрируют стандартное отклонение трех технических повторов.

Индукция синтеза белка GFP у геносенсора *E. coli/pCopA-GFP* заметна уже через 40 минут после добавления сульфата меди и характеризуется достоверным постоянным увеличением флюоресценции относительно контрольного образца для всех опытных образцов, при этом сила флюоресцентного ответа прямо пропорциональна концентрации индуктора.

Дополнительно проверяли температурную реакцию клеток-сенсоров *E. coli/pCopA-GFP*. Для этого культуру нагревали при помощи термостата «Гном» до 42⁰С в течение 15 минут после чего измеряли интенсивность флюоресцентного ответа (рис. 22).

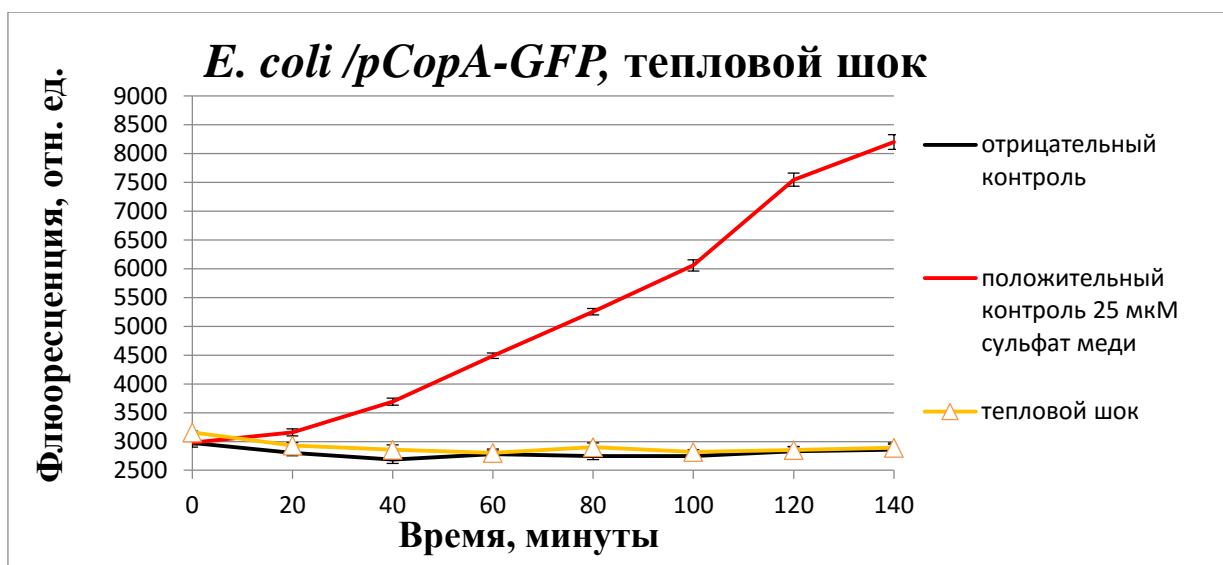


Рисунок 22. Интенсивность флюоресценции белка GFP у геносенсора *E. coli/pCopA-GFP* после теплового шока. На бактерии оказывали воздействие температурой 42⁰C в течение 15 минут, в качестве положительного контроля к геносенсору добавляли 25 мкМ сульфата меди. Планки погрешностей демонстрируют стандартное отклонение трех технических повторов.

Было показано отсутствие индукции флюоресцентного белка GFP у геносенсора *E. coli/pCopA-GFP* вследствие теплового шока.

Также было проведено тестирование геносенсора *E. coli/pCopA-GFP* с использованием минимальной среды M9, при этом сульфат меди добавляли в концентрациях 12,5 мкМ, 25 мкМ, 50 мкМ и 100 мкМ (рис. 23).

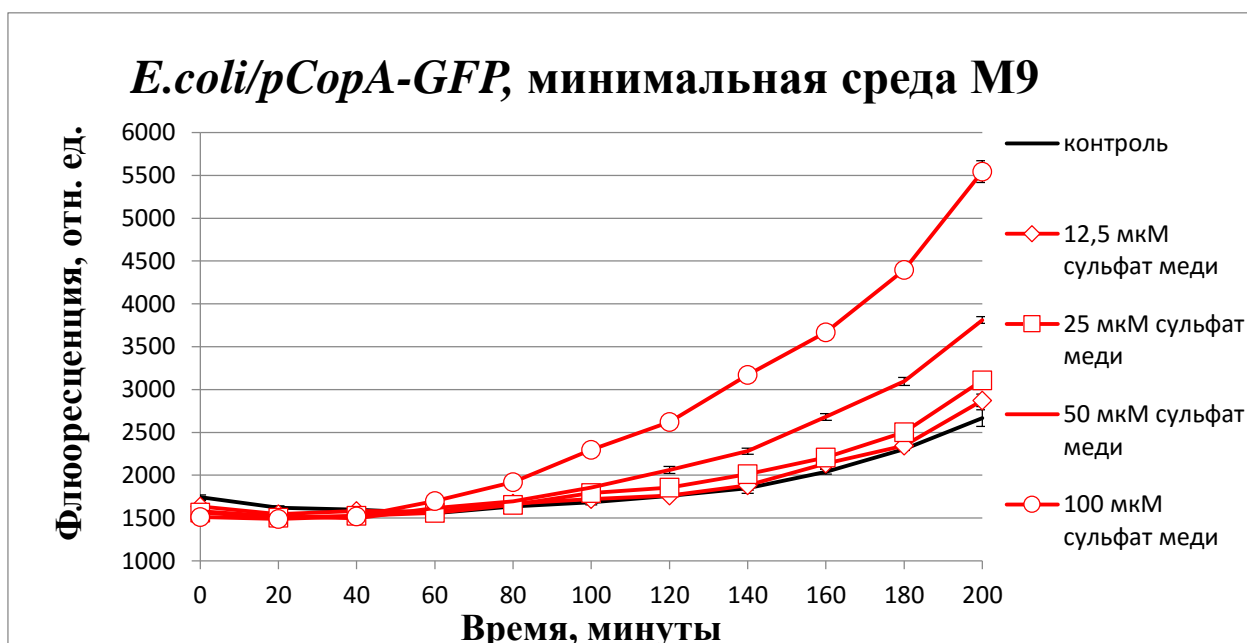


Рисунок 23. Влияние различных концентраций сульфата меди на геносенсор *E. coli/pCopA-GFP* в минимальной среде M9 при температуре 37⁰C. Планки погрешностей демонстрируют стандартное отклонение трех технических повторов.

Для геносенсора в *E. coli/pCopA-GFP* в минимальной среде М9 показана индукция синтеза белка GFP, характеризующаяся выраженным постоянным увеличением флюоресценции относительно контрольного образца, при этом сила флюоресцентного ответа прямо пропорциональна концентрации сульфата меди. Однако, в отличие от минимальной среды ГГМ, индукция синтеза белка GFP в минимальной среде М9 у геносенсора *E. coli/pCopA-GFP* становится заметна через 80 минут после добавления индуктора, также сдвигается порог чувствительности геносенсора, при добавлении индуктора в концентрации 12,5 мкМ не наблюдается значимых отличий от контрольного образца.

Таким образом, оптимальными концентрациями естественного индуктора – сульфата меди для геносенсора *E. coli/pCopA-GFP* являются 25 мкМ – для среды ГГМ, и 50 мкМ – для среды М9.

3.2.3 Тестирование геносенсора на основе промотора гена *emrR*

Для индукции синтеза флюоресцентного белка GFP, клетки подготовили описанным в Главе 2 способом с использованием минимальной среды М9. Известно, что оптимальная концентрация индуктора – салициловой кислоты для геносенсора *E. coli/pEmrR-GFP* составляет 0,1 мМ – 0,5 мМ (по сообщению сотрудников Лаборатории молекулярно-генетических систем), поэтому тестирование индукции синтеза GFP и проверка работоспособности геносенсора осуществлялась добавлением в минимальную среду М9 салициловой кислоты в концентрациях 0, 1 мМ и 0, 5 мМ (рис. 24).

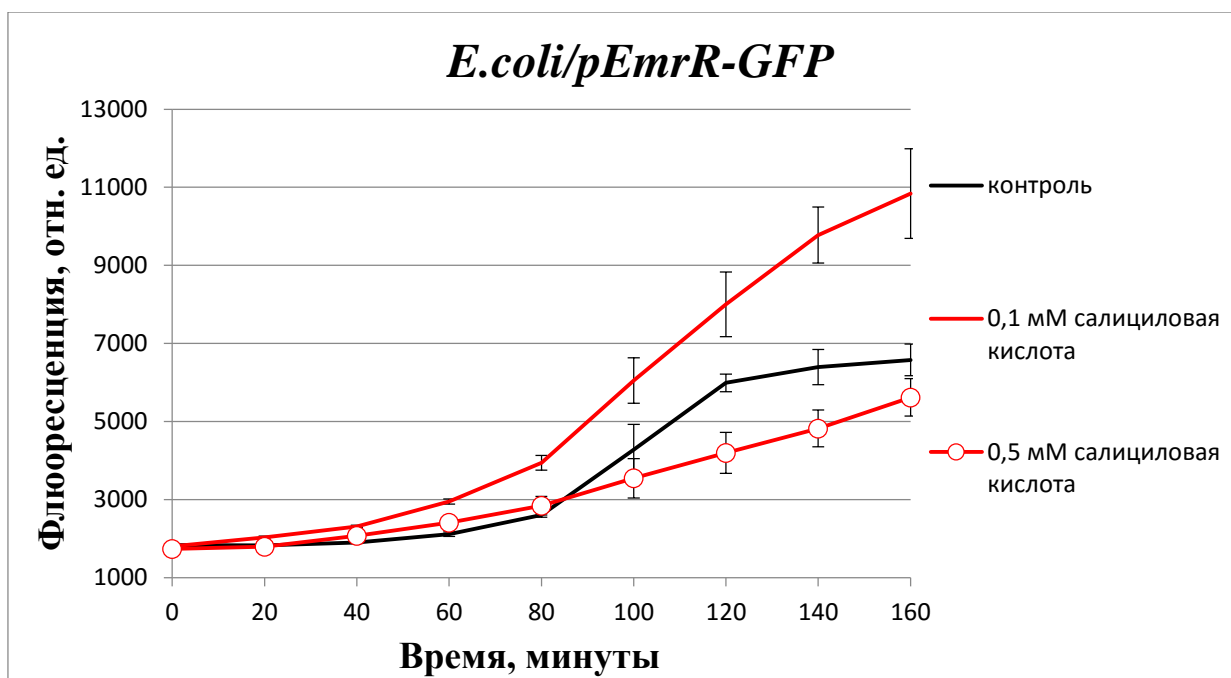


Рисунок 24. Влияние различных концентраций салициловой кислоты на геносенсор *E. coli/pEmrR-GFP* в минимальной среде М9 при температуре 37⁰С. Планки погрешностей демонстрируют стандартное отклонение трех технических повторов.

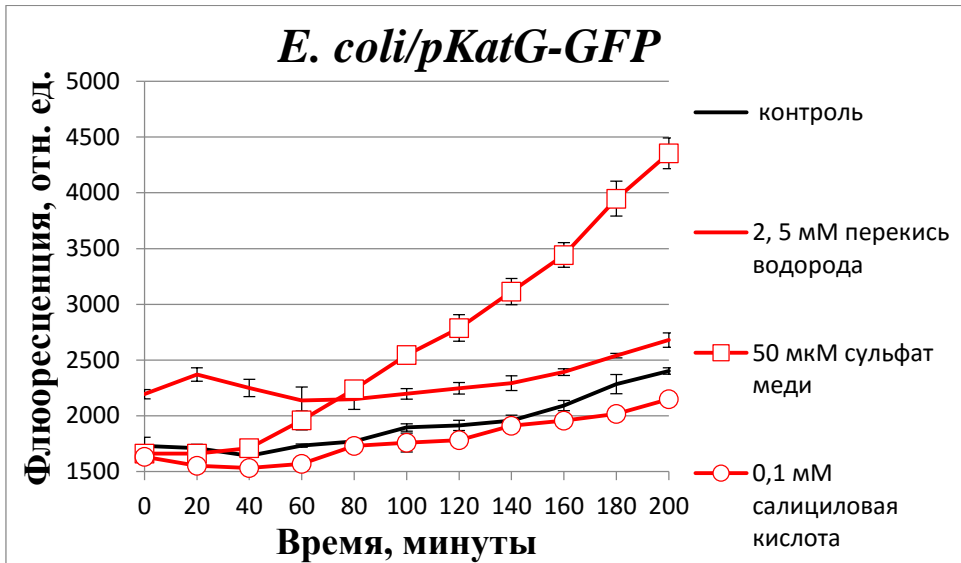
Стабильная индукция флюоресцентного белка GFP у геносенсора *E. coli/pEmrR-GFP* наблюдалась при концентрации естественного индуктора – салициловой кислоты – в концентрации 0,1 мМ. Следует отметить высокие значения фоновой флюоресценции, характерные для данного геносенсора, которые в ходе эксперимента могли значительно увеличиваться, тем не менее индуцированный синтез флюоресцентного белка GFP при добавлении салициловой кислоты с концентрацией 0,1 мМ достоверен и стабилен.

3.3 Сравнительное изучение индукции геносенсоров *E. coli/pKatG-GFP*, *E. coli/pCopA-GFP*, *E. coli/pEmrR-GFP*, *E. coli/pGlnA-GFP* перекисью водорода, сульфатом меди и салициловой кислотой

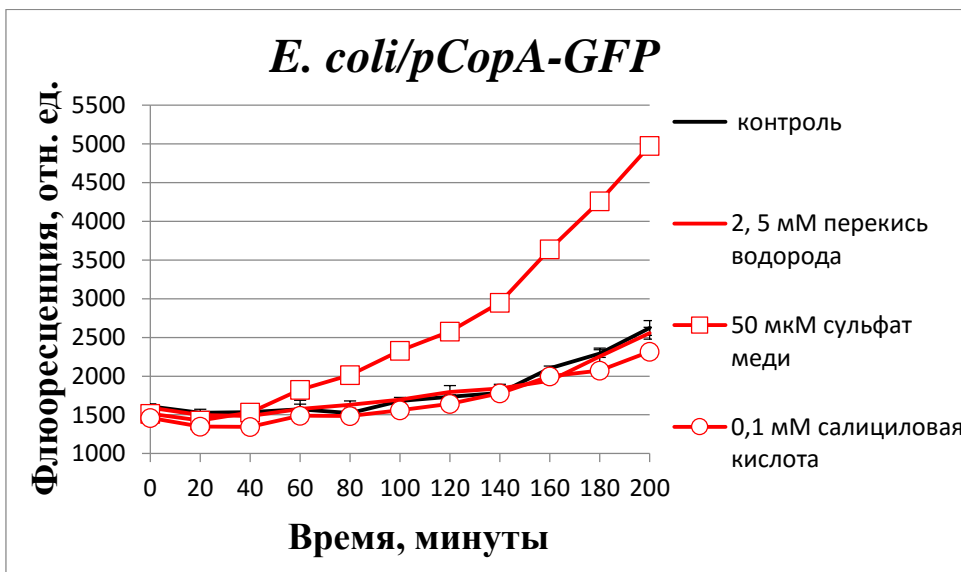
Все геносенсоры были протестированы на способность к перекрестной индукции синтеза белка GFP различными токсичными агентами: к культурам клеток геносенсоров *E. coli/pKatG-GFP*, *E. coli/pCopA-GFP*, *E. coli/pEmrR-GFP* и *E. coli/pGlnA-GFP* в минимальной среде М9 были добавлены

индукторы в конечных концентрациях: перекись водорода 2,5 мМ, сульфат меди 50 мкМ, салициловая кислота 0,1 мМ (рис. 25).

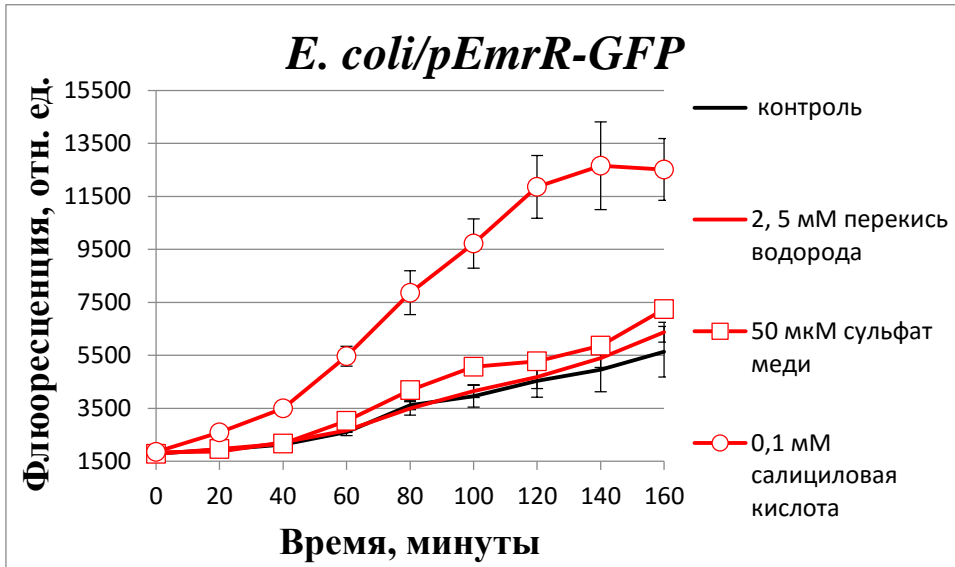
А



Б



В



Г

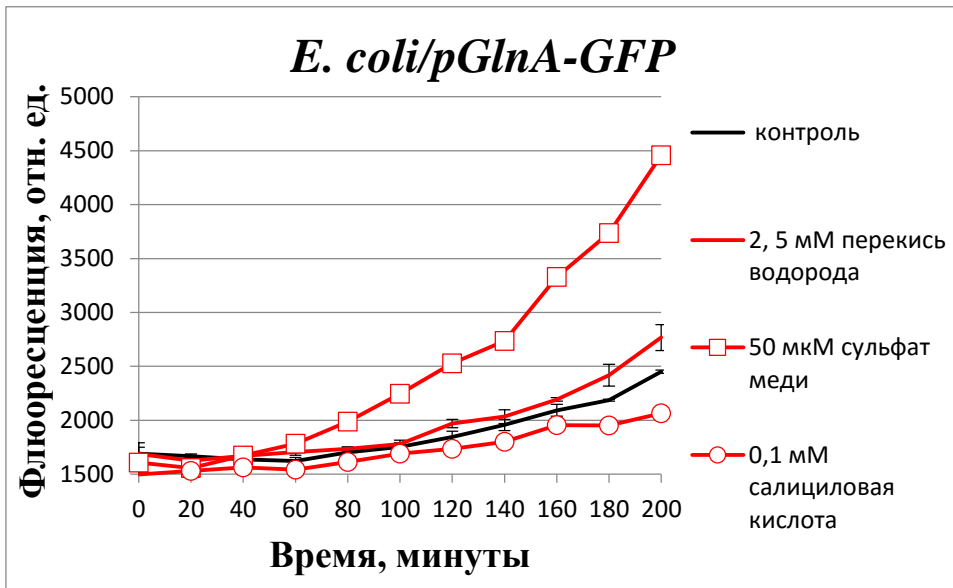


Рисунок 25. Индукция геносенсоров *E. coli/pKatG-GFP*, *E. coli/pCopA-GFP* и *E. coli/pEmrR-GFP*, *E. coli/pGlnA-GFP* разными токсическими агентами. **А** – динамика интенсивности флюоресцентного ответа в клетках-сенсорах *E. coli/pKatG-GFP* при воздействии 2,5 мМ перекиси водорода (естественный индуктор), 50 мкМ сульфата меди и 0,1 мМ салициловой кислоты; **Б** – динамика интенсивности флюоресцентного ответа в клетках-сенсорах *E. coli/pCopA-GFP* при воздействии 2,5 мМ перекиси водорода, 50 мкМ сульфата меди (естественный индуктор) и 0,1 мМ салициловой кислоты; **В** – динамика интенсивности флюоресцентного ответа в клетках-сенсорах *E. coli/pEmrR-GFP* при воздействии 2,5 мМ перекиси водорода, 50 мкМ сульфата меди и 0,1 мМ салициловой кислоты (естественный индуктор). **Г** – Динамика интенсивности флюоресцентного ответа в клетках-сенсорах *E. coli/pGlnA-GFP* при воздействии 2,5 мМ перекиси водорода, 50 мкМ сульфата меди и 0,1 мМ салициловой кислоты. Планки погрешностей демонстрируют стандартное отклонение трех технических повторов.

Для всех геносенсоров следует отметить индукцию флюоресцентного ответа при добавлении в среду сульфата меди, особенно интенсивный ответ наблюдался у геносенсоров *E. coli/pCopA-GFP*, *E. coli/pKatG-GFP*, и *E. coli/pGlnA-GFP*. Перекись водорода служит индуктором только для геносенсоров *E. coli/pKatG-GFP* и *E. coli/pGlnA-GFP*. Для геносенсора *E. coli/pGlnA-GFP* увеличение флюоресценции культуры клеток вследствие воздействия перекиси водорода выражено слабо. Салициловая кислота индуцирует экспрессию флюоресцентного белка только у геносенсора *E. coli/pEmrR-GFP*, для которого она является естественным индуктором, у других геносенсоров она, скорее всего, приводит к угнетению культуры, что выражается в небольшом снижении флюоресцентного ответа по сравнению с фоновым уровнем (контролем).

3.4 Облучение клеточных культур геносенсоров

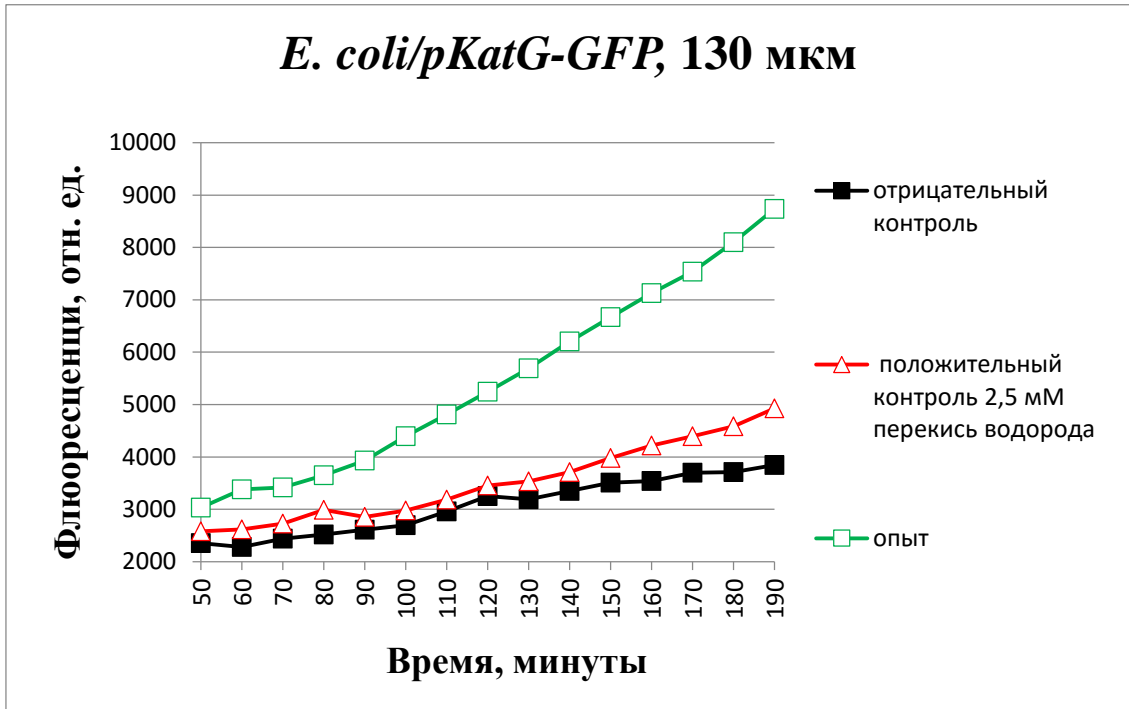
3.4.1 Облучение геносенсора *E. coli/pKatG-GFP* и его реакция на нетермическое воздействие ТГц излучения

3.1.2.1 Облучение геносенсора *E. coli/pKatG-GFP* в течение 15 минут при различных длинах волн

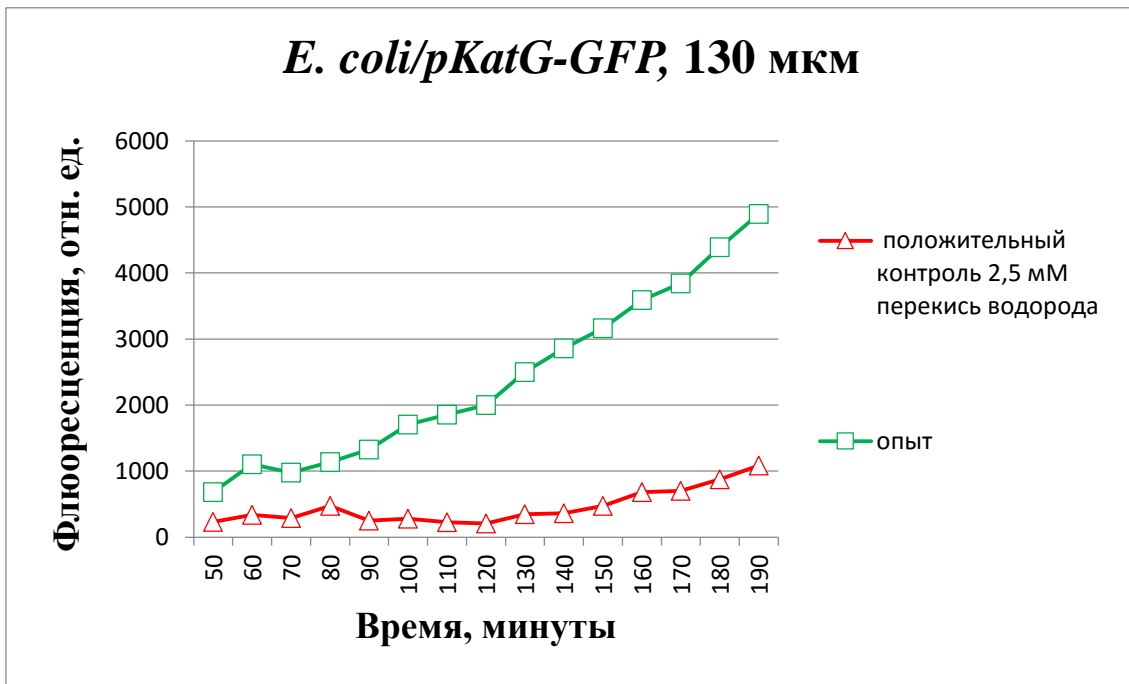
В связи с существенной разницей в значениях уровня флюоресценции в разных экспериментах с геносенсорами, маркирующими различные стрессовые системы *E. coli*, в настоящей работе под серией экспериментов мы будем понимать эксперименты, связанные одним и тем же геносенсором, одной и той же клеточной линией, в одной и той же начальной концентрации и т.д., подвергнутый воздействию разных доз облучения и т.д.

Проведена серия экспериментов облучения клеток геносенсора *E. coli/pKatG-GFP* ТГц излучением при длинах волн, составляющих 130 мкм, 150 мкм и 200 мкм, с плотностью мощности 1,4 Вт/см² (рис. 26, А(1,2), Б(1,2), В(1,2)).

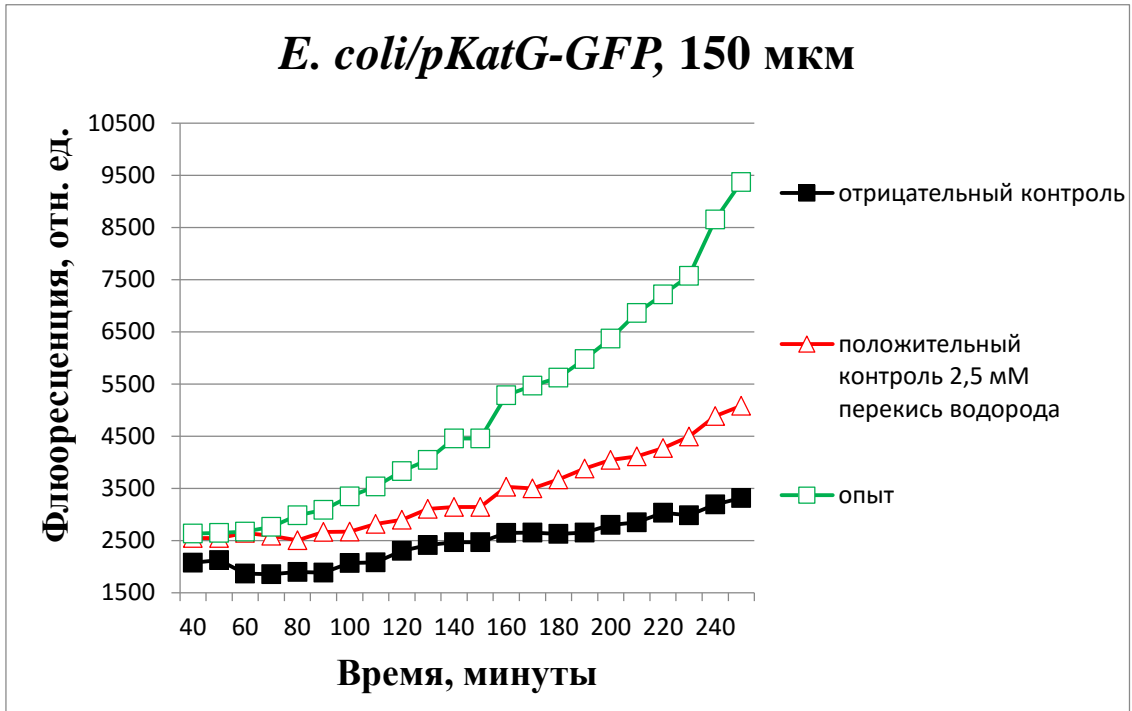
A(1)



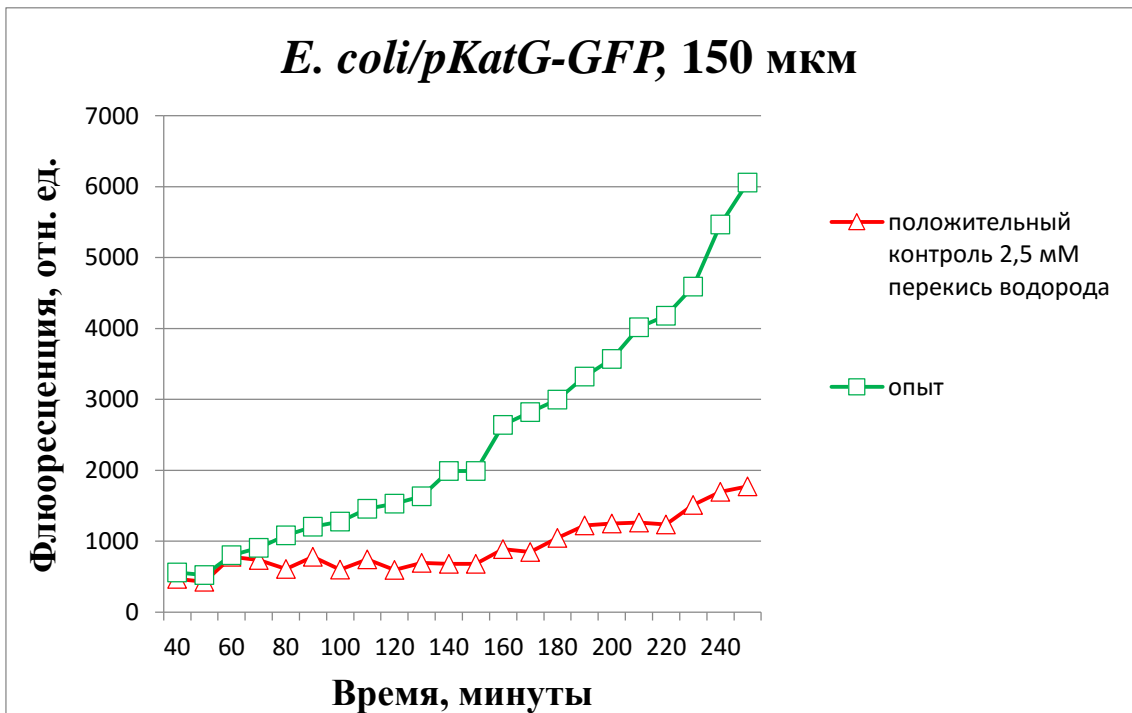
A(2)



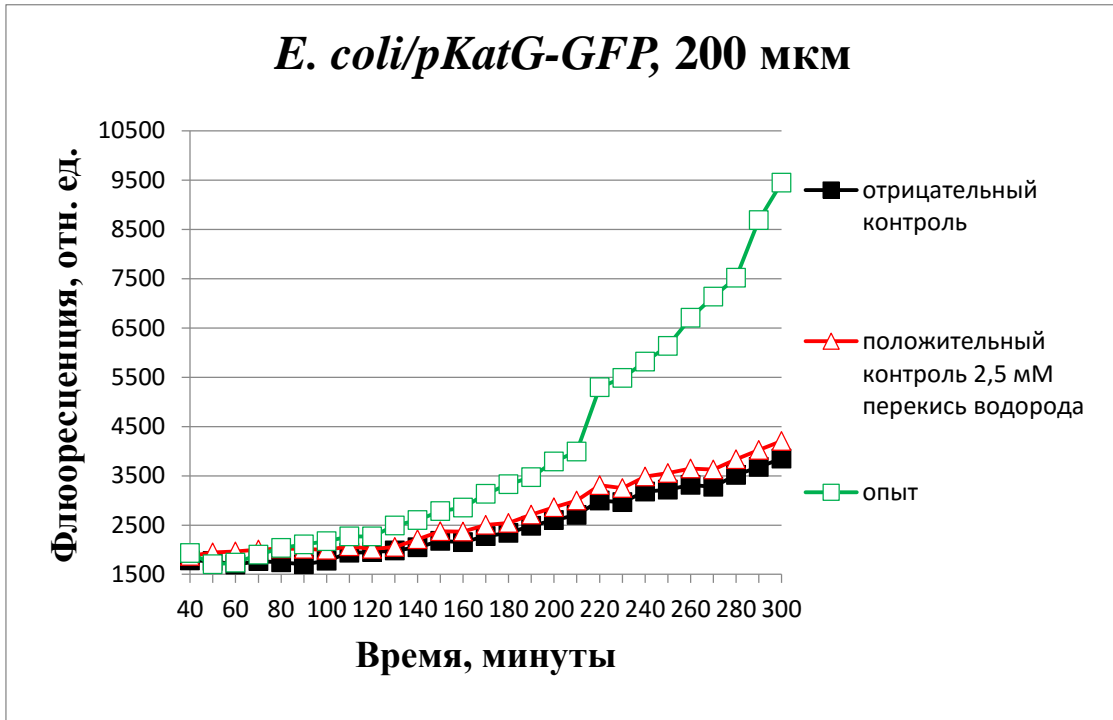
Б(1)



Б(2)



В(1)



В(2)

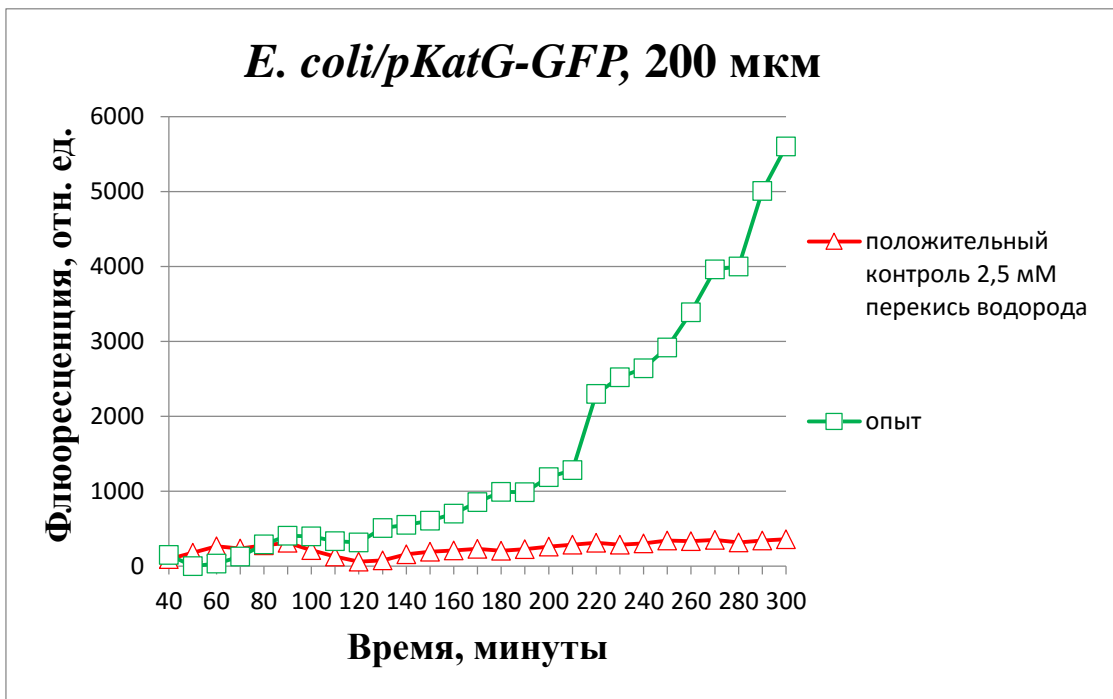


Рисунок 26. Интенсивность флюоресценции GFP-белка в клетках геносенсора *E. coli/pKatG-GFP* после 15 минут нетермического воздействия ТГц излучения. А(1), Б(1), В(1) – с длиной волны соответственно 130 мкм, 150 мкм и 200 мкм; А(2), Б(2), В(2) – с длиной волны соответственно 130 мкм, 150 мкм и 200 мкм с вычетом фоновой флюоресценции образцов отрицательного контроля. Отрицательный контроль – необлученные клетки с нулевой концентрацией индуктора, 2,5 мМ перекись водорода – индуктор (положительный контроль). Значения опыта и отрицательного контроля сравнивались с использованием метода линейной регрессии (см. Приложение 2, пункты 1-3).

На рисунке 26 приведены значения уровня экспрессии белка GFP при индукции клеток геносенсора ТГц излучением и длиной волны 130, 150 и 200 мкм в течение 15 минут и 2,5 мМ перекиси водорода в качестве положительного контроля. Из рисунка 26 видно, что облучение ТГц излучением в течение 15 минут при длине волны 130 мкм и 200 мкм приводит к индукции экспрессии белка GFP в клетках геносенсора *E. coli/pKatG-GFP*, при этом заметное накопление белка GFP в клетках начинается примерно через 150 минут после облучения.

Следует отметить отсроченное во времени развитие ответной реакции клеток геносенсора на облучение по сравнению с положительным контролем, при этом в опыте значения флюоресценции 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, что может привести, соответственно, и к увеличению количества флюоресцентного белка GFP в эксперименте. 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 флюоресценции (таб. 8).

Полученные результаты показали, что динамика роста клеток в контроле и эксперименте не отличается. Показано, что характер индукции флюоресцентного белка GFP у геносенсора *E. coli/pKatG-GFP* остается одинаковым при облучении ТГц облучением с различной длиной волны: 130 мкм, 150 мкм, 200 мкм.

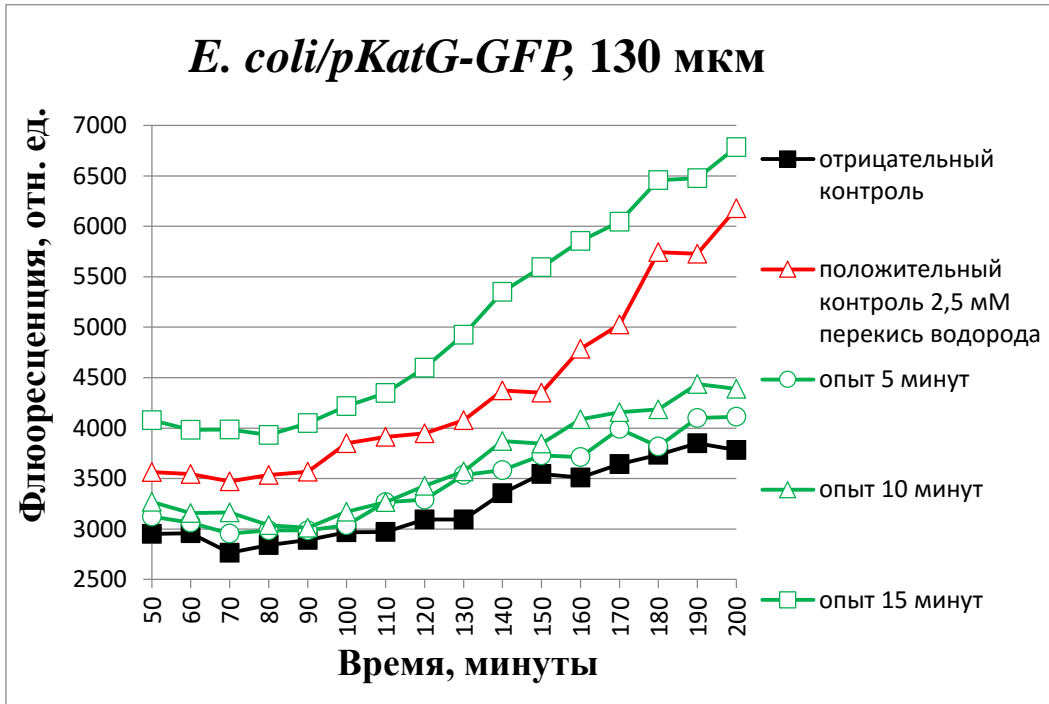
Таблица 8. Количество колоний геносенсора *E. coli/pKatG-GFP* до и после измерения динамики флюоресцентного ответа в облученных образцах и образцах отрицательного контроля.

Количество колоний в <u>контрольном</u> образце 130 мкм (Начало измерения флюоресценции/конец измерения флюоресценции)	Количество колоний в <u>опытном</u> образце 130 мкм (Начало измерения флюоресценции/конец измерения флюоресценции)
472(±53)/948(±104)	468(±25)/1200(±143)
Количество колоний в <u>контрольном</u> образце 150 мкм (Начало измерения флюоресценции/конец измерения флюоресценции)	Количество колоний в <u>опытном</u> образце 150 мкм (Начало измерения флюоресценции/конец измерения флюоресценции)
163(±21)/231(±43)	102(±18)/164(±31)
Количество колоний в <u>контрольном</u> образце 200 мкм (Начало измерения флюоресценции/конец измерения флюоресценции)	Количество колоний в <u>опытном</u> образце 200 мкм (Начало измерения флюоресценции/конец измерения флюоресценции)
22(±7)/519(±38)	75(±12)/580(±45)

3.1.2.2 Облучение геносенсора *E. coli/pKatG-GFP* в течение 5, 10 и 15 минут при длине волны 130 мкм

С целью определения минимальной дозы облучения проведены эксперименты по облучению клеток геносенсора *E. coli/pKatG-GFP* ТГц излучением в течение 5, 10 и 15 минут при длине волны 130 мкм (рис. 27, А, Б).

А



Б

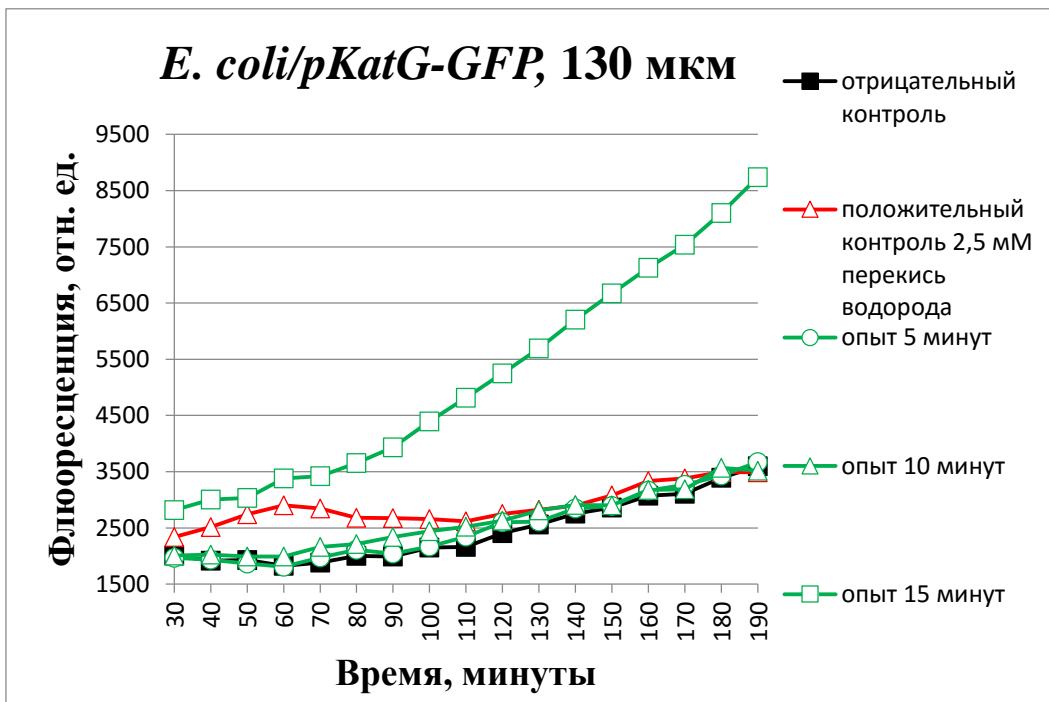


Рисунок 27. Интенсивность флюоресценции белка GFP в клетках геносенсора *E. coli/pKatG-GFP* после 5, 10 и 15 минут нетермического воздействия ТГц излучения с длиной волны 130 мкм. А – эксперимент 1, Б – эксперимент 2. Значения опыта и отрицательного контроля сравнивались с использованием метода линейной регрессии (см. Приложение 2, пункты 4-9).

Из рисунка 27 (А, Б) видно, что только облучение ТГц излучением в течение 15 минут приводит к выраженной индукции экспрессии белка GFP в

клетках геносенсора *E. coli/pKatG-GFP*. При этом, при облучении геносенсора в течение 10 минут индукция экспрессии белка GFP проявлялась нестабильно, облучение в течение 5 минут никогда не приводило к выраженному ответу в виде увеличения флюоресценции.

Аналогичные результаты были получены при облучении геносенсора *E. coli/pKatG-GFP* при длине волны 150 мкм (для 10 и 15 минут) и 200 мкм (для 5 и 15 минут).

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

Проведено по 3 полностью независимых биологических эксперимента с облучением 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.

В экспериментах с облучением клеточных культур *E. coli/pCopA-GFP* и *E. coli/pEmrR-GFP* для 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. Полученные значения подвергались статистической обработке – для них было рассчитано стандартное отклонение.

На рисунке 28 показана зависимость уровня индукции флюоресценции геносенсора *E. coli/pCopA-GFP* от времени.

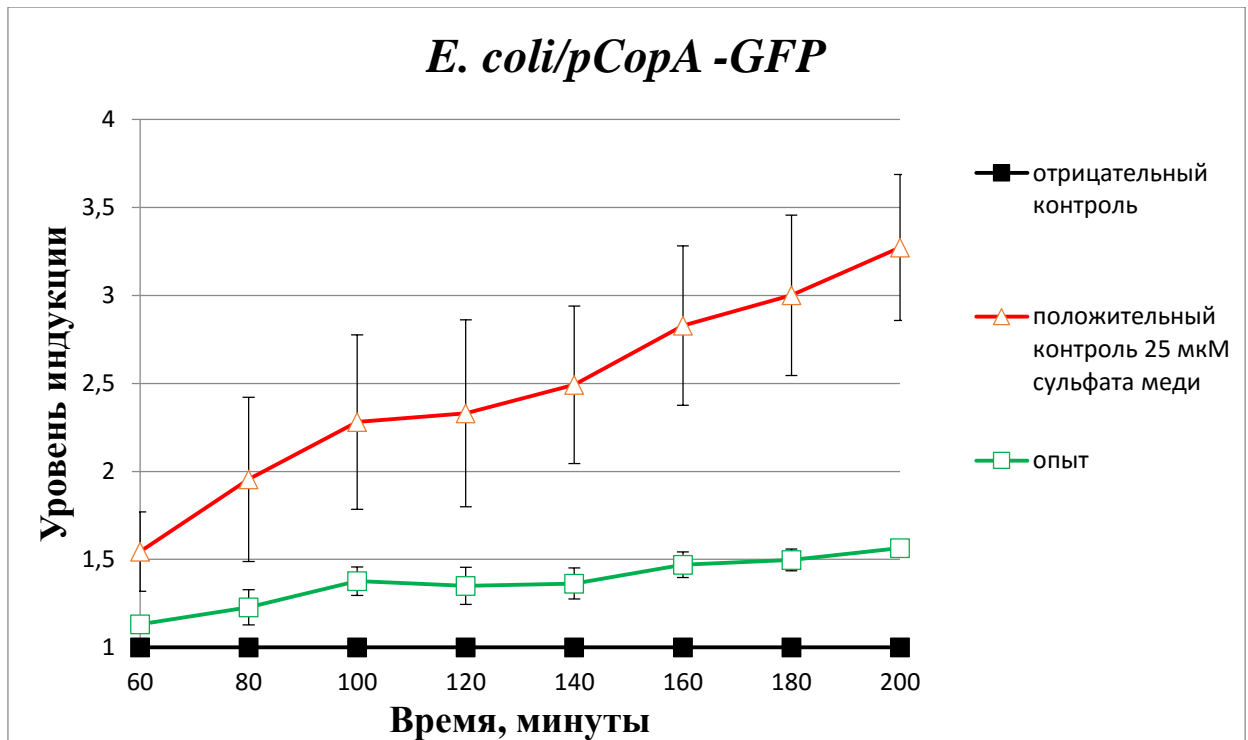


Рисунок 28. Интенсивность флюоресценции белка GFP в клетках-сенсорах *E. coli/pCopA-GFP* после воздействия в течение 15 минут ТГц излучением с длиной волны 130 мкм и плотностью мощности 1,4 Вт/см². Отрицательный контроль – необлученные клетки, положительный контроль – 25 мкМ сульфат меди. Планки погрешностей демонстрируют стандартное отклонение трех биологических повторов.

Из рисунка 28 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. Следует отметить, что под действием естественного индуктора уровень индукции клеток геносенсора *E. coli/pCopA-GFP* существенно выше, чем после нетермического воздействия ТГц излучения.

На рисунке 29 приведена зависимость интенсивности флюоресценции геносенсора *E. coli/pEmrR-GFP* от времени.

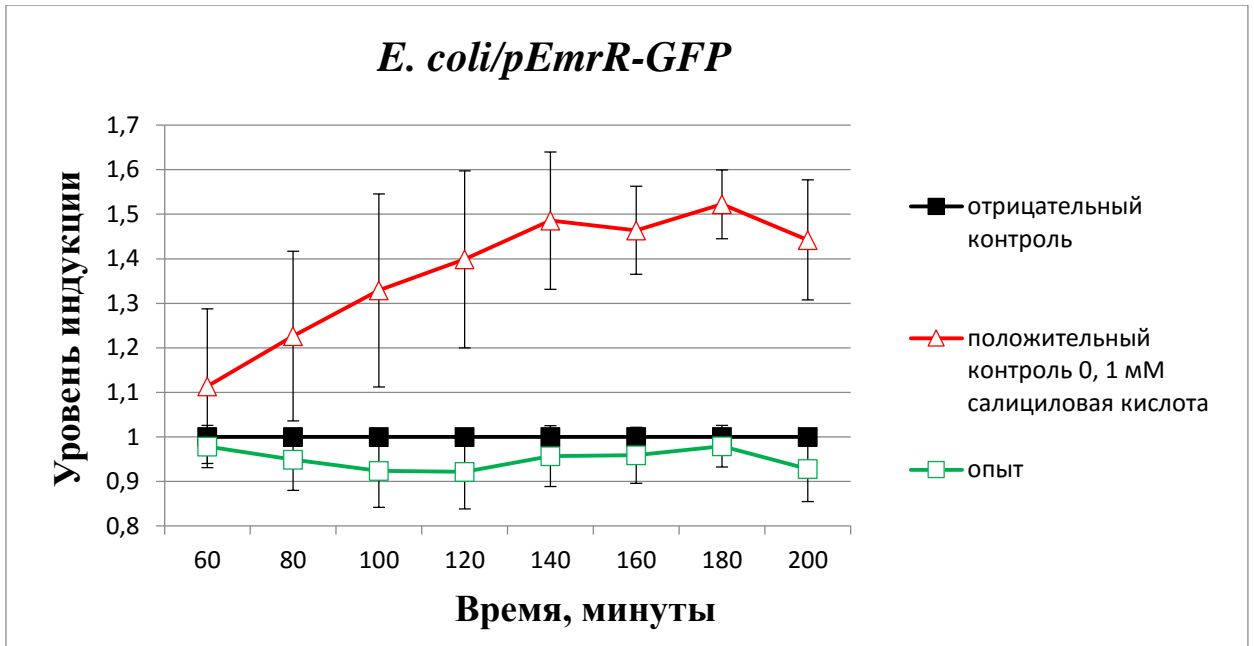


Рисунок 29. Нормированный уровень индукции белка GFP в клетках-сенсорах *E. coli/pEmrR-GFP* после воздействия в течение 15 минут ТГц излучением с длиной волны 130 мкм плотностью мощности 1,4 Вт/см². Отрицательный контроль – необлученные клетки, салициловая кислота – индуктор (положительный контроль). Планки погрешностей демонстрируют стандартное отклонение трех биологических повторов.

Из рисунка 29 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/pEmrR-GFP*, не синтезирует белок GFP по крайней мере в течение 200 минут.

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

Проведен эксперимент по облучению клеток геносенсора *E. coli/pGlnA-GFP* ТГц излучением при длине волны 130 мкм с плотностью мощности 1,4 Вт/см² (рис. 30).

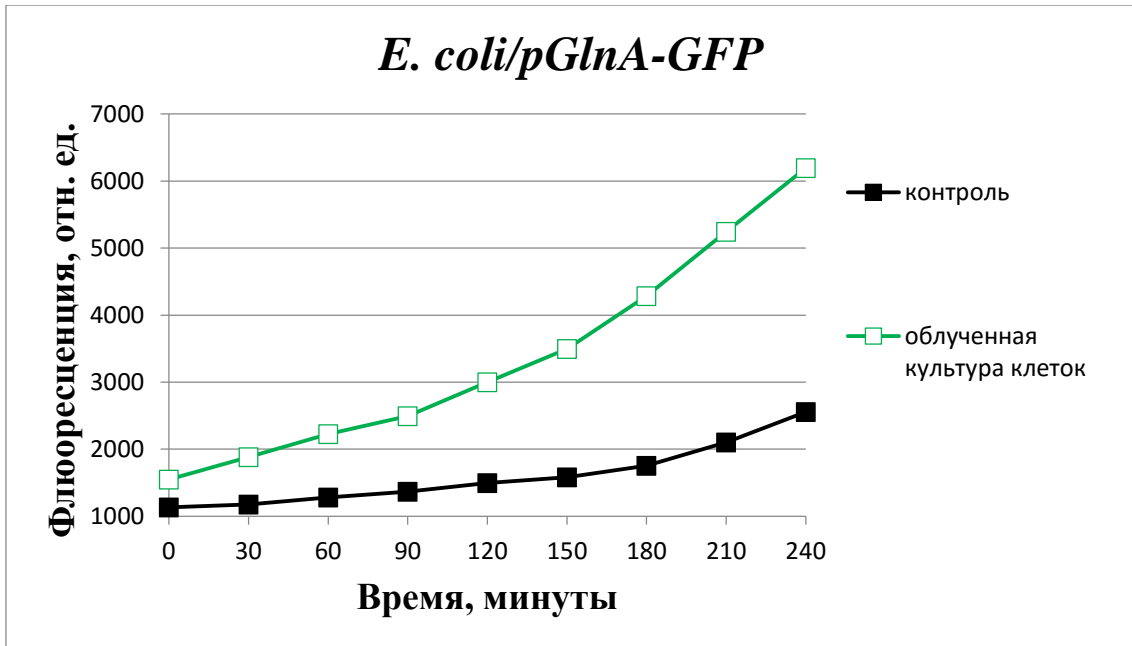


Рисунок 30. Интенсивность флюоресценции белка GFP в клетках-сенсорах *E. coli/pGlnA-GFP* после воздействия в течение 15 минут ТГц излучением с длиной волны 130 мкм плотностью мощности 1,4 Вт/см². Значения опыта и контроля сравнивались с использованием метода линейной регрессии (см. Приложение 2, пункт 23).

Из рисунка 30 видно, 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.

3.5 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.

На рисунке 31 приведен *нормированный уровень индукции*, представляющий собой *отношение* интенсивности флюоресценции в опыте и положительном контроле к интенсивности флюоресценции отрицательного контроля, измеренных через 200 минут после облучения или воздействия естественных индукторов.

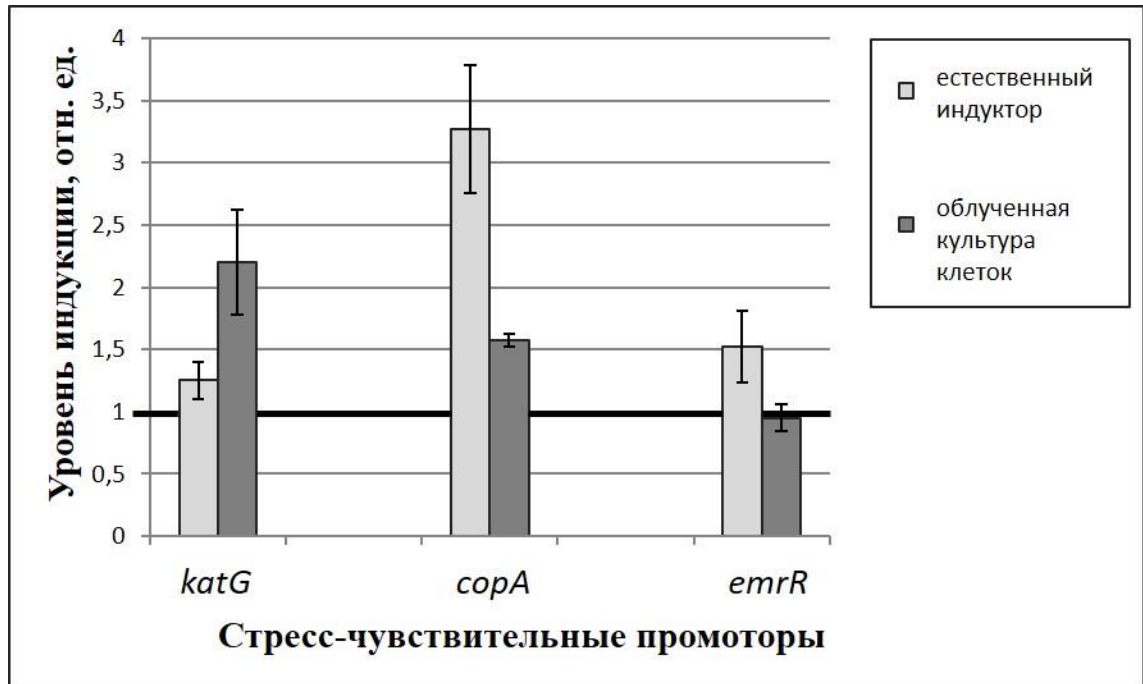


Рисунок 31. Сравнение интенсивности нормированных уровней индукции флюоресценции клеток геносенсоров *E. coli/pKatG-GFP*, *E. coli/pCopA-GFP*, *E. coli/pEmrR-GFP*, через 200 минут после воздействия естественными индукторами: перекись водорода 2,5 мМ, сульфат меди 50 мкМ, салициловая кислота 0,1 мМ соответственно и через 200 минут после облучения в течение 15 минут при длине волны 130 мкм и средней плотности мощности 1,4 Вт/см².

Таблица 9. Статистическая обработка результатов значений флюоресценции опытного и контрольных образцов через 200 минут после облучения и воздействия естественных индукторов*.

Геносенсор	Положительный контроль	Опыт
<i>E. coli/pKatG-GFP</i>	1,25±0,15	2,20±0,42
<i>E. coli/pCopA-GFP</i>	3,27±0,51	1,57±0,05
<i>E. coli/pEmrR-GFP</i>	1,52±0,29	0,95±0,11

*на основании данных 3 независимых экспериментов для каждого геносенсора.

Из рисунка 31 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.

3.6 Облучение минимальных сред и их влияние на культуры геносенсоров

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

Была проведена серия экспериментов, которая заключалась в разделении облученных клеток и облученной среды для уточнения локализации индуцирующего фактора, вызывающего экспрессию белка GFP в клетках геносенсора. Для этого облучалась отдельно минимальная среда М9 и отдельно клеточная культура геносенсора *E.coli/pKatG-GFP*. После проведения облучения к 50 мкл клеточной культуры геносенсора, не подверженным каким-либо воздействиям, добавлялось 50 мкл облученной минимальной среды; 100 мкл облученной культуры, для отделения клеток центрифугировали и разбавляли 100 мкл необлученной минимальной среды М9, одновременно с этим такие же действия проводились со 100 мкл культуры, не подвергавшейся воздействиям (отрицательный контроль для облученных клеток) (рис. 32).

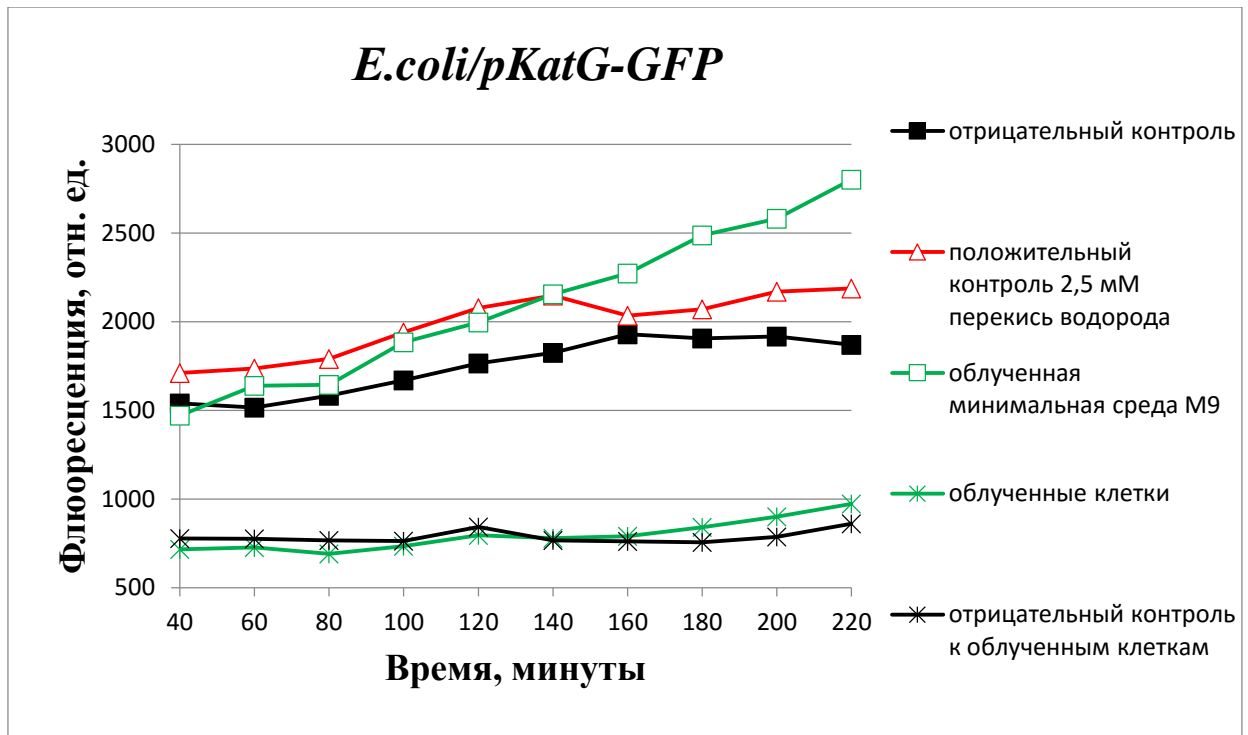


Рисунок 32. Индукция флюоресцентного белка GFP в геносенсоре *E.coli/pKatG-GFP* после добавления облученной минимальной среды М9 к необлученной клеточной культуре и индукция белка GFP в облученных клетках после осаждения и добавления к ним необлученной минимальной среды М9. Для облученных клеток использовался свой отрицательный контроль. Значения опыта и отрицательного контроля сравнивались с использованием метода линейной регрессии (см. Приложение 2, пункты 10 и 11).

На рисунке 32 показана динамика флюоресцентного ответа в случае добавления к культуре геносенсора *E.coli/pKatG-GFP* облученной минимальной среды и в случае добавления необлученной среды к облученным клеткам, осажденным центрифугированием. Индукция экспрессии белка GFP наблюдалась в случае добавления к клеткам геносенсора облученной минимальной среды М9. В случае добавления необлученной минимальной среды к облученным осажденным клеткам индукция флюоресцентного белка GFP отсутствовала. В виду неизбежных потерь материала при центрифугировании флюоресцентный фон опытного образца облученных клеток был достаточно низкий, поэтому для него был использован свой отрицательный контроль, также подвергавшийся центрифугированию (рис. 32).

Также был проведен эксперимент, который заключался в разделении облученных клеток геносенсора *E. coli/pGlnA-GFP* и облученной среды. В

этом эксперименте также было проведено (воспроизведено) облучение и исследование динамики флюоресцентного ответа самой клеточной культуры геносенсора *E. coli/pGlnA-GFP* (аналогично рис. 30). Тестировались образцы с облученной минимальной средой М9, облученной клеточной культурой геносенсора *E. coli/pGlnA-GFP*, и отделенными при помощи центрифугирования облученными клетками, как описано выше (рис. 33).

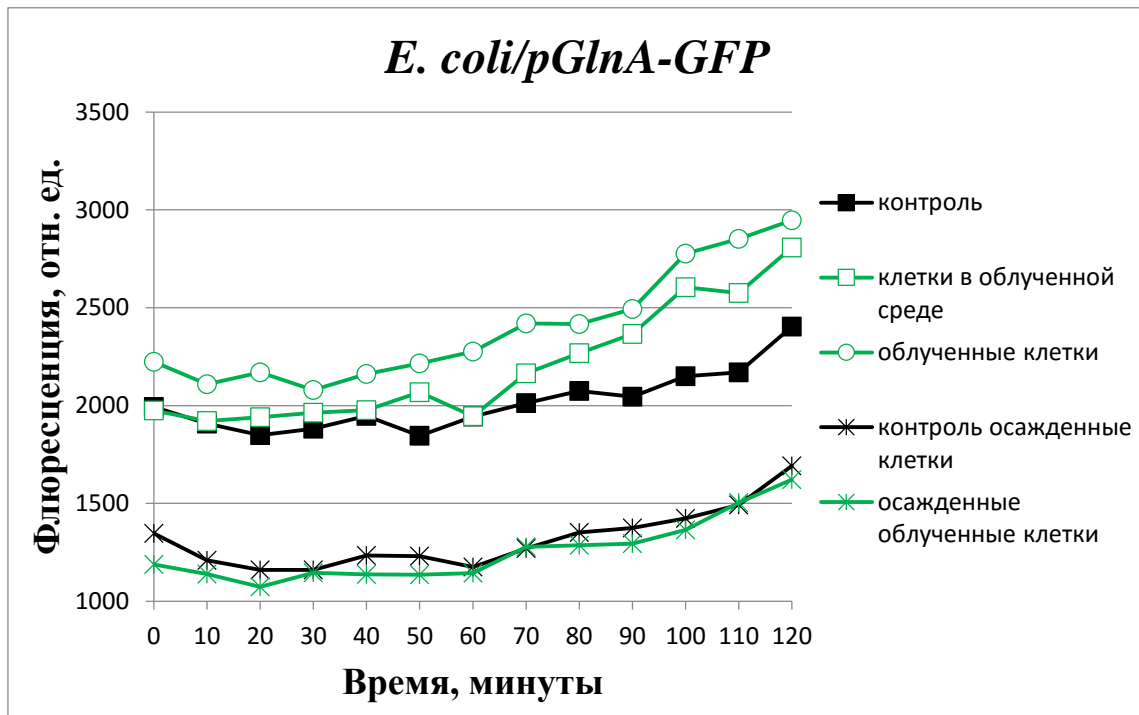


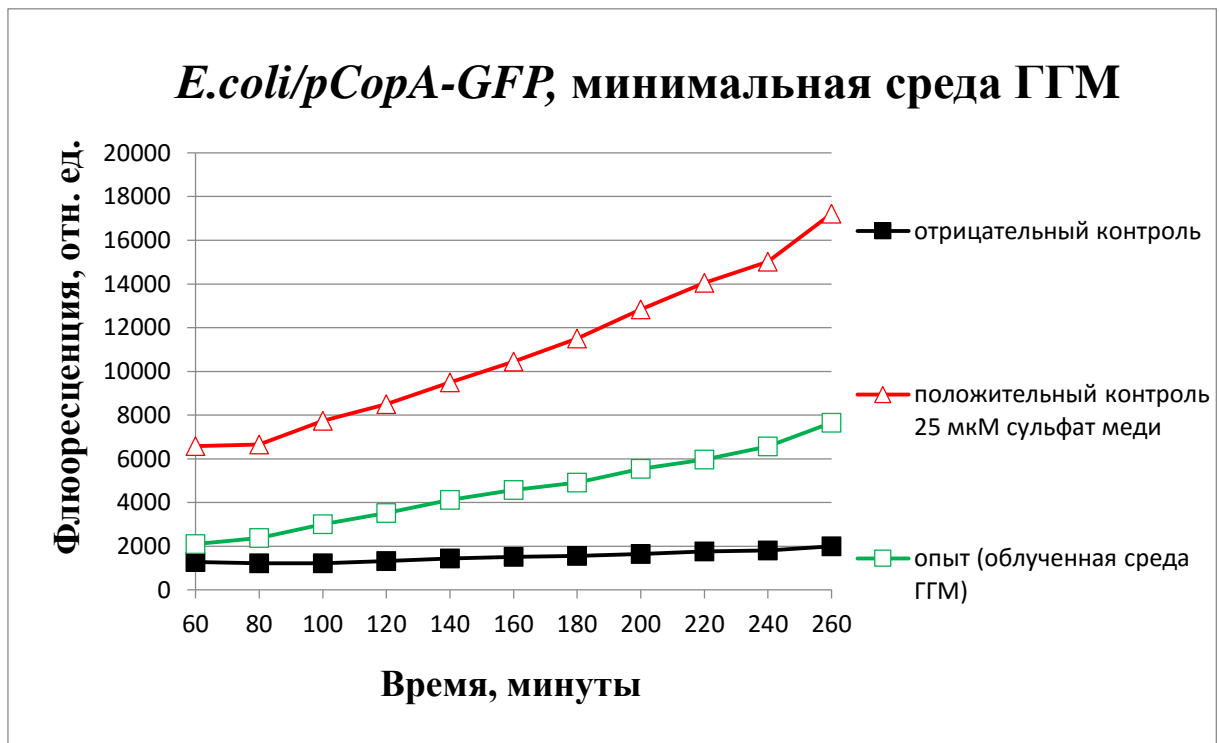
Рисунок 33. Индукция флюоресцентного белка в геносенсоре *E. coli/pGlnA-GFP* после облучения клеточной культуры геносенсора, добавления облученной минимальной среды М9 и индукция флюоресцентного белка в облученных клетках после их осаждения и добавления необлученной минимальной среды М9. Для облученных клеток использовался свой контроль. Значения опыта и контроля сравнивались с использованием метода линейной регрессии (см. Приложение 2, пункты 24 и 25). Контролем служила культура клеток геносенсора, не подвергавшаяся каким-либо воздействиям.

На рисунке 33 показана динамика флюоресцентного ответа после облучения клеток геносенсора в минимальной среде, после добавления к культуре геносенсора облученной минимальной среды и после разбавления необлученной средой облученных клеток, осажденных центрифугированием. Индукция экспрессии флюоресцентного белка GFP наблюдалась в случае добавления к клеткам геносенсора *E. coli/pGlnA-GFP* облученной минимальной среды и была чуть менее интенсивной, чем при облучении клеток геносенсора в минимальной среде М9. В случае осажденных

облученных клеток индукция флюоресценции отсутствовала при культивировании их в необлученной минимальной среде. В виду неизбежных потерь материала при центрифугировании флюоресцентный фон опытного образца облученных клеток был достаточно низкий, как и флюоресцентный фон отрицательного контроля для облученных клеток.

Была проведена серия экспериментов по изучению нетермического воздействия ТГц излучения на минимальную среду ГГМ. Для этого были проведены эксперименты с облучением минимальной среды ГГМ с последующим ее добавлением к геносенсорам *E.coli/pCopA-GFP* и *E.coli/pKatG-GFP* (рис. 34).

А



Б

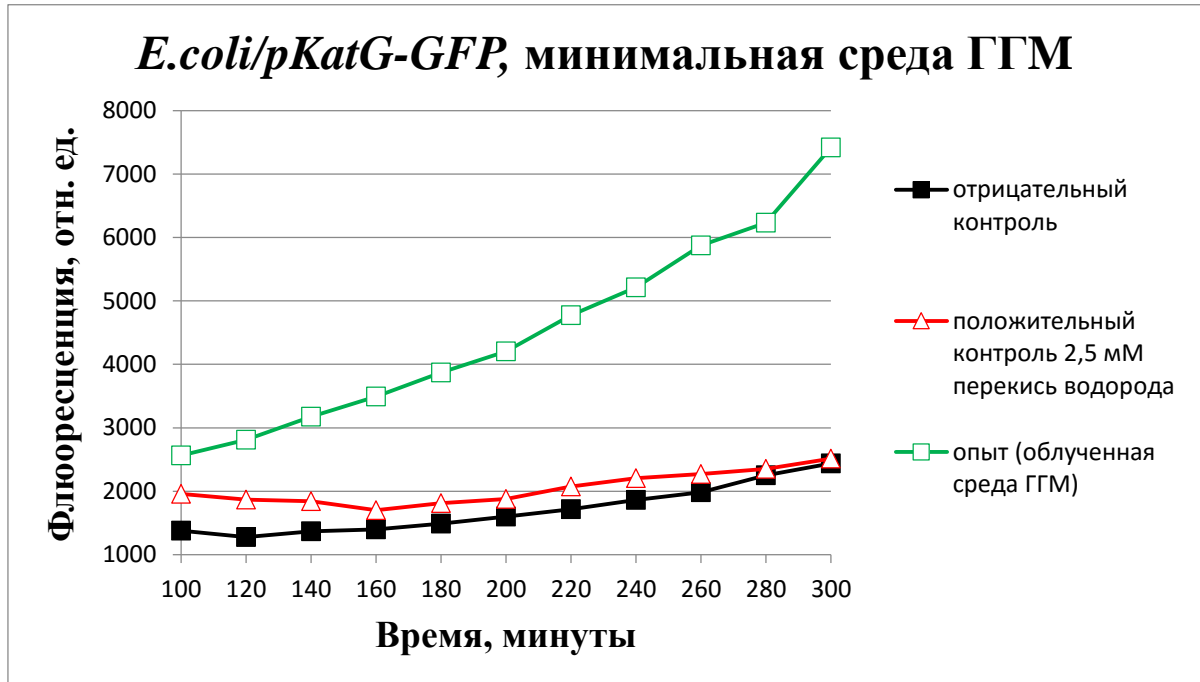


Рисунок 34. Индукция флюоресцентного белка после добавления облученной минимальной среды ГГМ к необлученным клеткам геносенсора. А – эксперимент с геносенсором *E. coli/pCopA-GFP*, Б – эксперимент с геносенсором *E. coli/pKatG-GFP*. Значения опыта и отрицательного контроля сравнивались с использованием метода линейной регрессии (см. Приложение 2, пункты 12 и 13).

Показана индукция экспрессии белка GFP у геносенсора *E. coli/pCopA-GFP*, характеризующаяся постоянным увеличением флюоресценции, после добавления к нему облученной минимальной среды ГГМ (рис. 34, А).

Показана индукция экспрессии белка GFP у геносенсора *E. coli/pKatG-GFP*, характеризующаяся постоянным значительным увеличением флюоресценции, после добавления к нему облученной минимальной среды ГГМ (рис. 34, Б).

Для геносенсора *E. coli/pCopA-GFP* также было проведено тестирование на способность к индукции белка GFP после добавления облученной минимальной среды М9 (рис. 35).

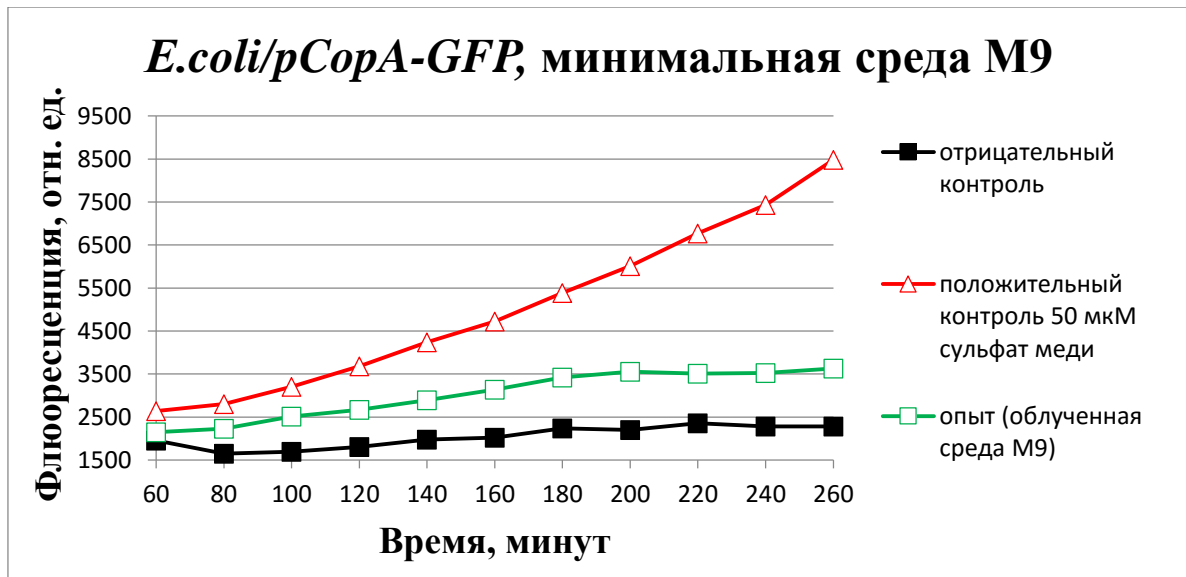


Рисунок 35. Индукция флюоресцентного белка GFP после добавления облученной минимальной среды М9 к необлученной культуре геносенсора *E.coli/pCopA-GFP*. Значения опыта и отрицательного контроля сравнивались с использованием метода линейной регрессии (см. Приложение 2, пункт 14).

Показана индукция флюоресцентного белка GFP у геносенсора *E.coli/pCopA-GFP* после добавления облученной минимальной среды М9. Следует отметить, что для всех экспериментов характер кинетических кривых флюоресценции при добавлении облученных сред в целом совпадает с характером кинетических кривых флюоресценции при облучении клеточной культуры геносенсоров непосредственно.

При облучении клеточной культуры геносенсора *E. coli/pEmrR-GFP* индукция синтеза флюоресцентного белка GFP в опытном образце отсутствовала. Геносенсор *E. coli/pEmrR-GFP* был протестирован и на способность к индукции белка GFP после добавления облученной минимальной среды М9 (рис. 36).

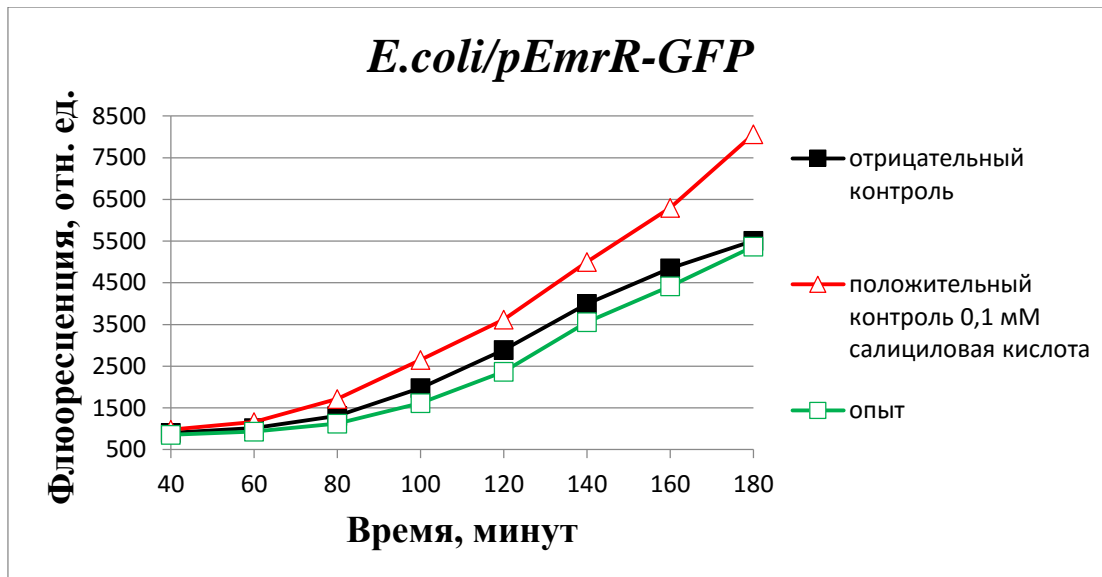


Рисунок 36. Индукция флюоресцентного белка GFP после добавления облученной минимальной среды М9 к необлученной культуре геносенсора *E. coli/pEmrR-GFP*. Значения опыта и отрицательного контроля сравнивались с использованием метода линейной регрессии (см. Приложение 2, пункт 15).

Показано отсутствие индукции флюоресцентного ответа у геносенсора *E. coli/pEmrR-GFP* по сравнению с отрицательным контролем при добавлении к клеточной культуре облученной минимальной среды М9.

3.6.2 Индукционный эффект от облученной минимальной среды, подвергавшейся разведениям

Для выявления порога воздействия, которое может оказывать облученная минимальная среда М9 на клетки геносенсора *E. coli/pKatG-GFP* был проведен эксперимент по разбавлению облученной минимальной среды необлученной и дальнейшему тестированию полученного ряда разведений при помощи геносенсора.

Для проведения эксперимента с разведениями к 50 мкл жидкой культуры геносенсора *E. coli/pKatG-GFP* добавлялось 1, 10, 20, 30, 40 мкл облученной среды, и 49, 40, 30, 20, 10 мкл необлученной среды соответственно (рис. 37).

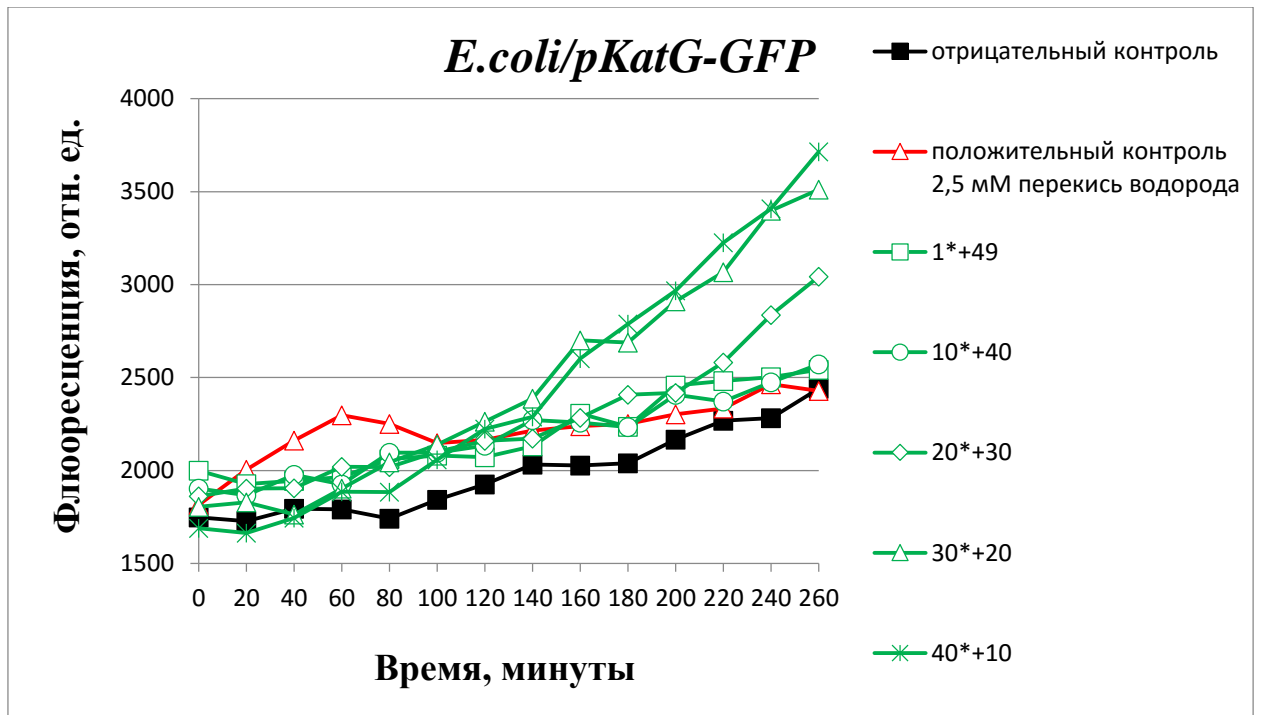


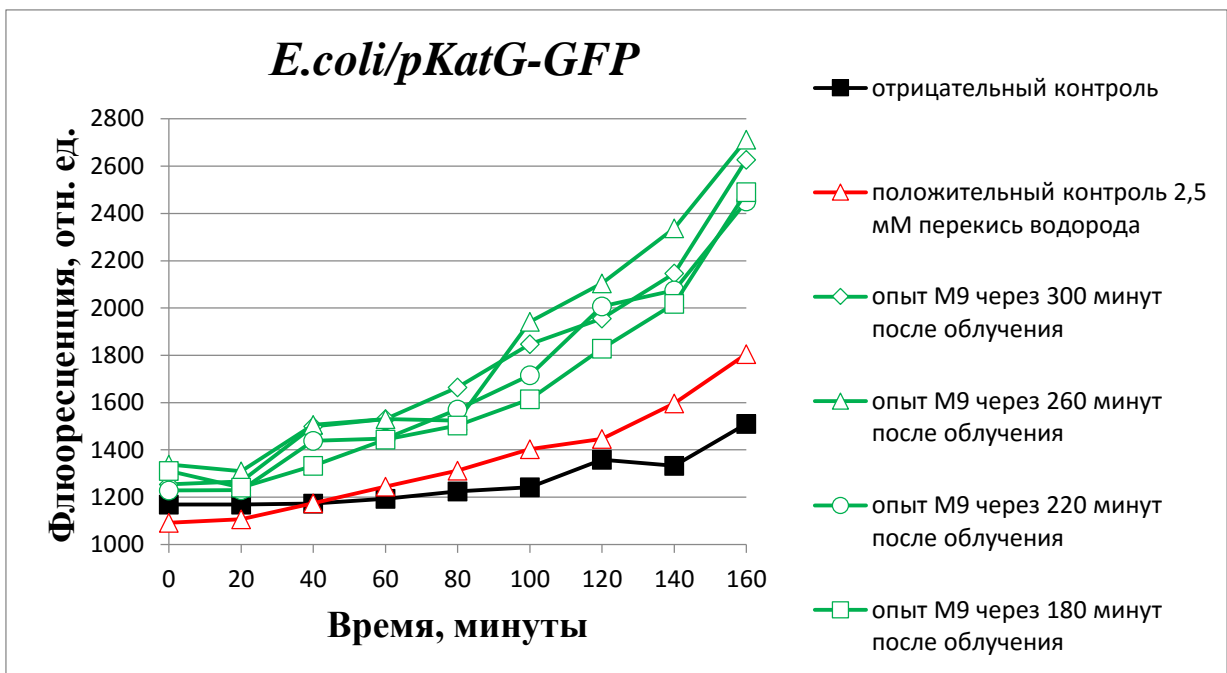
Рисунок 37. Эксперимент по тестированию индукции белка GFP в клетках геносенсора *E.coli/pKatG-GFP* облученной минимальной средой, подвергнутой ряду разведений необлученной средой. А – Индукция флюоресцентного белка GFP в клетках геносенсора, где (*) количество облученной минимальной среды в микролитрах, добавленной к необлученной минимальной среде таким образом, что общий объем составляет 50 мкл (аликвоту для эксперимента). Значения опыта и отрицательного контроля сравнивались с использованием метода линейной регрессии (см. Приложение 2, пункт 16).

Показана обратно пропорциональная связь степени разведения облученной минимальной среды с интенсивностью флюоресценции опытных образцов. Заметная разница в индукции флюоресцентного сигнала наблюдалась при добавлении 20 мкл облученной среды. Добавление 1 и 10 мкл облученной среды не приводило к индукции флюоресцентного белка в клетках геносенсора *E.coli/pKatG-GFP*. Также следует отметить достаточно позднее развитие флюоресцентного ответа – заметное накопление флюоресцентного GFP-белка можно наблюдать через 140 минут после начала эксперимента, при этом только на 200 минуте происходит расхождение интенсивности флюоресценции опытных образцов, соответствующее обратно пропорциональной зависимости степени разведения.

3.6.3 Время сохранения индукционной силы среды

Был проведен эксперимент по добавлению облученной минимальной среды к клеткам геносенсора *E.coli/pKatG-GFP* через различные временные промежутки с целью выяснения времени сохранения индукционной силы облученной минимальной среды М9 (рис. 38). Наибольший временной промежуток составил 20 часов, при этом минимальная среда находилась при температуре 4⁰С.

А



Б

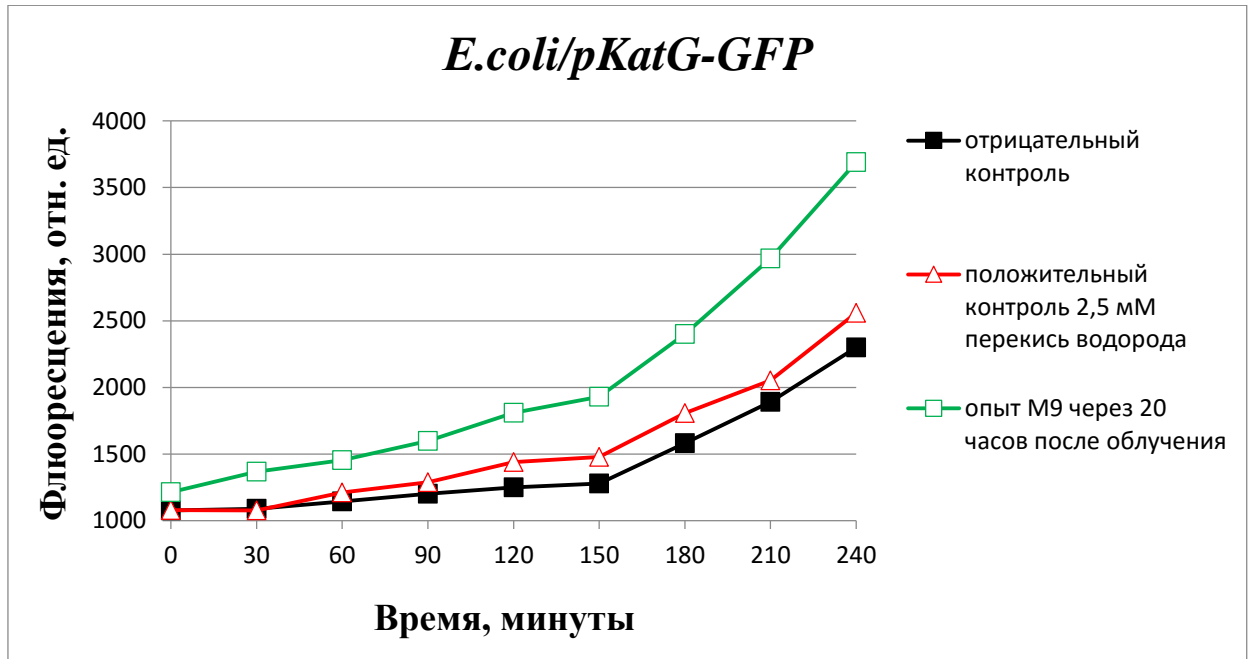


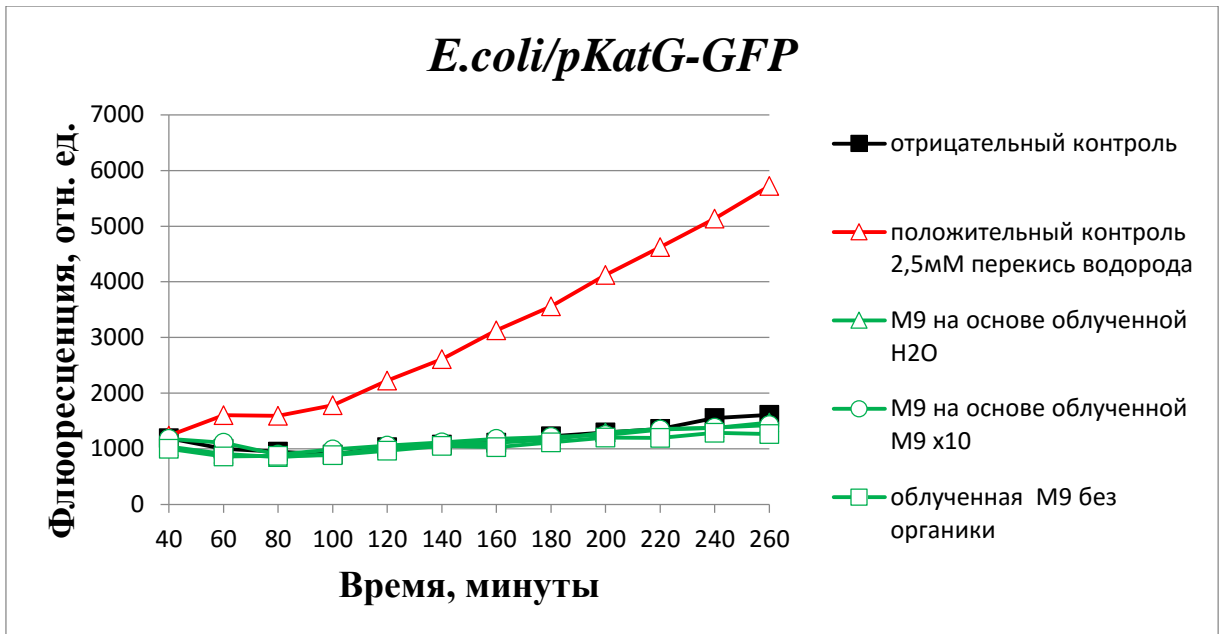
Рисунок 38. Определение времени сохранения индукционной силы облученной минимальной среды М9 при помощи геносенсора *E.coli/pKatG-GFP*. А – Индукция флюоресцентного белка GFP в клетках геносенсора *E.coli/pKatG-GFP* минимальной средой, добавленной после 180, 220, 260 и 300 минут после облучения. Б – Индукция флюоресцентного белка GFP в клетках геносенсора *E.coli/pKatG-GFP* минимальной средой, добавленной через 20 часов после облучения. Значения опыта и отрицательного контроля сравнивались с использованием метода линейной регрессии (см. Приложение 1, 17 и 18).

Во всех случаях показано, что облученная минимальная среда сохраняет способность к индукции экспрессии флюоресцентного белка в клетках геносенсора *E.coli/pKatG-GFP*.

3.6.4 Разделение минимальной среды на компоненты

Поскольку минимальная среда имеет многокомпонентный состав, была проведена серия экспериментов с облучением отдельных компонентов минимальной среды М9 для локализации первопричины влияния облученной минимальной среды на геносенсоры (рис. 39).

А



Б

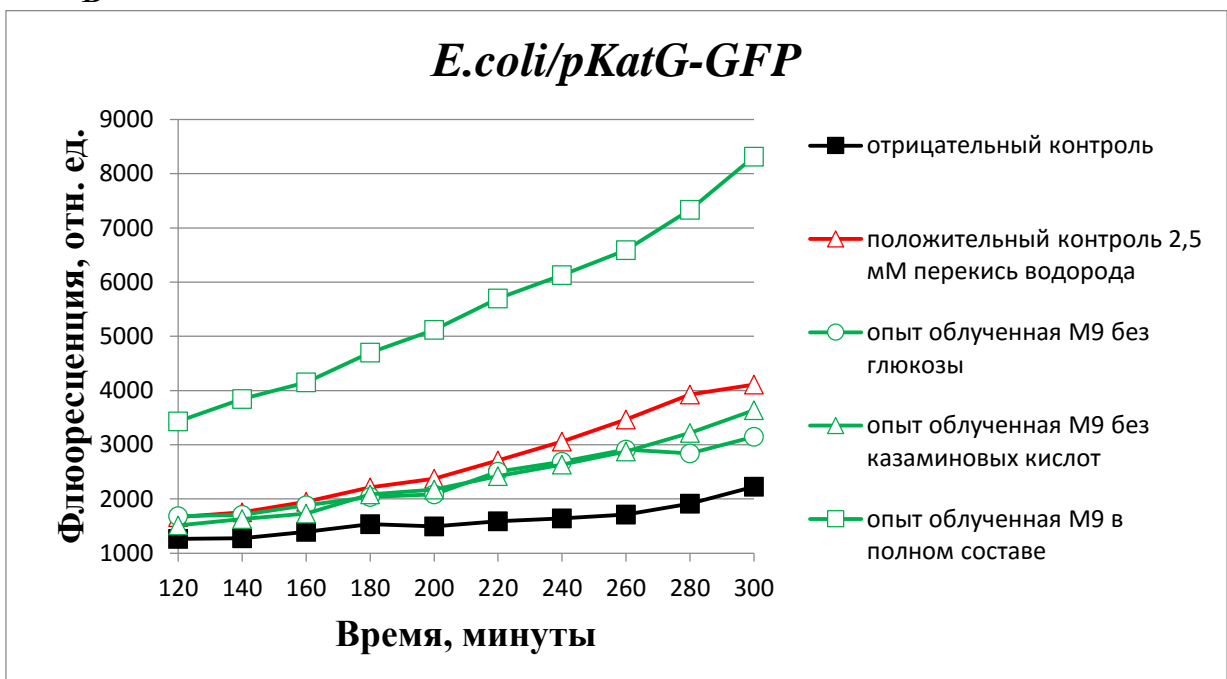


Рисунок 39. Интенсивность флюоресцентного ответа геносенсора *E.coli/pKatG-GFP* после добавления минимальной среды M9, приготовленной на основе облученных компонентов. А – индукция белка GFP в клетках геносенсора после добавления минимальной среды, приготовленной на основе облученной воды, десятикратной минимальной среды и минимальной среды без глюкозы и казиминовых кислот. Б – индукция белка GFP в клетках геносенсора *E.coli/pKatG-GFP* после добавления минимальной среды, приготовленной на основе облученной минимальной среды без глюкозы и облученной минимальной среды без казиминовых кислот. Значения опыта и отрицательного контроля сравнивались с использованием метода линейной регрессии (см. Приложение 2, пункты 19 и 20).

Во всех случаях после облучения минимальная среда доводилась до полного состава и только в таком виде добавлялась к клеткам геносенсора.

Показано, что облучение воды, десятикратной минимальной среды, а также минимальной среды, не содержащей при облучении глюкозы и казаминовых кислот, не приводят к индукции флюоресцентного ответа в клетках геносенсора *E.coli/pKatG-GFP* (рис 39, А).

Облучение минимальной среды, содержащей только глюкозу или только казаминовые кислоты приводит к индукции экспрессии флюоресцентного белка GFP в клетках геносенсора *E.coli/pKatG-GFP* (рис. 39, Б).

Следует отметить, что показатели индукции белка GFP в результате добавления среды, облученной без глюкозы или казаминовых кислот меньше значений положительного контроля геносенсора *E.coli/pKatG-GFP*, и значительно меньше значений показателей индукции белка GFP в результате добавления среды, облученной в полном составе (рис. 39, Б).

Для уточнения роли органической составляющей в индукции флюоресцентного ответа, были проведены эксперименты по облучению глюкозы с водой, глюкозы с фосфатным буфером и глюкозы с хлоридом натрия. На основе полученных облученных образцов была приготовлена минимальная среда M9 и протестирована при помощи геносенсора *E.coli/pKatG-GFP* (рис. 40).

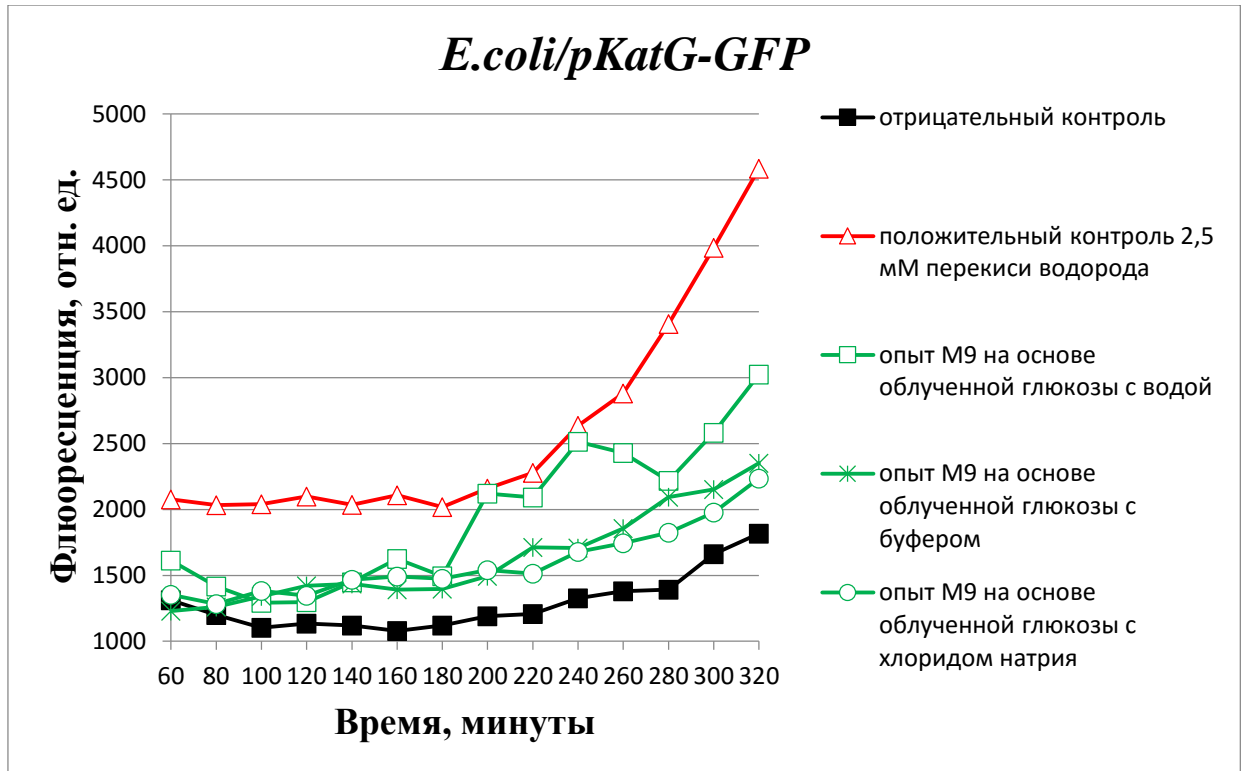


Рисунок 40. Индукция белка GFP в клетках геносенсора *E.coli/pKatG-GFP* после добавления минимальной среды, приготовленной на основе облученных глюкозы с водой, глюкозы с фосфатным буфером и глюкозы с хлоридом натрия. Значения опыта и отрицательного контроля сравнивались с использованием метода линейной регрессии (см. Приложение 2, пункт 21).

Во всех случаях в опытных образцах наблюдалась незначительное увеличение флюоресценции, наиболее высокое у образца, в котором использовалась облученная глюкоза с водой. Во всех опытных образцах показатели индукции белка GFP у геносенсора *E.coli/pKatG-GFP* не превышали показателей значений белка GFP, индуцированного добавлением перекиси водорода (положительный контроль).

Повторный эксперимент с уточнением роли органической составляющей в индукции флюоресцентного ответа, был проведен с облучением стокового 40 % раствора глюкозы и глюкозы с водой (рис. 41).

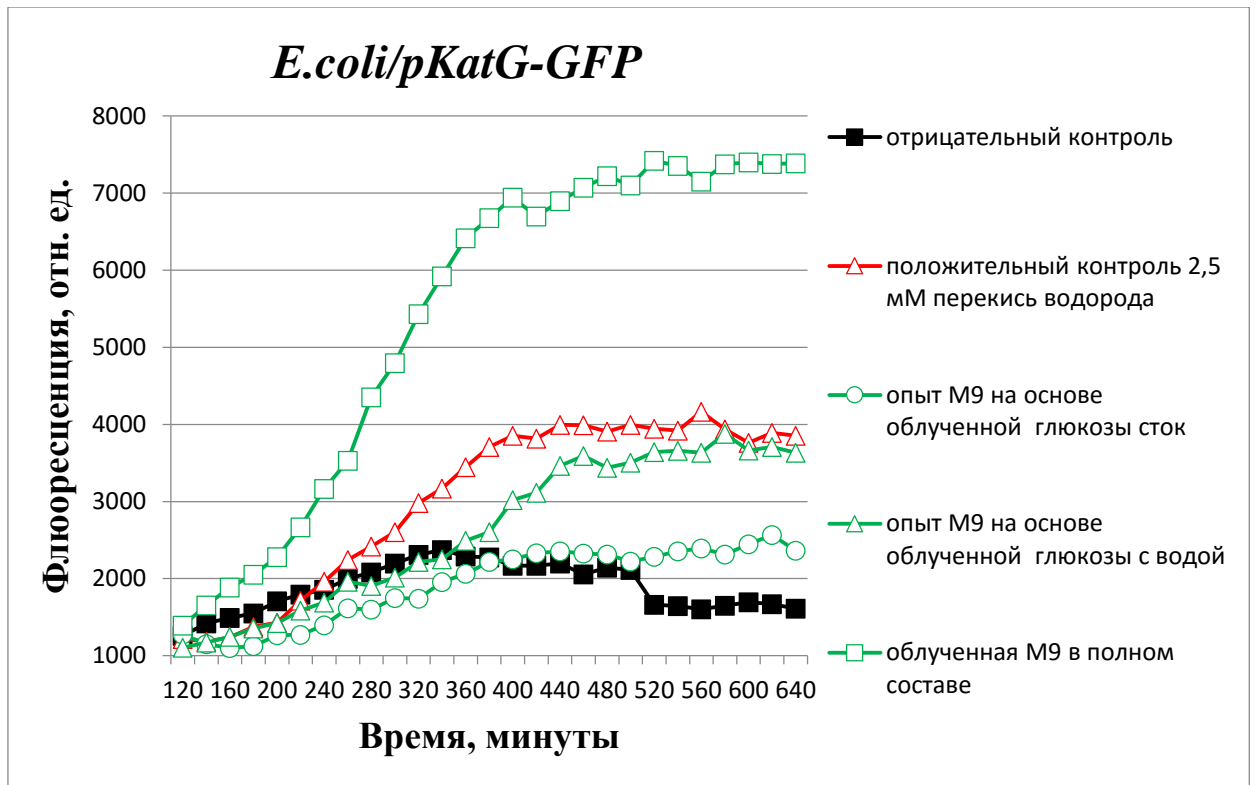


Рисунок 41. Индукция белка GFP в клетках геносенсора *E. coli/pKatG-GFP* после добавления минимальной среды, приготовленной на основе облученных стокового 40% раствора глюкозы и глюкозы с водой.

Из рисунка 41 видно, что опытные образцы на основе облученного 40 % раствора глюкозы и глюкозы с водой имеют более низкие значения флюоресценции, чем при индукции геносенсора перекисью водорода. Следует отметить, что опытный образец, в котором к клеткам геносенсора *E. coli/pKatG-GFP* была добавлена М9, облученная в полном составе, демонстрировал характерный интенсивный флюоресцентный ответ.

3.6.5 Эффект от минимальной среды, облученной с разной мощностью

Был проведен эксперимент, в котором минимальная среда М9 подвергалась воздействию ТГц излучения с разной средней мощностью с дальнейшим тестированием облученных образцов при помощи геносенсора *E. coli/pKatG-GFP*. Температура, при которой облучалась минимальная среда составляла соответственно 27⁰С, 30⁰С, 35⁰С и 45⁰С, эти значения достигались при помощи регулировки щели обтюратора в процессе облучения. Как видно

из рисунка 42, облучение минимальной среды M9 при разных температурах приводило к индукции белка GFP у геносенсора *E.coli/pKatG-GFP*.

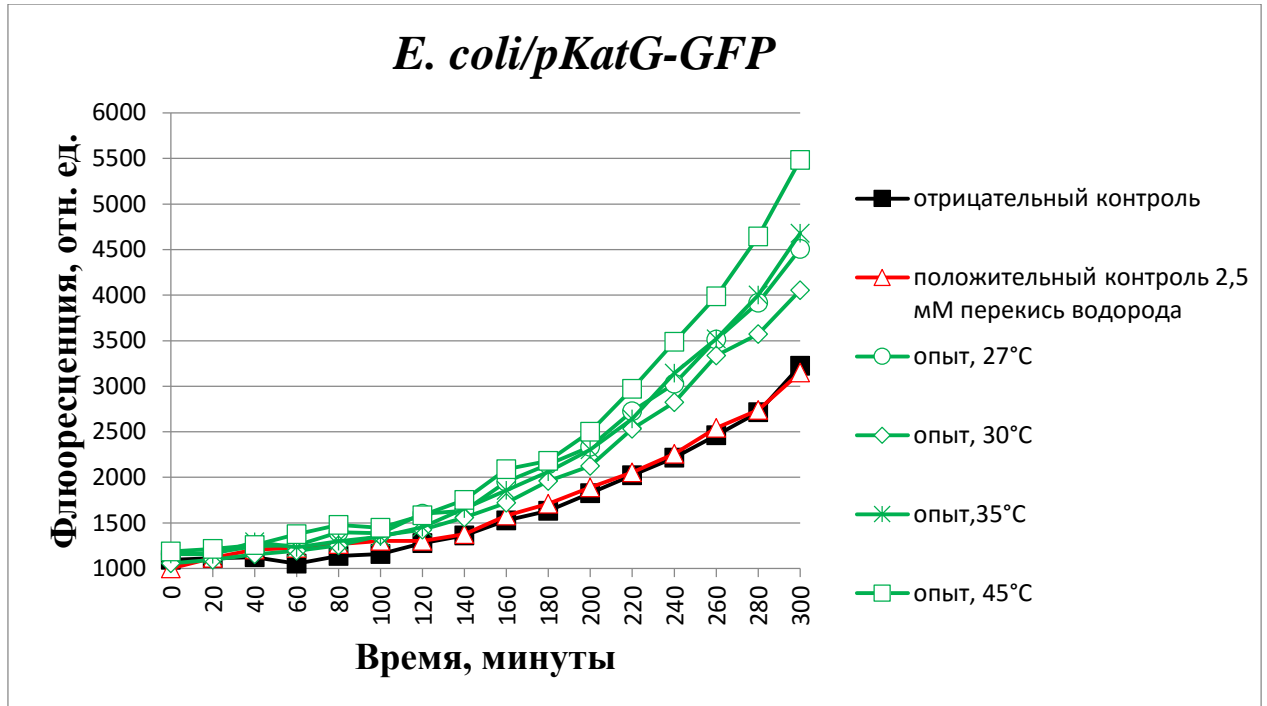


Рисунок 42. Тестирование образцов минимальной среды M9, облученных с разной средней мощностью, при помощи геносенсора *E.coli/pKatG-GFP*. Значения опыта и отрицательного контроля сравнивались с использованием метода линейной регрессии (см. Приложение 2, пункт 22).

Следует отметить, что значительного влияния изменение средней мощности при облучении опытных образцов на характер индукции GFP у геносенсора *E.coli/pKatG-GFP* не оказывало, но можно проследить слабую тенденцию к прямой зависимости интенсивности флуоресценции от средней мощности (температуры облучения): образец, подвергавшийся воздействию ТГц излучения при 45°C вызывал наиболее интенсивный флуоресцентный ответ у геносенсора *E.coli/pKatG-GFP* по сравнению с отрицательным контролем.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

С появлением искусственных мощных источников, способных генерировать и детектировать ТГц или субмиллиметровое излучение, большое внимание в мировом научном сообществе уделяется проблеме воздействия данного вида излучения на биообъекты, при этом влияние именно нетермического воздействия, которое по сути носит информационный характер, интересно больше всего как с научной, так и с практической точки зрения. В настоящее время многочисленные эксперименты и различные теоретические оценки представляют достаточно обширный массив данных. Тем не менее, известные данные не позволяют сделать однозначные выводы о том, как излучение воздействует на функционирование живых систем.

В настоящей работе основной подход заключался в использовании геносенсорных конструкций, позволяющих тестировать нетермическое воздействие ТГц излучения на уровне регуляции транскрипции. Поскольку в современных условиях (со времени образования атмосферы, содержащей водяные пары) живые организмы не взаимодействуют с ТГц излучением из-за поглощения его атмосферой и не имеют специфических эволюционно закрепленных механизмов реагирования, в основе геносенсорных конструкций лежали известные регуляторные элементы хорошо изученных стрессовых систем *E. coli*, связанные с основными видами внешних воздействий на жизнедеятельность бактерий. Геносенсорные конструкции были сконструированы на основе промотора гена *katG* (окислительный стресс), *copA* (поддержание гомеостаза ионов меди), *emrR* (присутствие антисептиков).

Одним из наиболее важных условий экспериментов по выявлению именно нетермического эффекта воздействия ТГц излучения на бактериальные клетки является тщательное соблюдение температурного

режима. При прохождении через водные среды ТГц излучение ими активно поглощается и диссипирует в тепло, что в свою очередь приводит к повышению температуры. Именно этот процесс тщательно контролировали при помощи тепловизора и регулировали изменением средней мощности излучения как описано выше. Для исключения индукции изучаемых элементов стрессовых систем бактериальных клеток вследствие теплового шока, в ходе экспериментов для геносенсоров *E. coli/pKatG-GFP* и *E. coli/pCopA-GFP* проводилось дополнительное тестирование на активацию синтеза репортерного белка GFP после температурного воздействия 42°C в течение 15 минут. В этих экспериментах было показано отсутствие активации синтеза белка GFP. Кроме того, параллельно с описанными экспериментами, в нашей Лаборатории осуществлялось изучение протеомного ответа вследствие нетермического воздействия ТГц излучения. При изучении протеомных профилей не были обнаружены белки, экспрессирующиеся вследствие теплового шока, что подтверждает исключительно *нетермический* характер воздействия в проведенных экспериментах.

Известно, что ТГц излучение – неионизирующее, энергия ТГц кванта мала и лежит в области энергий водородных и Ван-дер-ваальсовых связей. Таким образом, ТГц излучение значительно поглощается жидкостями и газами, состоящими из полярных молекул, в том числе и водой.

Поскольку опытные образцы представляли собой клеточную культуру в водной системе, в задачи аранжировки эксперимента входил не только тщательный температурный контроль, но и эффективная, равномерная доставка квантов при экспонировании к бактериальным клеткам. Из предварительных экспериментов и литературных данных было известно, что ТГц излучение поглощается примерно в 2,7 раз водным слоем толщиной 40 мкм. Также известно, что ТГц излучение может проникать с минимальными потерями через предметы, состоящие из неполярных молекул, поэтому для достижения эффективного и равномерного экспонирования клеток

использовали специальную полипропиленовую кювету на вращающемся столике, проницаемую для ТГц излучения, с толщиной слоя жидкости в кювете 40 мкм.

В 80-х годах двадцатого века Фройлихом была предложена гипотеза о нетепловых эффектах ТГц излучения, опосредованных возбуждением специфических биологических макромолекул линейными или нелинейными резонансными механизмами [Frohlich H., 1982]. В мировом научном сообществе особое внимание уделялось изучению вопроса нетермического влияния микроволнового и ТГц излучения на клеточные мембраны. В исследованиях и разработках отечественного ученого Девяткова Н. Д. много внимания уделялось специфическому нетепловому резонансному воздействию излучения миллиметрового диапазона. Показано, что волны в КВЧ диапазоне могут возбуждаться в виде акустоэлектрических волн в бислойных мембранах клетки и таким образом оказывать влияние на все клеточные функции [Девятков Н. Д. и др., 1991].

В проекте Thz-BRIDGE показано влияние ТГц излучения на билипидный слой, что, скорее всего, связано со специфическими характеристиками несущей частоты. Эффект увеличения проницаемости наблюдался при 130 ГГц облучении с частотой повторения импульсов 7 Гц и передаваемой мощностью около $7,8 \text{ мВт/см}^2$, в случае изменения несущей частоты от 130 ГГц до 3 ГГц и при несущей частоте 150 ГГц такого эффекта не наблюдалось, что свидетельствует в пользу гипотезы о резонансных эффектах нетермического воздействия излучения [Doria A. et al., 2004].

С другой стороны, именно жидкая среда является первичным фотоакцептором излучения и, таким образом, другой гипотезой является неспецифическое воздействие излучения на воду и водные растворы.

Вода сама по себе хоть и является привычным веществом, но тем не менее обладает набором аномальных свойств (повышенные температуры плавления и кипения, большая диэлектрическая проницаемость, способность к образованию ассоциатов, и др.), проявляющихся именно благодаря

наличию водородных связей. При этом уже известные свойства воды изучаются и в настоящее время, более того, обнаруживаются новые [Reiter G. F. et al., 2012]. В биологических системах водородные связи ответственны за организацию структур высших порядков белков и нуклеиновых кислот. ТГц излучение не может приводить к изменению в первичной структуре биополимеров, однако может воздействовать на водородные связи, стабилизирующие двухцепочечную структуру ДНК, приводя к предмутационному событию или влиянию на функционирование генетического аппарата. Нетермическое воздействие ТГц излучения, возможно, также способно оказывать определенные эффекты на структурные свойства воды или водных растворов органических веществ, которые могут выражаться в изменении подвижности, и, гипотетически, внутриклеточной концентрации протонов («имитация» окислительного стресса).

Исходя из выдвинутых предположений первоначально для проведения экспериментов был использован геносенсор на основе промотора гена *katG*, чувствительный к окислительному стрессу, т. е. изменению концентрации протонов в среде [Khlebodarova T. M. et. al., 2007].

В результате серии проведенных экспериментов было показано, что воздействие ТГц излучением приводит к кратному увеличению экспрессии гена-репортера под контролем промотора гена *katG*, чувствительного к окислительному стрессу, по сравнению с образцами, не подвергавшимися нетермическому воздействию ТГц излучения.

Известно, что промотор гена *katG* содержит сайты связывания ТФ OxyR и FNR (для FNR сайт гипотетический) [<http://ecocyc.org/ECOLI/NEW-IMAGE?type=GENE&object=EG10511>], оба ТФ осуществляют положительную регуляцию гена *katG*. ТФ FNR (fumarate and nitrate reduction) – глобальный регулятор, контролирующий экспрессию более 120 генов у *E. coli*. Следует отметить, что активность этого ТФ регулируется через редокс-чувствительный Fe-S кластер, непосредственно присутствием кислорода, при котором FNR инактивируется, активная форма характерна для

анаэробных условий. Выявление индукции геносенсора на основе промотора гена *katG* вследствие нетермического воздействия ТГц излучения ставило задачу изучения зависимости как от дозы, так и от длины волны, поэтому значительная часть нашей работы была посвящена изучению динамики ответа геносенсора *E. coli/pKatG-GFP* на нетермическое воздействие ТГц излучения и попытка определения качественной зависимости индукции флюоресценции экспонированных образцов от дозы и длины волны.

Показано, что после нетермического воздействия ТГц излучения с длиной волны 130, 150 и 200 мкм на геносенсор кинетика индукционного ответа опытных образцов не имела значимых отличий.

Показано, что индукция синтеза флюоресцентного белка GFP наблюдалась всегда после нетермического воздействия ТГц излучения на клетки геносенсора в течение 15 минут, что эквивалентно дозе 150 кДж/см³, проявлялась нестабильно при воздействии в течение 10 минут, т. е. при дозе 100 кДж/см³, и никогда не проявлялась при воздействии в течение 5 минут, что эквивалентно дозе 50 кДж/см³. Таким образом, можно утверждать, что дозовый эффект имеет пороговый характер.

Также в эксперименте наблюдалась различная динамика ответа геносенсора (рис. 26) на перекись водорода и ТГц излучение. Кинетика ответа, полученная после однократного нетермического воздействия ТГц излучения, имеет принципиально другой характер по сравнению с кинетикой ответной реакции на перекись водорода. Для облученного образца свойственна задержка развития ответной реакции клеток геносенсора по сравнению с положительным контролем, при этом в опыте значения флюоресценции этих же клеток **намного выше**. Возможной причиной этого явления могло бы быть значительное увеличение количества клеток в облученном образце по сравнению с отрицательным контролем, что может привести, соответственно, и к увеличению количества флюоресцентного белка GFP в эксперименте. Однако эксперименты по высеванию клеток из образцов отрицательного контроля и опыта на плотную агаризованную среду

сразу после облучения и в конце проведения замеров флюоресценции (таб. 8) показали отсутствие достоверных отличий в количестве клеток опытного и контрольного образцов. Следовательно, значительное увеличение флюоресценции связано с продолжающейся продукцией белка GFP в клетках геносенсора *E. coli/pKatG-GFP*, облученных ТГц излучением.

Следует отметить, что с одной стороны – элиминация плазмиды из бактериальных клеток, с другой стороны – наработка белка GFP вследствие подтекания промотора приводят к плохо воспроизводимым результатам развития флюоресцентного ответа у геносенсоров при биологических повторах. Для геносенсоров *E. coli/pCopA-GFP* и *E. coli/pEmrR-GFP* это препятствие было преодолено с помощью использования нормированного уровня индукции, представляющего собой отношение значений флюоресценции опыта и положительного контроля к значениям отрицательного контроля в каждой точке измерений. Флюоресцентный ответ геносенсора *E. coli/pKatG-GFP* на естественный индуктор – перекись водорода является нестабильным (рис. 19), вместе с этим после нетермического воздействия ТГц излучения геносенсор *E. coli/pKatG-GFP* демонстрировал наиболее интенсивный флюоресцентный ответ, поэтому именно этот геносенсор использовался в большинстве экспериментов с облучением минимальной среды. Для геносенсора *E. coli/pKatG-GFP* полученные экспериментальные данные в биологических повторах показывали один и тот же характер развития флюоресцентного ответа, но сравнивать их между собой было проблемно даже с использованием нормированного уровня индукции, поэтому статистическая обработка результатов производилась с использованием метода линейной регрессии. В некоторых случаях линейная регрессия использовалась также для обработки результатов экспериментов с использованием геносенсоров *E. coli/pCopA-GFP* и *E. coli/pEmrR-GFP*, а также геносенсора *E. coli/pGlnA-GFP*.

Следует отметить, что сама по себе флюоресценция белка GFP чувствительна к изменению рН. Однако диапазон, в котором проводились

измерения (рН минимальной среды 7,5) предполагает минимальный вклад этого фактора на интенсивность флюоресценции. Можно предположить развитие эндогенного окислительного стресса при аэробном росте культуры, известно, что при рН 4-6 флюоресценция белка GFP нестабильна и уменьшается во времени [Зубова Н. Н. и др., 2003]. В наших экспериментах по облучению геносенсоров уменьшение флюоресценции во времени не наблюдалось.

Таким образом, увеличение флюоресценции клеток связано непосредственно с индукцией промотора гена *katG* и увеличением концентрации белка GFP в клетках геносенсора *E. coli/pKatG-GFP*. Из приведенных выше данных следует, что в рамках проведенных измерений концентрация белка GFP в клетках после облучения ТГц излучением постоянно растет, т. е. индукция промотора гена *katG* носит триггерный характер. Следует отметить, что за время эксперимента проходит смена по крайней мере восьми поколений клеток.

Характер ответа облученных клеток геносенсора позволяет предположить, что ответ на ТГц излучение развивается под влиянием других регуляторных механизмов, чем в случае индукции перекисными соединениями. Отсутствие быстрого ответа облученных клеток, характерного для перекисных соединений, может свидетельствовать о том, что возможна опосредованная активация ТФ окислительного стресса и, таким образом, более позднее развитие ответной реакции.

Одним из главных энергетических факторов устойчивого функционирования живых систем является система устойчивого метаболизма, обеспеченная за счет реакций последовательного окисления поступающих субстратов. В связи с этим поддержание концентрации кислорода внутри клетки – один из главных факторов устойчивости внутриклеточного метаболизма. На поддержание этого гомеостаза направлены несколько стрессовых систем – в частности функционирование

регулонов *OxyR* и *SoxRS*, а также сопряженного с ними гомеостаза переходных металлов.

Одним из таких металлов является медь. Известно, что ионы меди в бактериальных клетках могут влиять на гомеостаз железа, дестабилизируя белковые кластеры Fe-S [Chillappagari S. et al., 2010; Fung D. K. et al., 2013], в свою очередь белки, содержащие кластеры Fe-S, обладают окислительно-восстановительным потенциалом и являются важнейшими участниками окислительно-восстановительных реакций в клетках. В стрессовых условиях, связанных прежде всего с окислительно-восстановительными процессами, возможна активация эффлюкса ионов меди, которые могут оказаться токсичными для клетки. Поэтому именно стрессовая система поддержания гомеостаза ионов меди, а именно ген *copA*, кодирующий АТФазный насос [Rensing C. et al., 1999], который принимает участие в эффлюксе ионов меди, был выбран для разработки и создания геносенсорной конструкции для дальнейшего тестирования эффектов нетермического воздействия ТГц излучения.

Было показано, что клетки геносенсоров под регуляторным контролем промотора гена *copA* реагируют на ТГц излучение индукцией синтеза белка GFP (рис. 28). При этом уровень индукции репортерного белка GFP у геносенсора *E. coli/pCopA-GFP* заметно ниже, чем у геносенсора *E. coli/pKatG-GFP*. Кинетика индукционного ответа, полученная после нетермического воздействия ТГц излучения, имеет отличия от кинетики ответной реакции на ионы меди. Для облученных образцов характерен менее интенсивный флюоресцентный ответ, чем в случае положительного контроля, однако, если сравнивать с характером кинетических кривых геносенсора *E. coli/pKatG-GFP* развитие ответной реакции у геносенсора *E. coli/pCopA-GFP* не отложено во времени, что позволяет предположить либо прямую активацию гена *copA*, либо небольшое количество промежуточных звеньев в процессе активации.

Еще одна стрессовая система, протестированная относительно нетермического воздействия ТГц излучения, была разработана на основе промотора гена *emrR* (*E. coli* multidrug resistance regulator), входящего в оперон *EmrRAB*. Для геносенсора *E. coli/pEmrR-GFP* после нетермического воздействия ТГц излучением индукция флюоресцентного белка GFP не наблюдалась, для положительного контроля при индукции салициловой кислотой всегда было характерно выраженное увеличение флюоресценции (рис. 24, 29).

Таким образом, система, реагирующая на присутствие антибиотиков, как следует из приведенных выше данных, не реагирует на воздействие тех же доз ТГц излучения, что в свою очередь, свидетельствует о разном уровне реакции стрессовых систем, связанных с поддержанием гомеостаза различных параметров живой клетки к физическим факторам, и это воздействие коррелирует с химической и, возможно, со структурной природой элементов стрессовых ответов.

Совокупность представленных данных свидетельствует о разной реакции отдельных элементов стрессовых систем *E. Coli* на воздействие ТГц излучения. Клетки геносенсоров под регуляторным контролем промоторов генов *katG* и *copA* реагируют на ТГц излучение индукцией синтеза белка GFP. При этом уровень индукции репортерного белка GFP у геносенсора *E. coli/pCopA-GFP* заметно ниже, чем у геносенсора *E. coli/pKatG-GFP*. Из рисунка 31 видно, что нормированные уровни индукции для облученных ТГц излучением геносенсоров *E.coli/pKatG-GFP*, *E. coli/pEmrR-GFP* и *E. coli/pCopA-GFP* достоверно отличаются друг от друга. При этом нормированные уровни индукции для естественных индукторов геносенсоров также достоверно отличаются друг от друга. Из рисунка 31 видно, что 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 кислоты. Показано отсутствие значимой разницы в уровнях флюоресценции клеток геносенсора *E.coli/pEmrR-GFP* при нетермическом воздействии ТГц излучения и отрицательном контроле.

Известно, что в промоторной области гена *copA* помимо сайта связывания ТФ CueR, содержится гипотетический сайт связывания глобального ТФ FruR (Fructose repressor) [Рачеев Д. А., 2009], но непонятно в роли активатора или репрессора он выступает. Примечательно, что ТФ 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. 43).

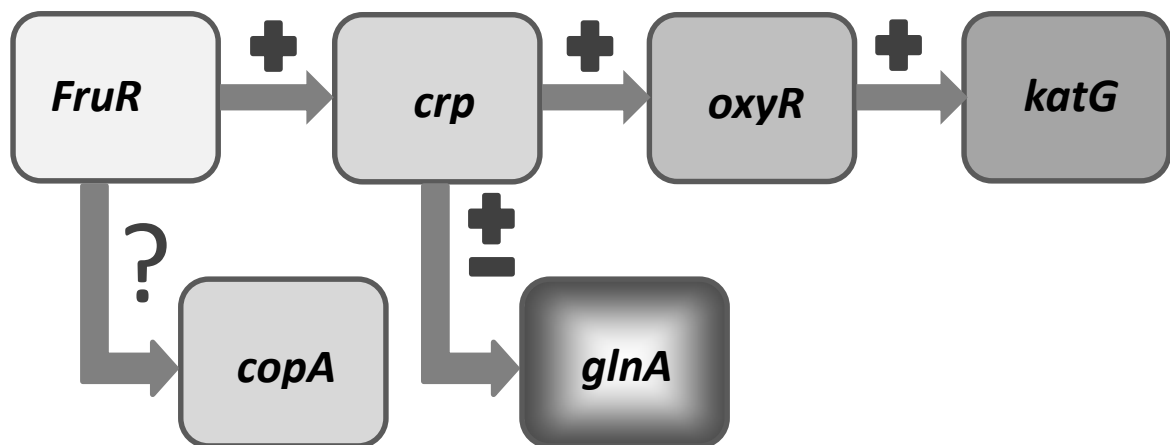


Рисунок 43. Схема влияния ТФ FruR на регуляцию генов *katG*, *copA* и *glnA*.

Известно, что FruR обеспечивает переключение между анаболизмом и катаболизмом сахаров, в случае недостатка сахаров активируя анаболические пути, а в случае их избытка – катаболические. Было показано, что в *E. coli* данный белок контролирует экспрессию большого числа генов,

вовлеченных в различные процессы центрального метаболизма [Ramseier T. M. et al., 1995; Saier M. H., 1996] в результате чего белок был переименован в Cra (catabolite repressor-activator) [Saier M. H., Ramseier T. M., 1996]. В регуляторной области гена *emrR* сайты связывания FruR обнаружены не были [Рачеев Д. А., 2009].

Важным моментом является создание и тестирование геносенсорной конструкции на основе промотора гена *glnA*, выявленного в результате протеомного анализа быстрого ответа после нетермического воздействия ТГц излучения на клетки *E. coli* M13. Оперон *glnALG* имеет сложную регуляцию, его транскрипция контролируется 2 тандемными промоторами *glnAp1* и *glnAp2*. Транскрипция с промотора *glnAp1* может активироваться ТФ Csr-цАМФ [Tian Z. X. et al., 2001], который также является активатором для OxyR. Csr является глобальным регулятором обмена веществ у *E. coli*, активизируя гены, потенциально связанные с приспособленностью [Urral S. et al., 2014]. Таким образом, гипотетически можно предположить, что вследствие нетермического воздействия ТГц излучения бактериальная клетка испытывает стрессовое воздействие, связанное с нарушением окислительно-восстановительного потенциала, что находит свое отражение как в активации системы окислительного стресса, так и в увеличении эффлюкса ионов меди, токсичность которых усиливается в подобных условиях. При этом неудивительно, что такие изменения затрагивают глобальные процессы клеточного метаболизма, а не только конкретные генные сети стрессовых реакций.

Фройлихом была предложена гипотеза о нетепловых эффектах ТГц излучения, опосредованных возбуждением специфических биологических макромолекул линейными или нелинейными резонансными механизмами. Гипотеза предполагает непосредственное воздействие ТГц излучения на структуры клеток, меняющее их активность или функции [Frohlich H., 1982].

Проведенный выше анализ кинетических особенностей реакции клеток геносенсоров на однократное нетермическое воздействие ТГц излучения позволил сформулировать гипотезу о его воздействии на среду или ее компоненты. Из совокупности изложенных выше данных следует, что нетермическое воздействие ТГц излучения на геносенсоры связано либо с запоминанием однократного воздействия излучения на клеточный аппарат – прежде всего генетический, либо с модификацией культуральной среды. Исходя из этого был поставлен ряд экспериментов по разделению регистрации воздействия излучения непосредственно на клетки и среду.

Неоднократно было проверено и подтверждено отсутствие температурных эффектов в ходе экспериментов с облучением. Гипотетическими мишенями нетермического воздействия ТГц излучения в данном случае могли быть как сами клетки или их компоненты, например, мембраны [Doria A. et al., 2004] или синтетический аппарат, так и непосредственно жидкая среда, как клеточная (цитоплазма) так и культуральная. Для выявления компонентов системы «геносенсор – среда», чувствительных по отношению к нетермическому воздействию ТГц излучения, нами была поставлена серия экспериментов по разделению клеток геносенсоров и среды с целью изучить возможность воздействия излучения на минимальную среду. Было показано, что при добавлении к необлученной клеточной культуре геносенсора *E.coli/pKatG-GFP* облученной минимальной среды происходит индукция экспрессии белка GFP, как показано на рисунке 32. В случае добавления к облученным клеткам необлученной среды индукция экспрессии белка GFP не наблюдалась (рис. 32).

Независимая серия аналогичных экспериментов с геносенсором *E.coli/pGlnA-GFP* показала аналогичные результаты – добавление облученной среды к клеткам этого геносенсора индуцировало экспрессию белка GFP, добавление необлученной среды к этим же облученным клеткам не индуцировало экспрессию белка GFP (рис. 33). То есть общий характер

ответа клеток *E. coli* на нетермическое воздействие ТГц излучения связан не только с непосредственным воздействием излучения на клетки *E. coli*, но и со средой, в которой они культивируются.

Так как нетермическое воздействие ТГц излучения оказалось связано и с воздействием на среду, необходимо было проверить способность ТГц излучения нетермически модифицировать среды другого состава. Использование в качестве основы геносенсоной конструкции промотора, маркирующего другую стрессовую систему, позволило нам расширить представления о реактивности генома *E. coli* в ответ на нетермическое воздействие ТГц излучения. В частности, уместно было использовать сконструированный нами геносенсор *E.coli/pCopA-GFP* и минимальные среды М9 и ГГМ. В результате экспериментов по облучению минимальных сред М9 и ГГМ с использованием необлученных геносенсоров *E.coli/pKatG-GFP* и *E.coli/pCopA-GFP* была продемонстрирована индукция экспрессии флюоресцентного белка GFP (рис. 34, 35). Таким образом, среда и другого состава, облученная ТГц излучением приобретает способность индуцировать клетки геносенсоров, маркирующих активность стрессовых систем *E. coli*, связанных с присутствием ионов металлов и окислительного стресса.

Однако в состав минимальных сред М9 и ГГМ входят одинаковые компоненты – вода, глюкоза и некоторые соли. Это обстоятельство диктовало необходимость изучения нетермического воздействия ТГц излучения отдельно на компоненты среды с целью выявления потенциальной мишени для модификации.

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

- Изучение влияния средней мощности излучения на приобретение способности среды М9 к индукции экспрессии маркера окислительного стресса *E. coli* при помощи геносенсора *E.coli/pKatG-GFP*.

- Выявление сохранения способности к индукции при разведении облученной среды М9 системы окислительного стресса *E. coli* при помощи геносенсора *E.coli/pKatG-GFP*.

- Исследование способности к индукции стрессовых систем *E.coli* средой М9, полученной на основе облученных отдельно компонентов.

- Изучение длительности сохранения способности к индукции стрессовых систем *E.coli* облученной средой М9.

Показанный ранее эффект воздействия облученной отдельно от клеток *E.coli/pKatG-GFP* среды М9 на экспрессию маркера окислительного стресса позволяет сравнивать воздействие ТГц излучения различной мощности в одном эксперименте. Диссипация энергии излучения при различной мощности приводит к разнице конечной температуры в одном и том же объеме среды. Регулирование средней мощности осуществлялось при помощи обтюлятора, что позволяло удерживать температуру среды при разных значениях мощности в диапазоне температур от 27 до 45°C. Облучение минимальной среды М9 при разных температурах показало, что при всех температурах среда М9 приобрела способность к индукции экспрессии флюоресцентного белка GFP у геносенсора *E.coli/pKatG-GFP* (рис. 42). Нами отмечена слабая тенденция к увеличению способности к индукции экспрессии флюоресцентного белка GFP у геносенсора *E.coli/pKatG-GFP* в прямой зависимости от повышения температуры во время облучения, а следовательно, от поглощенной дозы. В связи с этим необходимо отметить, что выше описана пороговая зависимость от дозы реакции этого же геносенсора на нетермическое воздействие ТГц излучения. Во всех экспериментах с изменением средней мощности не было отмечено существенного влияния этого параметра на характер изменения

флюоресценции репортерного белка GFP. Это может быть обусловлено тем обстоятельством, что количество фактора индукции промотора геносенсора даже при минимальной средней мощности существенно превышает порог реакции геносенсора – иными словами количество клеток геносенсора существенно ниже, чем необходимо для регистрации разницы в динамике ответа на различные средние мощности.

Экспериментальный подход к решению этого вопроса был отработан в серии экспериментов с разведением минимальной среды, облученной в тех же условиях при температуре 40°C в течение 15 минут при средней интенсивности мощности 1,4 Вт/см². Динамика ответа геносенсора *E.coli/pKatG-GFP* на разные разведения минимальной облученной среды M9 представлена на рисунке 37. Видно, что по мере развития ответа происходят изменения соотношения концентрации клеток и индуктора, образовавшегося под действием ТГц излучения, и проявляется разница в концентрации репортерного белка, нарабатываемого клетками в ответ на разные разведения облученной среды. Следует отметить, что динамика индукции синтеза белка GFP клетками геносенсора *E.coli/pKatG-GFP* в этой серии экспериментов была обратно пропорциональна разведению облученной минимальной среды M9. В ходе эксперимента клетки растут и соотношение концентраций фактора индукции флюоресцентного белка и клеток геносенсора падает. Примерно к 160 минутам заметен вклад концентрации фактора в уровень индукции белка GFP (рис. 37). Таким образом путем последовательного разведения облученной среды можно оценить вклад параметра «средняя мощность» в процесс модификации среды – в среднем, существует прямая зависимость между средней мощностью и концентрацией гипотетического фактора индукции.

Для получения характеристики влияния ТГц излучения большой мощности на образование фактора, индуцирующего активность изученных стрессовых систем, необходимо изучить его устойчивость во времени –

иными словами определить сроки хранения модифицированной ТГц излучением среды. С этой целью была поставлена следующая серия экспериментов. Результаты показаны выше на рисунке 38. Из этого рисунка следует, что индукция синтеза белка GFP клетками геносенсора *E.coli/pKatG-GFP* проявлялась при хранении облученных образцов среды М9 в временном диапазоне от 180 минут до 20 часов при температуре 4°C. Динамика флюоресцентного ответа клеток геносенсора *E.coli/pKatG-GFP* не отличима от таковой при непосредственном облучении клеток геносенсора вместе со средой М9. Эти данные позволяют сделать заключение об **устойчивости** фактора индукции флюоресцентного ответа геносенсора *E.coli/pKatG-GFP*, возникающего в среде М9 в ответ на нетермическое воздействие ТГц излучения.

Химическую природу фактора можно прояснить, облучая отдельно компоненты минимальной среды М9. Для этого была проведена серия экспериментов, посвященная изучению способности компонентов минимальной среды М9 модифицироваться под нетермическим 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.

Сразу после облучения, до добавления к клеткам геносенсора, состав минимальной среды М9 доводился до полного и однократного путем

добавления недостающих компонентов и разбавлением необлученной стерильной водой.

Проведенные эксперименты продемонстрировали, что ключевую роль в способности к модификации под действием ТГц излучения минимальной среды M9 принадлежит органической составляющей – глюкозе или казаминовым кислотам. Минимальная среда M9 на основе воды, подвергавшейся воздействию ТГц излучения, или в составе без органической компоненты не приводила к индукции флюоресцентного белка GFP в клетках геносенсора (рис. 39, А). Облучение минимальной среды в присутствии хотя бы одной из органических компонент (глюкозы или казаминовых кислот) приводило к индукции флюоресцентного белка GFP в клетках геносенсора, хотя и менее интенсивной, чем в случае облученной минимальной среды полного состава (рис. 39, Б).

В дальнейшем изучение вклада влияния органических компонент свелось к изучению воздействия ТГц излучения на глюкозу в сочетании с отдельными неорганическими компонентами минимальной среды M9, поскольку казаминовые кислоты представляют собой кислотные гидролизаты белка казеина и имеют достаточно сложный состав.

Были протестированы следующие экспонированные образцы:

- Глюкоза с водой
- Глюкоза с фосфатным буфером
- Глюкоза с хлоридом натрия
- 40% раствор глюкозы.

После облучения эти образцы доводились до полного состава минимальной среды M9 и добавлялись к клеткам геносенсора *E.coli/pKatG-GFP* (рис. 40, 41).

Результаты демонстрируют наличие слабой индукции синтеза белка GFP средами, приготовленными на основе облученной глюкозы, но никогда на основе неорганических облученных компонентах среды. Следует отметить, что индукция флюоресценции клеток геносенсора *E.coli/pKatG-GFP* была значительно ниже в случае облучения отдельно глюкозы с какими-либо компонентами минимальной среды, чем при облучении среды M9 в полном составе.

Изложенные выше результаты позволили описать целый ряд особенностей нетермического воздействия ТГц излучения на клетки *E. coli* при помощи геносенсора *E.coli/pKatG-GFP*, маркирующего реактивность системы окислительного стресса. Изучение нетермического воздействия ТГц излучения на геносенсоры *E.coli/pCopA-GFP* и *E.coli/pEmrR-GFP* позволило показать избирательность этого воздействия на стресс-реактивные системы клеток *E. coli*. Промоторы геносенсоров *E.coli/pCopA-GFP* и *E.coli/pEmrR-GFP* маркируют ответ клеток *E. coli* соответственно на стрессовое воздействие ионов меди и салициловой кислоты. Описанные выше результаты однозначно свидетельствуют об индукции флюоресцентного ответа на нетермическое воздействие ТГц излучения у геносенсора *E.coli/pCopA-GFP* и отсутствии такового у геносенсора *E.coli/pEmrR-GFP*. Динамика ответа на нетермическое воздействие непосредственно на клетки геносенсора *E.coli/pCopA-GFP* сходна с таковой у геносенсора *E.coli/pKatG-GFP*. Однако, как видно из результатов, представленных на рисунке 31, уровень индукции флюоресцентного ответа клеток *E.coli/pCopA-GFP* всегда был ниже чем уровень индукции флюоресцентного ответа у клеток геносенсора *E.coli/pKatG-GFP* при их индукции естественными природными индукторами. Напомним, что естественным индуктором для геносенсора *E.coli/pKatG-GFP* является перекись водорода, а для геносенсора *E.coli/pCopA-GFP* ионы меди. Геносенсоры *E.coli/pKatG-GFP*, *E.coli/pCopA-GFP* и *E.coli/pEmrR-GFP* отвечают на культивирование в облученной среде

М9 точно такой же динамикой развития флюоресцентного ответа как и на непосредственное нетермическое воздействие ТГц излучения.

Сравнение динамики ответов геносенсоров *E.coli/pKatG-GFP* и *E.coli/pCopA-GFP* на нетермическое воздействие ТГц излучения выявил, что для геносенсора *E.coli/pKatG-GFP* характерна задержка развития флюоресцентного ответа по сравнению с геносенсором *E.coli/pCopA-GFP*, что может указывать на наличие промежуточных звеньев активации гена *katG* после воздействия ТГц излучения на клетки *E. coli*. Исходя из динамики ответа геносенсора на базе промотора гена *copA*, кодирующего АТФ-азный эффлюксный насос ионов меди, он имеет меньше промежуточных звеньев активации в ответ на нетермическое воздействие ТГц излучения.

Данные протеомного анализа 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*. Полученная конструкция показывала стабильную стимуляцию ТГц излучением в дозах, соответствующих другим геносенсорам. Таким образом, для гена *glnA* показана стимуляция активности как уровне трансляции (при протеомном анализе), так и на уровне транскрипции при анализе флюоресцентного ответа геносенсора *E.coli/pGlnA-GFP* на нетермическое воздействие ТГц излучения. Следует отметить, что геносенсор *E.coli/pGlnA-GFP* имел идентичную динамику ответа как на непосредственное облучение ТГц излучением, так и на культивирование его клеток в облученной среде.

Экспериментальный материал, полученный при анализе флюоресцентного ответа клеток совокупности геносенсоров, ясно свидетельствует о наличии избирательности реакции различных стрессовых систем на нетермическое воздействие ТГц излучения.

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 среды 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 металлов, 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]. 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. Таким образом, можно переформулировать гипотезу Фройлиха – воздействие осуществляется как через резонансные 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. 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 ЛИТЕРАТУРЫ

1. Alexandrov B. S., Rasmussen K. Ø., Bishop A. R., Usheva A., Alexandrov L. B., Chong S., Dagon Y., Booshehri L. G., Mielke C. H., Phipps M. L., Martinez J. S., Chen H. T., Rodriguez G. Non-thermal effects of terahertz radiation on gene expression in mouse stem cells// *Biomed Opt Express*. – 2011. – V. 2(9). – P. 2679-2689.
2. Alexandrov B.S., Gelev V., Bishop A.R., Usheva A., Rasmussen KO. DNA breathing dynamics in the presence of a terahertz field// *Phys Lett A*. – 2010. – Vol. 374(10). –DOI: 10.1016/j.physleta.2009.12.077.
3. Alonso-Moraga A., Bocanegra A., Torres J.M., López-Barea J., Pueyo C. Glutathione status and sensitivity to GSH-reacting compounds of *Escherichia coli* strains deficient in glutathione metabolism and/or catalase activity// *Mol Cell Biochem*. – 1987. – Vol. 73(1). – P. 61–68.
4. Altuvia S., Weinstein-Fischer D., Zhang A., Postow L., Storz G. A small, stable RNA induced by oxidative stress: role as a pleiotropic regulator and antimutator // *Cell*. - 1997. – Vol. 90 (1). – P. 43–53.
5. Altuvia S., Zhang A., Argamon L., Tiwari A., Storz G. The *Escherichia coli* OxyS regulatory RNA represses *fhlA* translation by blocking ribosome binding // *EMBO J*. – 1998. – V. 17(20). – P. 6069–6075.
6. Andersen J., Sternberg C., Poulsen L. K., Bjorn S. P., Givskov M., Molin S. New unstable variants of green fluorescent protein for studies of transient gene expression in bacteria// *Appl. Environ. Microbiol*. – 1998. – Vol. 64(6). – P. 2240–2246.
7. Apontoweil P., Berends W. Isolation and initial characterization of glutathione-deficient mutants of *Escherichia coli* K 12 // *Biochim. Biophys. Acta*. – 1975. – Vol. 399(1). – P. 10–22.
8. Aslund F., Ehn B., Miranda-Vizuete A., Pueyo C., Holmgren A. Two additional glutaredoxins exist in *Escherichia coli*: Glutaredoxin 3 is a hydrogen donor for ribonucleotide reductase in a thioredoxin/glutaredoxin 1 double mutant // *Proc. Natl.Acad. Sci. USA*. – 1994. – Vol. 91(21). – P. 9813–9817.

9. Aslund F., Zheng M., Beckwith J. and Storz G. Regulation of the OxyR transcription factor by hydrogen peroxide and the cellular thiol– disulfide status // Proc Natl Acad Sci U S A. – 1999 – V. 96(11). – P. 6161–6165.
10. Aslund F., Zheng M., Beckwith J., Storz G. Regulation of the OxyR transcription factor by hydrogen peroxide and the cellular thiol-disulfide status // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1999. – Vol. 96(11). – P. 6161–6165.
11. Baan R., Grosse Y., Lauby-Secretan B., El Ghissassi F., Bouvard V., Benbrahim-Tallaa L., et al. (2011) Carcinogenicity of radiofrequency electromagnetic fields// Lancet Oncol 12. – 2011. – Vol. 12(7). – P. 624–626.
12. Baquero F., Bouanchaud D., Martinez-Perez M.C., Fernandez C. Microcin plasmids: a group of extrachromosomal elements coding for low-molecular-weight antibiotics in Escherichia coli// J Bacteriol. – 1978. – Vol.135(2). – P. 342–347.
13. Belkin M.A., Capasso F., Xie F., Belyanin A., Fischer M., Wittmann A. et al. Room temperature terahertz quantum cascade laser source based on intracavity difference-frequency generation// Appl. Phys. Lett. – 2008. – Vol. 92. – DOI:10.1063/1.2919051.
14. Belkin S., Smulski D. R., Vollmer A. C., Van Dyk T. K., Larossa R. A. Oxidative stress detection with Escherichia coli harboring a katG':lux fusion//Appl. Environ. Microbiol. – 1996. – Vol. 62(7). – P. 2252–2256.
15. Belyaev I. Ya., Alipov Y. D., Shcheglov V. S., Polunin V. A., Aizenberg O. A. Cooperative response of escherichia coli cells to the resonance effect of millimeter waves at super low intensity// Electro Magnetobiol. 1994. v.13(1). p.14-56.
16. Berberich M.A. A glutamate-dependent phenotype in E. coli K12: the result of two mutations//Biochem Biophys Res Commun. – 1972. – Vol. 47(6). – P. 1498–1503.
17. Bird L.J., Coleman M.L., Newman D.K. Iron and copper act synergistically to delay anaerobic growth of bacteria// Appl Environ Microbiol. – 2013. – Vol.79(12). – P. 3619–3627.

18. Bock J., Fukuyo Y., Kang S., Phipps M. L., Alexandrov L. B., Rasmussen K., Bishop A. R., Rosen E. D., Martinez J. S., Chen H. T., Rodriguez G., Alexandrov B. S., Usheva A. Mammalian stem cells reprogramming in response to terahertz radiation// *PLoS One*. – 2010. – V. 5(12). – doi: 10.1371/journal.pone.0015806.
19. Bogomazova A. N., Vassina E. M., Goryachkovskaya T. N., Popik V. M., Sokolov A. S., Kolchanov N. A., Lagarkova M. A., Kiselev S. L., Peltek S. E. No DNA damage response and negligible genome-wide transcriptional changes in human embryonic stem cells exposed to terahertz radiation// *Sci Rep*. – 2015. – V. 5(7749). – doi: 10.1038/srep07749.
20. Bolotin V.P., Vinokurov N.A., Kayran D.A. Status of the Novosibirsk terahertz FEL // *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. A*. – 2005. – V. 543. – P. 81
21. Borges-Walmsley M.I., Beauchamp J., Kelly S.M., Jumel K., Candlish D., Harding S.E. et al. Identification of oligomerization and drug-binding domains of the membrane fusion protein EmrA// *J Biol Chem*. – 2003. – Vol.278(15). – P. 12903–12912.
22. Bourne N., Clothier R.H., D'Arienzo M., Harrison P. The effects of terahertz radiation on human keratinocyte primary cultures and neural cell cultures// *Altern Lab Anim*. – 2008. – Vol. 36(6). – P. 667–684.
23. Brown N.L., Stoyanov J.V., Kidd S.P., Hobman J.L. The MerR family of transcriptional regulators// *FEMS Microbiol Rev*. – 2003. – Vol. 27(2–3). – P. 145–163.
24. Brown M. S., Segal A., Stadtman E. R. Modulation of glutamine synthetase adenylation and deadenylation is mediated by nucleotide transformation of the PII regulatory protein (*E. coli*/protein-bound uridine nucleotide/adenylyltransferase/2-oxo-glutarate-cascade regulation). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 1971. – Vol. 68. – P. 2949–2953.
25. Bushweller J.H., Aslund F., Wuthrich K., Holmgren A. Structural and functional characterization of the mutant *Escherichia coli* glutaredoxin (C14-S) and

its mixed disulfide with glutathione // *Biochemistry*. – 1992. – Vol. 31(38). – P. 9288–9293.

26. Cabiscol E., Tamarit J., Ros J. Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species // *Internatl. Microbiol.* – 2000. – Vol. 3(1). – P. 3–8.

27. Chillappagari S., Seubert A., Trip H., Kuipers O. P., Marahiel M. A., Miethke M. J. Copper Stress Affects Iron Homeostasis by Destabilizing Iron-Sulfur Cluster Formation in *Bacillus subtilis* // *J. Bacteriol.* – 2010 – Vol. 192(10) – P. 2512-2524.

28. Cody C., Prasher D., Westler W., Prendergast F., Ward W. Chemical structure of the hexapeptide chromophore of the *Aequorea* green-fluorescent protein // *Biochemistry*. – 1993. – V. 32(5). – P. 1212-1218.

29. Cohen G., Hochstein P. Glutathione peroxidase: the primary agent for the elimination of hydrogen peroxide in erythrocytes // *Biochem.* – 1963. – Vol. 2. – P. 1420 – 1428.

30. Das K.S., White C. W. Redox systems of the cell: possible links and implications // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2002. – V. 99(15). – P. 9617–9618.

31. Doria A., Gallerano G. P., Giovenale E., Messina G., Lai A., Ramundo-Orlando A. et al. THz radiation studies on biological systems at the ENEA FEL Facility // *Infrared Physics & Technology* 45. – 2004. – P. 339-347.

32. Dower W.J., Miller J.F. Ragsdale C.W. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation // *Nucleic Acids Research*. – 1988. – Vol. 16(13). – P. 6127-6145.

33. D'Souza S.F. Microbial biosensors // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2001. – Vol. 16(6). – P. 337–353.

34. Echchgadda I., Grundt J.A., Tarango M., Ibey B. L., Tongue T., Liang M. et al. Using a portable terahertz spectrometer to measure the optical properties of *in vivo* human skin // *J. Biomed. Opt.* – 2013. – Vol. 18(12). – DOI:10.1117/1.JBO.18.12.120503.1.2

35. Elias L.R., Hu J., Ramian G. The UCSB Electrostatic Accelerator Free Electron Laser: First Operation// Nucl. Instr. and Meth. A.– 1985. – Vol. 237(1-2). – P. 203–206.
36. Elowitz M. B., Surette M. G., Wolf P. E., Stock J. B., Leibler S. Protein mobility in the cytoplasm of *Escherichia coli*// Journal of Bacteriology. 1999. – V. 181(1). – P. 197-203.
37. Fahey R.C., Brown W.C., Adams W.B., Worsham M.B. Occurrence of glutathione in bacteria // J. Bacteriol. – 1978. – Vol. 133(3). – P. 1126–1129.
38. Finney L.A., O'Halloran T.V. Transition metal speciation in the cell: insights from the chemistry of metal ion receptors// Science. – 2003. – Vol. 300(5621). – P. 931–936.
39. Flint D. H., Tuminello J. F., Emptage M. H. The inactivation of Fe-S cluster containing hydro-lyases by superoxide// J. Biol. Chem. – 1993. – Vol. 268(30). – P. 22369–22376.
40. Franke S., Grass G., Rensing C., Nies D.H. Molecular analysis of the copper-transporting efflux system CusCFBA of *Escherichia coli*// J Bacteriol. – 2003. – Vol. 185(13). – P. 3804–3812.
41. Frohlich H. What are non-thermal electric biological effects?// Bioelectromagnetics. – 1982. – Vol. 3(1). – P. 45–46.
42. Fung D.K., Lau W.Y., Chan W.T., Yan A. Copper efflux is induced during anaerobic amino acid limitation in *Escherichia coli* to protect iron-sulfur cluster enzymes and biogenesis// J Bacteriol. – 2013. – Vol.195(20). – P. 4556–4568.
43. Garcia E., Rhee S.G. Cascade control of *Escherichia coli* glutamine synthetase. Purification and properties of PII uridylyltransferase and uridylyl-removing enzyme// J Biol Chem. – 1983. – Vol. 258(4). – P. 2246–2253.
44. Geletyuk V.I., Kazachenko V.N., Chemeris N.K., Fesenko E.E. Dual effects of microwaves on single Ca(2+)-activated K⁺ channels in cultured kidney cells Vero// FEBS Lett. – 1995. – Vol. 359(1). – P. 85–88.

45. Geu-Flores F., Nour-Eldin H.H., Nielsen M. T., Halkier B.A. USER fusion: a rapid and efficient method for simultaneous fusion and cloning of multiple PCR products// *Nucleic Acids Res.* – 2007. – Vol. 35(7). – DOI: 10.1093/nar/gkm106
46. González-Flecha B., Demple B. Genetic responses to free radicals. Homeostasis and gene control// *Ann. N Y Acad. Sci.* – 2000. – Vol. 899. – P. 69–87.
47. González-Flecha B., Demple B. Metabolic sources of hydrogen peroxide in aerobically growing *Escherichia coli*// *J. Biol. Chem.* – 1995. – V. 270. – P. 13681–13687.
48. Grass G., Thakali K., Klebba P.E., Thieme D., Müller A., Wildner G.F., Rensing C. Linkage between catecholate siderophores and the multicopper oxidase CueO in *Escherichia coli*// *J Bacteriol.* – 2004. – Vol.186(17). – P. 5826–5833.
49. Greenberg J.T., Demple B. Glutathione in *Escherichia coli* is dispensable for resistance to H₂O₂ and gamma radiation// *J Bacteriol.* – 1986. – Vol. 168(2). – P. 1026–1029.
50. Grkovic S., Brown M.H., Skurray R.A. Regulation of bacterial drug export systems// *Microbiol. Mol. Biol Rev.* – 2002. – Vol.66(4). – P. 671–701.
51. Grobe C., Schleuder G., Schmole C., Nies D. H. Survival of *Escherichia coli* cells on solid copper surfaces is increased by glutathione// *Appl Environ Microbiol.* – 2014. – Vol. 80(22). – P. 7071–7078.
52. Grundler W., Kaiser F., Keilmann F., Walleczek J. Mechanisms of electromagnetic interaction with cellular systems. *Naturwissenschaften.* – 1992. – Vol. 79(12). – P. 551–559.
53. Gushima H., Miya T., Murata K., Kimura A. Purification and characterization of glutathione synthetase from *Escherichia coli* B// *J Appl Biochem.* – 1983. – Vol. 5(3). – P. 210–218.

54. Gutteridge J. M., Halliwell B. Comments on review of Free Radicals in Biology and Medicine, second edition, by Barry Halliwell and John M. C. Gutteridge//Free Radic. Biol. Med. – 1992. – Vol. 12(1). – P. 93–95.
55. Hakkila, K., Maksimow, M., Karp, M., Virta, M. Reporter genes lucFF, luxCDABE, gfp, and dsred have different characteristics in whole-cell bacterial sensors // Anal. Biochem. – 2002. – V. 301(2). – P. 235-242.
56. Hausladen A., Privalle C.T., Keng T., DeAngelo J., Stamler J.S. Nitrosative stress: activation of the transcription factor OxyR// Cell. – 1996. – Vol. 86(5). – P. 719–729.
57. Heim R., Prasher D., Tsien R. Wavelength mutations and posttranscriptional autoxidation of green fluorescent protein // PNAS. –1994. – V. 91(26). – P. 12501-12504.
58. Helbig K., Bleuel C., Krauss G. J., Nies D. H. Glutathione and Transition-Metal Homeostasis in Escherichia coli// J Bacteriol. – 2008. – Vol.190(15). – P. 5431–5438.
59. Helsel M. E., Franz K. J. Pharmacological activity of metal binding agents that alter copper bioavailability//Dalton Trans. – 2015. – Vol. 44(19). – P. 8760–8770.
60. Hengge-Aronis R. Interplay of global regulators and cell physiology in the general stress response of Escherichia coli// Curr. Opin. Microbiol. – 1999. – Vol. 2(2). – P. 148–152.
61. Hengge-Aronis R., Klein W., Lange R., Rimmele M., Boos W.. Trehalose synthesis genes are controlled by the putative sigma factor encoded by rpoS and are involved in stationary phase thermotolerance in Escherichia coli // J. Bacteriol. – 1991. – Vol. 173(24). – P. 7918–7924.
62. Henle E.S., Han Z., Nang N., Rai P., Luo Y. Sequence-specific DNA cleavage by Fe²⁺-mediated Fenton reactions has possible biological implications // J. Biol. Chem. – 1999. – Vol. 274(2). – P. 962–971.

63. Henle E.S., Linn S. Formation, prevention, and repair of DNA damage by iron/hydrogen peroxide // *J. Biol.Chem.* – 1997. – Vol. 272(31). – P. 19095–19098.
64. Hidalgo E., Bollinger J. M. Jr., Bradley T. M., Walsh C. T., Demple B. Binuclear [2Fe-2S] clusters in the Escherichia coli SoxR protein and role of the metal centers in transcription // *J Biol Chem.* – 1995. – Vol. 270(36). – P. 20908–20914.
65. Hidalgo E., Demple B. An iron-sulfur center essential for transcriptional activation by the redox-sensing SoxR protein // *EMBO J.* – 1994. – V. 13(1). – P. 138–146.
66. Hintzsche H., Jastrow C., Heinen B., Baaske K., Kleine-Ostmann T., Schwerdtfeger M. Terahertz radiation at 0.380 THz and 2.520 THz does not lead to DNA damage in skin cells in vitro// *Radiat Res.* – 2013. – Vol. 179(1). – P. 38–45.
67. Hintzsche H., Jastrow C., Kleine-Ostmann T., Kärst U., Schrader T., Stopper H. Terahertz electromagnetic fields (0.106 THz) do not induce manifest genomic damage in vitro// *PLoS One.* – 2012. – Vol. 7(9). – DOI: 10.1371/journal.pone.0046397.
68. Holmgren A., Aslund F. Glutaredoxin // *Methods Enzymol.* – 1995. – Vol. 252. – P. 283–292.
69. Holmgren A., Johansson C., Berndt C., Lonn M.E., Hudemann C., Lillid C.H. Thiol redox control via thioredoxin and glutaredoxin systems// *Biochem. Soc. Trans.* – 2005. – Vol. 33(6). – P. 1375 – 1377.
70. <http://ecocyc.org/ECOLI/NEW-IMAGE?type=GENE&object=EG10511>
71. Huber R., Tauser F., Brodschelm A., Bichler M., Abstreiter G., Leitenstorfer A. How many-particle interactions develop after ultrafast excitation of an electron-hole plasma// *Nature.* – 2001. – Vol. 414. – P. 286–289.
72. Imlay J. A. The molecular mechanisms and physiological consequences of oxidative stress: lessons from a model bacterium// *Nature Reviews Microbiology* – 2013. – Vol. 11. – P. 443–454.

73. Imlay J. A., Linn S. Mutagenesis and stress-responses induced in *Escherichia coli* by hydrogen peroxide // *J. Bacteriol.* – 1987. – Vol. 169(7). – P. 2967–2976.
74. Imlay J.A., Linn S. DNA damage and oxygen radical toxicity// *Science.* – 1988. – Vol. 240. – P. 1302–1309.
75. Imlay K. R., Imlay J. A. Cloning and analysis of *sodC*, encoding the copper-zinc superoxide dismutase of *Escherichia coli*// *J Bacteriol.* – 1996. – V. 178(9). – P. 2564-2571.
76. Jang S., Imlay J.A. Micromolar intracellular hydrogen peroxide disrupts metabolism by damaging iron-sulfur enzymes// *J. Biol. Chem.* – 2007. – Vol. 282(2). – P. 929–937.
77. Jeong K., Huh Y.-M., Kim S.-H., Park Y., Son J.-H., Oh S. J. et al. Characterization of blood using terahertz waves// *J. Biomed. Opt.* – 2013. – Vol. 18(10). – DOI:10.1117/1.JBO.18.10.107008.
78. Ji Y.B., Lee E.S., Kim S.-H., Son J.-H., Jeon T.-I. A miniaturized fiber-coupled terahertz endoscope system// *Optics Express.* – 2009. – Vol. 17(19). – P. 17082–17087.
79. Jiang P., Peliska J.A., Ninfa A.J. The regulation of *Escherichia coli* glutamine synthetase revisited: role of 2-ketoglutarate in the regulation of glutamine synthetase adenylylation state// *Biochemistry.* – 1998. – Vol. 37(37). – P. 12802–12810.
80. Kang Y., Weber K. D., Qiu Y., Kiley P. J., Blattner F. R. Genome-wide expression analysis indicates that FNR of *Escherichia coli* K-12 regulates a large number of genes of unknown function// *Bacteriol.* – 2005. – V. 187(3). – P. 1135-1160.
81. Keiler K. C., Waller P. R., Sauer R.T. Role of a peptide tagging system in degradation of proteins synthesized from damaged messenger RNA// *Science.* – 1996. – V. 271(5251). – P. 990-993.

82. Khlebodarova T. M., Tikunova N. V., Kachko A. V., Stepanenko I. L., Podkolodny N. L., Kolchanov N. A. Application of bioinformatics resources for genosensor design// *J. Bioinform. Comput. Biol.*, – 2007. – Vol. 5(2B). – P. 931–938.
83. Kibena E., Raud M., Jõgi E., Kikas T. Semi-specific *Microbacterium phyllosphaerae*-based microbial sensor for biochemical oxygen demand measurements in dairy wastewater//*Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* – 2012. – Vol. 20(4). – P. 2492–2445.
84. Kim C., Gu M. B. A bioluminescent sensor for high throughput toxicity classification// *Biosens. Bioelectron.*, – 2003. – Vol. 18(8). – P. 1015–1021.
85. Kim S.O., Merchant K., Nudelman R., Beyer W.F. Jr., Keng T., DeAngelo J., et al. OxyR: a molecular code for redox-related signaling// *Cell.* – 2002. – Vol. 109(3). – P. 383–396.
86. Kimmitt M.F. Restrahen to T-Rays – 100 Years of Terahertz Radiation// *J. Biol. Phys.* – 2003. – Vol. 29(2-3). – P. 77–85.
87. Kohler R., Tredicucci A., Beltram F., Beere H.E., Linfield E.H., Davies A.G. et al. Terahertz semiconductor-heterostructure laser// *Nature.* – 2002. – Vol. 417(6885). – P. 156–159.
88. Korenstein-Ilan A., Barbul A., Hasin P., Eliran A., Gover A., Korenstein R. Terahertz radiation increases genomic instability in human lymphocytes// *Radiat. Res.* – 2008. – Vol. 170(2). – P. 224–234.
89. Kosower N.S., Kosower E.M. The glutathione status of cells//*Internat. Rev. Cytol.* – 1978. – Vol. 54. – P. 109–160.
90. Kullik I., Stevens J., Toledano M. B., Storz G. Mutational analysis of the redox-sensitive transcriptional regulator OxyR: regions important for DNA binding and multimerization // *J Bacteriol.* – 1995. – Vol. 177(5). – P. 1285–1291.
91. Liochev S.I., Fridovich I. The role of O₂·- in the production of HO·: in vitro and in vivo // *Free Radic. Biol. Med.* – 1994. – Vol. 16(1). – P.29–33.

92. Loewen P.C., Hu B., Strutinsky J., Sparling R. Regulation in the rpoS regulon of *Escherichia coli* // *Can. J. Microbiol.* – 1998. – Vol. 44(8). – P. 707-717.
93. Loewen, P. C., B. L. Triggs. Genetic mapping of katF, a locus that with katE affects the synthesis of a second catalase species in *Escherichia coli* // *J. Bacteriol.* – 1984. – V. 160. – P. 668-675.
94. Lomovskaya O., Kawai F., Matin A. Differential regulation of the *mcb* and *emr* operons of *Escherichia coli*: role of *mcb* in multidrug resistance// *Antimicrob. Agents. Chemother.* – 1996. – Vol.40(4). – P. 1050–1052.
95. Lomovskaya O., Lewis K., Matin A. EmrR is a negative regulator of the *Escherichia coli* multidrug resistance pump EmrAB// *J Bacteriol.* – 1995. – Vol.177(9). – P. 2328–2334.
96. Lozoya E., Sanchez-Pescador R., Covarrubias A., Vichido I., Bolivar F. Tight linkage of genes that encode the two glutamate synthase subunits of *Escherichia coli* K-12//*J Bacteriol.* – 1980. – Vol. 144(2). – P. 616–621.
97. Lu C., Albano C.R., Bentley W.E., Rao G. Quantitative and kinetic study of oxidative stress regulons using green fluorescent protein//*Biotechnol Bioeng.* – 2005. – Vol. 89(5). – P. 574–587.
98. Lu P., Ma D., Chen Y., Guo Y., Chen G.-Q., Deng H., et al. L-glutamine provides acid resistance for *Escherichia coli* through enzymatic release of ammonia// *Cell Res.* – 2013. – Vol. 23(5). – P. 635–644.
99. Luo S., Kim G., Levine R.L. Mutation of the adenylylated tyrosine of glutamine synthetase alters its catalytic properties// *Biochemistry.* – 2005. – Vol. 44(27). – P. 9441–9446.
100. Lushchak VI. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals// *Aquat Toxicol.* – 2011. – Vol. 101(1). – P. 13–30.
101. Macomber L., Imlay J. A. The iron-sulfur clusters of dehydratases are primary intracellular targets of copper toxicity// *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2009. – Vol.106(20). – P. 8344–8349.

102. Macomber L., Rensing C., Imlay J.A. Intracellular copper does not catalyze the formation of oxidative DNA damage in *Escherichia coli*// *J Bacteriol.* – 2007. – Vol. 189(5). – P. 1616–1626.
103. Mantsala P., Zalkin H. Active subunits of *Escherichia coli* glutamate synthase//*J Bacteriol.* – 1976. – Vol. 126(1). – P. 539–541.
104. Mecke D., Wulff K., Liess K., Holzer H. Characterization of a glutamine synthetase inactivating enzyme from *Escherichia coli* // *Biochem Biophys Res Commun.* . – 1966. – Vol. 24(3). – P. 452–458.
105. Meister A., Anderson M.E. Glutathione // *Ann. Rev. Biochem.* – 1983. – Vol. 52. – P. 711–760.
106. Melamed S., Lalush C., Elad T., Kroll S. Y., Belkin S., Pedahzur R. A bacterial reporter panel for the detection and classification of antibiotic substances// *Microb. Biotechnol.* – 2012. – Vol. 5(4). – P. 536–548.
107. Meury J., Kepes A. Glutathione and the gated potassium channels of *Escherichia coli*// *EMBO J.* – 1982. – Vol. 1(3). – P. 339–343.
108. Michan C., Manchado M., Dorado G., Pueyo C. In vivo transcription of the *Escherichia coli* *oxyR* regulon as a function of growth phase and in response to oxidative stress// *J. Bacteriol.* – 1999. – Vol. 181(9). – P. 2759–2764.
109. Miller P. F., Sulavik M.C. Overlaps and parallels in the regulation of intrinsic multiple-antibiotic resistance in *Escherichia coli*// *Mol. Microbiol.* – 1996. – Vol.21(3). – P. 441–448.
110. Miller R.E., Stadtman E.R. Glutamate synthase from *Escherichia coli*. An iron-sulfide flavoprotein// *J Biol Chem.* – 1972. – Vol. 247(22). – P. 7407–7419.
111. Morona R., Manning P.A., Reeves P. Identification and characterization of the TolC protein, an outer membrane protein from *Escherichia coli*// *J Bacteriol.* – 1983. – Vol.153(2). – P. 693–699.
112. Mura U., Stadtman E.R. Glutamine synthetase adenylylation in permeabilized cells of *Escherichia coli*// *J Biol Chem.* – 1981. – Vol. 256(24). – P. 13014–13021.

113. Nelson D. L., Cox M. M. Principles of Biochemistry// 5th. San Francisco.CA: Freeman. – 2008.
114. Nies D. H. Microbial heavy-metal resistance// Appl. Microbiol. Biotechnol. – 1999. – Vol. 51(6). – P. 730–750.
115. Nunoshiba T., DeRojas-Walker T., Tannenbaum S. R., Demple B. Roles of nitric oxide in inducible resistance of Escherichia coli to activated murine macrophages // Infect. Immun. – 1995. – Vol. 63(3). – P. 794–798.
116. Oh S.J., Kim S.-H., Ji Y. B., Jeong K., Park Y., Yang J. et al. Study of freshly excised brain tissues using terahertz imaging// Biomed Opt Express. – 2014. – Vol. 5(8). – P. 2837–2842.
117. Ostrovskiy, N.V. Nikituk, C.M. ; Kirichuk, V.F. ; Krenitskiy, A.P. ; Majborodin, A.V. ; Tupikin, V.D. et al., Application of the terahertz waves in therapy of burn wounds// Infrared and Millimeter Waves and 13th International Conference on Terahertz Electronics 2005. IRMMW-THz 2005. The Joint 30th International Conference on. – 2005. – Vol. 1. – P. 301–302.
118. Outten F.W., Huffman D.L., Hale J.A., O'Halloran T.V. The independent cue and cus systems confer copper tolerance during aerobic and anaerobic growth in Escherichia coli// J Biol Chem. – 2001. – Vol. 276(33). – P. 30670–30677.
119. Outten F.W., Outten C.E., Hale J., O'Halloran T.V. Transcriptional activation of an Escherichia coli copper efflux regulon by the chromosomal MerR homologue, cueR// J Biol Chem. – 2000. – Vol. 275(40). – P. 31024–31029.
120. Owens R. A., Hartman P. E. Glutathione: a protective agent in Salmonella typhimurium — and Escherichia coli as measured by mutagenicity and by growth delay assays // Environ. Mutagen. – 1986. – Vol. 8(5). – P. 659–673.
121. Pahel G., Tyler B. A new glnA-linked regulatory gene for glutamine synthetase in Escherichia coli// Proc Natl Acad Sci U S A. – 1979. – Vol. 76(9). – P. 4544–4548.

122. Pakhomov AG1, Akyel Y, Pakhomova ON, Stuck BE, Murphy MR. Current state and implications of research on biological effects of millimeter waves: a review of the literature. *Bioelectromagnetics*. – 1998. – Vol. 19(7). – P. 393–413.
123. Park S., Imlay J.A. High levels of intracellular cysteine promote oxidative DNA damage by driving the Fenton reaction// *J. Bacteriol.* – 2003. – Vol.185(6). – P.1942–1950.
124. Park S., You X., Imlay J.A. Substantial DNA damage from submicromolar intracellular hydrogen peroxide detected in Hpx- mutants in *Escherichia coli*// *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2005. – Vol. 102(26). – P. 9317–9322.
125. Pavarino E. C., Russo A., Livia A., Galbiatti S., Almeida W. P., Bertollo E. M. G. Glutathione: biosynthesis and mechanism of action// *Glutathione: Biochemistry, Mechanisms of Action and Biotechnological Implications*, 2013, Chapter 1. – P. 1 –11. – режим доступа – https://www.novapublishers.com/catalog/product_info.php?products_id=38495
126. Pena M.M., Lee J., Thiele D.J. A delicate balance: homeostatic control of copper uptake and distribution// *J Nutr.* – 1999. – Vol. 129(7). – P. 1251–1260.
127. Peng S. Influence of submillimeter laser radiation on the growth of black beans//*Applied Laser*. – 1987. – Vol. 7(33). – P. 169.
128. Perron C. Y., Vieira J., Messing J. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors//*Gene*. – 1985. – Vol. 33(1). – P. 103–119.
129. Petersen C., Moller L.B. Control of copper homeostasis in *Escherichia coli* by a P-type ATPase, CopA, and a MerR-like transcriptional activator, CopR// *Gene*. – 2000. – Vol. 261(2). – P. 289–298.
130. Pomposiello P. J., Demple B. Redox-operated genetic switches: the SoxR and OxyR transcription factors // *TRENDS in Biotechnology*. – 2001. – V. 19. – №.3. – P. 109-114.
131. Putman M., van Veen H.W., Konings W.N. Molecular properties of bacterial multidrug transporters// *Microbiol Mol Biol Rev.* – 2000. – Vol.64(4). – P. 672–693.

132. Ramseier T. M., Bledig S., Michotey V., Feghali R., Saier M. H. The global regulatory protein FruR modulates the direction of carbon flow in *Escherichia coli*// *Mol. Microbiol.* – 1995. – V. 16(6). – P. 1157-1169.
133. Ramundo-Orlando A., Gallerano G.P., Stano P., Doria A., Giovenale E., Messina G., et. al. Permeability changes induced by 130 GHz pulsed radiation on cationic liposomes loaded with carbonic anhydrase// *Bioelectromagnetics.* – 2007. – Vol. 28(8). – P. 587–598.
134. Reiter G. F., Kolesnikov A. I., Paddison S. J., Platzman P. M., Moravsky A. P., Adams M. A., Mayers J. Evidence for an anomalous quantum state of protons in nanoconfined water// *Phys. Rev. B* – 2012. – <http://dx.doi.org/10.1103/>
135. Rensing C., Ghosh M., Rosen B. Families of soft-metal-ion-transporting ATPases// *J. Bacteriol.* – 1999. – V. 181(9). – P. 5891-5897.
136. Rhee S.G., Chock P.B., Stadtman E.R. Regulation of *Escherichia coli* glutamine synthetase// *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol.* – 1989. – Vol. 62. – P. 37–92.
137. Riether K. B., Dollard M. A., Billard P. Assessment of heavy metal bioavailability using *Escherichia coli* zntAp::lux and copAp::lux-based biosensors// *Appl Microbiol Biotechnol.* – 2001. – V. 57(5-6). – P. 712-716.
138. Riether K.B., Dollard M.A., Billard P. Assessment of heavy metal bioavailability using *Escherichia coli* zntAp::lux and copAp::lux-based biosensors// *Appl Microbiol Biotechnol.* – 2001. – Vol. 57(5-6). – P. 712–716.
139. Rogers J. K., Guzman C. D., Taylor N. D., Raman S., Anderson K., Church G. M. Synthetic biosensors for precise gene control and real-time monitoring of metabolites// *Nucleic Acids Research Advance Access.* – 2015. – DOI: 10.1093/nar/gkv616.
140. Rowley D.A., Halliwell B. Superoxide-dependent formation of hydroxyl radicals from NADH and NADPH in the presence of iron salts // *FEBS Lett.* – 1982. – Vol.142(1). – P. 39–41.

141. Saier M. H. Cyclic AMP-independent catabolite repression in bacteria// *FEMS Microbiol. Lett.* – 1996. – V. 138(2-3). – P. 97-103.
142. Saier M. H., Ramseier T. M. The catabolite repressor/activator (Cra) protein of enteric bacteria// *J. Bacteriol.* – 1996. – V. 178(12). – P. 3411-3417.
143. Sakamoto A., Terui Y., Yoshida T., Yamamoto T., Suzuki H., Yamamoto K., et al. Three members of polyamine modulon under oxidative stress conditions: two transcription factors (SoxR and EmrR) and a glutathione synthetic enzyme (GshA)// *PLoS One.* – 2015. – Vol.10(4). – DOI: 10.1371/journal.pone.0124883.
144. Salmon K., Hung S. P., Mekjian K., Baldi P., Hatfield G. W., Gunsalus R. P. Global gene expression profiling in *Escherichia coli* K12. The effects of oxygen availability and FNR.// *Biol Chem* – 2003. – V. 278(32). – P. 29837-29855.
145. Sambrook J., Russel D.W. *Molecular Cloning a laboratory manual* // CSHL Press, 2001.
146. Schirmer R.H., Krauth-Siegel R.L., Schultz G.E. *Glutathione reductase* // *Coenzymes and Cofactors.* – 1989. – Vol. IIIA – P. 553–596.
147. Schüz J., Ahlbom A. Exposure to electromagnetic fields and the risk of childhood leukaemia: a review// *Rad. Prot. Dosimetry,* – 2008. – Vol. 132(2). – P. 202–211.
148. Seoane A. S., Levy S.B. Characterization of MarR, the repressor of the multiple antibiotic resistance (mar) operon in *Escherichia coli*// *J Bacteriol.* – 1995. – Vol.177(12). – P. 3414–3419.
149. Shimomura O., Johnson Fh., Saiga Y. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*// *J Cell. Comp. Physiol.* – 1962. – V. 59. – P. 223-239.
150. Sim Y.C., Park J.Y., Ahn K.-M., Park C., Son J.-H. Terahertz imaging of excised oral cancer at frozen temperature// *Biomed Opt Express.* – 2013. – Vol. 4(8). – P. 1413–1421.

151. Stadtman E.R. Discovery of glutamine synthetase cascade// *Methods Enzymol.* – 1990. – Vol. 182. – P. 793–809.
152. Stadtman E.R., Shapiro B. M., Kingdon H.S., Woolfolk C.A., Hubbard J.S. Cellular regulation of glutamine synthetase activity in *Escherichia coli*// *Adv Enzyme Regul.* – 1968. – Vol. 6. – P. 257–289.
153. Storz G., Tartaglia L. A., Ames B. N. Transcriptional regulator of oxidative stress-inducible genes: direct activation by oxidation // *Science.* – 1990. – Vol. 248(4952). – P. 189–194.
154. Stoyanov J. V., Magnani D., Solioz M. Measurement of cytoplasmic copper, silver, and gold with a lux biosensor shows copper and silver, but not gold, efflux by the CopA ATPase of *Escherichia coli*// *FEBS Lett.* – 2003. – V. 546(2-3). – P. 391-394.
155. Tao K. In vivo oxidation-reduction kinetics of OxyR, the transcriptional activator for an oxidative stress-inducible regulon in *Escherichia coli*// *FEBS Lett.* – 1999. – Vol. 457(1). – P. 90–92.
156. Tao K., Fujita N., Ishihama A. Involvement of the RNA polymerase alpha subunit C-terminal region in co-operative interaction and transcriptional activation with OxyR protein // *Mol. Microbiol.* – 1993. – Vol. 7(6). – P. 859– 864.
157. Tauriainen S., Karp M., Chang W., Virta M. Luminescent bacterial sensor for cadmium and lead// *Biosens. Bioelectron.* – 1998. – Vol. 13(9). – P. 931–938.
158. Thieme D., Neubauer P., Nies D.H., Grass G. Sandwich hybridization assay for sensitive detection of dynamic changes in mRNA transcript levels in crude *Escherichia coli* cell extracts in response to copper ions// *Appl Environ Microbiol.* – 2008. – Vol. 74(24). – P. 7463–7470.
159. Thomas C., Mackey M.M., Diaz A.A., Cox D.P. Hydroxyl radical is produced via the Fenton reaction in submitochondrial particles under oxidative stress: implications for diseases associated with iron accumulation// *Redox Rep.* – 2009. – Vol. 14(3). – P. 102–108.

160. Tian Z. X., Li Q. S., Buck M., Kolb A., Wang Y. P. The CRP-cAMP complex and downregulation of the *glnAp2* promoter provides a novel regulatory linkage between carbon metabolism and nitrogen assimilation in *Escherichia coli*// *Mol Microbiol.* – 2001. – V. 41(4). – P. 911-924.
161. Titova L.V., Ayesheshim A.K., Golubov A., Rodriguez-Juarez R., Woycicki R., Hegmann F.A. et. al. Intense THz pulses down regulate genes associated with skin cancer and psoriasis: a new therapeutic avenue?// *Sci Rep.* – 2013. – Vol. 3. – DOI: 10.1038/srep02363.
162. Toledano M. B., Kullik I., Trinh F., Baird P. T., Schneider T. D., Storz G. Redox-dependent shift of OxyR-DNA contacts along an extended DNA-binding site: a mechanism for differential promoter selection // *Cell.* – 1994. – Vol. 78(5). – P. 897-909.
163. Tsaneva I.R., Weiss B. SoxR, a locus governing a superoxide response regulon in *Escherichia coli* K-12// *J Bacteriol.* – 1990. – V. 172(8). – P. 4197–4205.
164. Uppal S., Shetty D. M., Jawali N. Cyclic AMP receptor protein regulates *cspD*, a bacterial toxin gene, in *Escherichia coli*// *J. Bacteriol.* – 2014. – V. 196(8). – P. 1569-1577.
165. Ward W. W., Bokman S. H. Reversible denaturation of *Aequorea* green-fluorescent protein: physical separation and characterization of the renatured protein// *Biochemistry.* – 1982. – V. 21(19). – P. 4535-4540.
166. Wilmink G. J., Grundt J. E. Invited Review Article: Current State of Research on Biological Effects of Terahertz Radiation// *Journal of Infrared, Millimeter, and Terahertz Waves.* – 2011. – Vol. 32(10). – P. 1074–1122.
167. Woodmansee A.N., Imlay J.A. Reduced flavins promote oxidative DNA damage in nonrespiring *Escherichia coli* by delivering electrons to intracellular free iron// *J. Biol. Chem.* – 2002. – V. 277(37). – P. 34055–34066.
168. Wu J., Dunham W. R., Weiss B.. Overproduction and physical characterization of SoxR, a [2Fe–2S] protein that governs an oxidative response

regulon in *Escherichia coli* // *J. Biol. Chem.* – 1995. – Vol. 270(17). – P. 10323–10327.

169. Xiong A., Gottman A., Park C., Baetens M., Pandza S., Martin A. The EmrR protein represses the *Escherichia coli* emrRAB multidrug resistance operon by directly binding to its promoter region// *Antimicrob Agents Chemother.* – 2000. – Vol.44(10). – P. 2905–2907.

170. Xiong, S., Shaomin P. Influence of submillimeter laser radiation on the growth of paddy rice// *Applied Laser.* – 1986. – Vol. 6(33).

171. Xu M., Xiong S. FIR laser irradiation in wheat// *Applied infrared and optoelectronics.* – 1988. – Vol. 4. – P. 30.

172. Yamamoto K., Ishihama A. Transcriptional response of *Escherichia coli* to external copper// *Mol Microbiol.* – 2005. – Vol. 56(1). – P. 215–227.

173. Yoshida M., Kashiwagi K., Shigemasa A., Taniguchi S., Yamamoto K., Makinoshima H, et al., A unifying model for the role of polyamines in bacterial cell growth, the polyamine modulo// *J Biol Chem.* – 2004. – Vol.279(44). – P. 46008–46013.

174. Youvan D. C., Michel-Beyerle M. E. Structure and fluorescence mechanism of GFP//*Nat. Biotechnol.* – 1996. – V. 14(10). – P. 1219-1220.

175. Zeni O., Gallerano G.P., Perrotta A., Romanò M., Sannino A., Sarti M., D'Arienzo M., Doria A., Giovenale E., Lai A., Messina G., Scarfi M. R. Cytogenetic observations in human peripheral blood leukocytes following in vitro exposure to THz radiation: a pilot study// *Health Phys.* – 2007. – V. 92(4). – P. 349-357.

176. Zhang A., Altuvia S., Tiwari A., Argaman L., Hengge-Aronis R., Storz G.. The OxyS regulatory RNA represses rpoS translation and binds the Hfq (HF-I) protein // *EMBO J.* – 1998. – V. 17(20). – P. 6061–6068.

177. Zhang X.C., Xu J. *Introduction to THz Wave Photonics.* – Springer, 2010 – 246 p.

178. Zhang Z., Aboulwafa M., Saier M.H. Regulation of *crp* gene expression by the catabolite repressor/activator, Cra, in *Escherichia coli*// J. Mol. Microbiol. Biotechnol. – 2014. – Vol.24(3). – P. 135-141.

179. Zheng M., Doan B., Schneider T. D., Storz G. OxyR and SoxRS regulation of *fur* // J Bacteriol. – 1999. – V. 181(15). – P. 4639–4643.

180. Zheng M., Wang X., Templeton L.J., Smulski D.R., LaRossa R.A., Storz G. DNA microarray-mediated transcriptional profiling of the *Escherichia coli* response to hydrogen peroxide // J. Bacteriol. – 2001. – V. 183(15). – P. 4562-4570.

181. Ангелуц А. А., Балакин А. В., Евдокимов М. Г., Есаулков М. Н., Назаров М. М., Ожередов И. А., Сапожников Д. А., Солянкин П. М., Черкасова О. П., Шкуринов А. П. Характерные отклики биологических и наноразмерных систем в терагерцевом диапазоне частот// Квантовая электроника. – 2014. – V. 44(7). – P. 614-632.

182. Бецкий О. В., Креницкий А.П., Майбородин А.В., Тупикин В.Д. Биофизические эффекты волн терагерцового диапазона и перспективы развития новых направлений в биомедицинской технологии: «Терагерцовая терапия» и «Терагерцовая диагностика»// Биомедицинская радиоэлектроника – 2003. – №12. – С. 3–6.

183. Бецкий О.В, Лебедева Н.Н. Современные представления о механизмах воздействия низкоинтенсивных миллиметровых волн на биологические объекты// Миллиметровые волны в биологии и медицине. – 2001. – Т. 24(3). – С. 5–19.

184. Бецкий О.В. О механизмах взаимодействия миллиметровых волн низкой интенсивности с биологическими объектами// Изв. ВУЗов Радиофизика. – 1994. – Т. 37(1). – С. 30–41.

185. Бецкий О.В., Девятков Н.Д., Кислов В.В. Миллиметровые волны низкой интенсивности в медицине и биологии// Биомедицинская радиоэлектроника. – 1998. – № 4. – С. 13-29.

186. Бондарь Н.П., Коваленко И.Л., Августинович Д.Ф. и др. Влияние терагерцевых волн на поведение самцов мышей// Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2008. – Т.145(4). – С. 378–382.
187. Гапеев А.Б., Чемерис Н.К. Действие непрерывного и модулированного ЭМИ КВЧ на клетки животных. Обзор. Часть III. Биологические эффекты непрерывного ЭМИ КВЧ.// Вестник новых медицинских технологий. – 2000а. – Т. 7. – С. 20–25.
188. Гапеев А.Б., Чемерис Н.К. Модельный подход к анализу действия модулированного электромагнитного излучения на клетки животных // Биофизика. – 2000б. – Т. 45(2). – С. 299–312.
189. Голант М.Б. Влияние монохроматических электромагнитных излучений миллиметрового диапазона малой мощности на биологические процессы// Биофизика. – 1986. – Т. 31(1). – С. 139–147.
190. Голант М.Б., Брюхова А.К., Реброва Т.Б. Некоторые закономерности действия электромагнитных излучений миллиметрового диапазона на микроорганизмы// В сб. статей (см. "Применение."). – 1985. – С. 157–161.
191. Голант М.Б., Реброва Т.Б. Об аналогии между некоторыми СВЧ системами живых организмов и техническими СВЧ устройствам // Радиоэлектроника. – 1986. - № 10. – С. 10–13.
192. Голант М.Б., Шашлов В.А. К вопросу о механизме возбуждения колебаний в клеточных мембранах слабыми электромагнитными полями // В сб. статей (см. "Применение."). – 1985. – С. 127–131.
193. Девятков Н. Д., Голант М. Б., Бецкий О. В. Миллиметровые волны и их роль в процессах жизнедеятельности. — М.: Радио и связь, 1991.
194. Девятков Н.Д., Бецкий О.В. Особенности взаимодействия миллиметрового излучения низкой интенсивности с биологическими объектами // В сб. статей (см. "Применение ."). – 1985. – С. 6–20.
195. Девятков Н.Д., Бецкий О.В., Завизион В.А., Кудряшова В.А., Хургин Ю.И. Поглощение электромагнитного излучения ММ диапазона длин волн и

отрицательная гидратация в водных растворах мочевины // ДАН СССР. – 1982. – Т. 264(6). – С. 1409–1411.

196. Девятков Н.Д., Бецкий О.В., Ильина С.А., Путвинский А.В. Влияние миллиметрового излучения низкой интенсивности на ионную проницаемость мембран эритроцитов// В сб. статей под ред. Н.Д.Девяткова М. (см. "Эффекты"). М.: ИРЭ АН СССР, 1983а. – С. 78–96.

197. Девятков Н.Д., Голант М.Б. Об информационной сущности нетепловых и некоторых энергетических воздействий электромагнитных колебаний на живой организм// Письма в ЖТФ. – 1982. – Т. 8(1). – С. 39–41.

198. Девятков Н.Д., Голант М.Б., Тагер А.С. Роль синхронизации в воздействии слабых электромагнитных сигналов миллиметрового диапазона волн на живые организмы. // Биофизика. – 1983б. – Т. 28(5). – С. 895–896.

199. Дерффель К. Статистика в аналитической химии//М.:Мир. – 1994. – С. 268.

200. Дрокина Т. В., Попова Л. Ю., Битехтина М. А., Способ определения воздействия электромагнитного излучения с помощью биолюминесценции бактерий// Номер патента: RU 02291196 С1, действует с 21.06.2005. Режим доступа – <http://www.findpatent.ru/patent/229/2291196.html>

201. Дудников. Г.Н., Зайденберг М.А. Стимуляция пролиферации фибробластов при заживлении ран в эксперименте. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 1979. – Т. 88(8). – С. 204–207.

202. Зайцева С.Ю., Донецкая С.В. Применение КВЧ-терапии в клинике кожных болезней под контролем иммунограммы // Сб. докл. 10 российского симпозиума с международным участием «Миллиметровые волны в медицине и биологии», Москва, 1995. – С. 53–54.

203. Зубова Н. Н., Булавина А. Ю., Савицкий А. П. Спектральные и физико химические свойства зеленого (GFP) и красного (DRFP583) флуоресцирующих белков// Успехи биологической химии. – 2003. – Т 43. – С. 163-224.

204. Илларионов В.Е. Медицинские информационно-волновые технологии. –Всероссийский центр медицины катастроф "Защита",1998. – 45 с.
205. Катаев А.А., Александров А.А., Тихонова Л.И., Берестовский Г.Н. Частотнозависимое влияние миллиметровых электромагнитных волн на ионные токи водоросли *Nitellopsis*. Нетепловые эффекты// Биофизика. – 1993. – Т. 38(3). – С. 446–462.
206. Киричук В. Ф., Цымбал А. А., Применение электромагнитных волн терагерцового диапазона для коррекций функций гемостаза// Медицинская техника. – 2010. – Т. 1(259). – С. 12–16.
207. Киричук В.Ф., Андронов Е.В., Ефимова Н.В., Креницкий А.П., Майбородин А.В., Рытик А.П. и др. Влияние терагерцового облучения высокой мощности на агрегационные свойства крови и поведенческие реакции белых крыс// Биомедицинская радиоэлектроника, – 2009. – №12. – С. 66–71.
208. Киричук В.Ф., Великанова Т.С., Иванов А.Н. Гемодинамические изменения под влиянием превентивного режима ТГЧ-облучения на частотах молекулярного спектра излучения и поглощения оксида азота// Фундаментальные исследования. – 2011в. – № 3. – С. 77–82.
209. Киричук В.Ф., Иванов А.Н., Великанова Т.С. и др. Влияние ингибитора NO-синтазы L-NAME и облучения электромагнитными волнами терагерцового диапазона на частотах молекулярного спектра излучения и поглощения оксида азота 150,176 – 150,664 ГГц на системную гемодинамику крыс-самцов, подвергнутых острому иммобилизационному стрессу//Биомедицинская радиоэлектроника. – 2011г. – №1. – С. 19–24.
210. Киричук В.Ф., Иванов А.Н., Кириязи Т.С. Восстановление микроциркуляторных нарушений электромагнитным излучением терагерцового диапазона на частотах оксида азота у белых крыс при остром стрессе//Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2011а. – Т. 151(3) – С. 259–262.

211. Киричук В.Ф., Иванов А.Н., Кириязи Т.С. Изменение периферической перфузии у белых крыс в состоянии острого иммобилизационного стресса под влиянием электромагнитных волн терагерцового диапазона на частотах оксида азота// *Фундаментальные исследования*. – 2011б. – № 5. – С. 78–83.
212. Киричук В.Ф., Креницкий А.П., Майбородин А.В., Тупикин В.Д., Рытик А.П., Бецкий О.В. КВЧ-индуцированное взаимодействие в системе форменных элементов крови // *Миллиметровые волны в биологии и медицине*. 2004. №1(33). с.34-39.
213. Кудряшова В.А., Завизион В.А., Бецкий О.В. Особенности взаимодействия КВЧ-излучения с водой и водными растворами//*Биомедицинская радиоэлектроника*. – 1999. – № 1. – С. 13–14.
214. М. В. Царев. Генерация и регистрация терагерцового излучения ультракороткими лазерными импульсами: Учеб. пособие. – Нижний Новгород: Нижегородский госуниверситет, 2011. – 75 с.
215. Майская В. Освоение терагерцовой щели. Полупроводниковые приборы вторгаются в субмиллиметровый диапазон// *Электроника: Наука, Технология, Бизнес*. – 2011. – №8. – Р. 74–87.
216. Назаров М.М., Шкуринов А.П., Кулешов Е.А., Тучин В.В.. Терагерцовая импульсная спектроскопия биологических тканей // *Квантовая электроника*. – 2008. – Т. 38 (7). – С. 647–654.
217. Паршина С.С., Афанасьева Т.Н., Головачева Т.Н., Водолагин А.В., Токаева Л.К., Долгова Е.М. и др. Терагерцовая терапия на частотах молекулярного спектра оксида азота: различие эффектов у больных стабильной и нестабильной стенокардией// *Бюллетень медицинских Интернет конференций*. – 2012. – Т. 2. (6). – С. 391.
218. Плетнев С. Д., Корочкин И. М., Голант М. Б. и др. Инструкция по применению терапевтической установки для лечения облучением миллиметрового диапазона длин волн нетепловой интенсивности «Явь-1»// *Комитет по новой медицинской технике. Протокол № 6 от 13.06.1987 г.* – М.: Минздрав СССР. – 1987.

219. Пославский М. В., Корочкин И. М., Голант М. Б. и др. Применение электромагнитных волн миллиметрового диапазона для лечения и профилактики ЯБЖ и ДПК. Методические рекомендации. – М.: Минздрав РСФСР. –1989.
220. Рачеев Д. А. Изучение эволюции регуляторных систем прокариот методами сравнительно-геномного анализа: Дис. канд. биол. наук. Москва. 2009. - 57 с.
221. Ситько С.П., Андреев Е. А., Белый М.У. Проявление собственных характеристических частот человеческого организма// ДАН УССР. – Сер. Б. – 1984. – № 10. – С. 60–63.
222. Смирнова Г.В., Октябрьский О.Н. Глутатион у бактерий//Биохимия. – 2005. – Vol. 70(11). – P. 1459–1473.
223. Смирнова Г. В. Роль глутатиона и других антиоксидантных систем при стрессах у *Escherichia Coli*: Дисс. д-ра биологических наук. – Пермь, 2005. – 399 с.
224. Усанов Д. А., Креницкий А. П., Майбородин А. В., Усанов А. Д., Рытик А. П. Воздействие излучения терагерцового диапазона частот на функциональное состояние дафнии // Биомедицинские технологии и радиоэлектроника. 2005. №8. с. 54-58.
225. Усанов Д. А., Шишкин Г. Г., Скрипаль А. В., Панасенко В. И., Усанов А. Д. Дафния как биоиндикатор электромагнитных воздействий на водную среду // Петербургский журнал электроники. 2002. № 4. с. 38-42.
226. Усанов Д. А., Шишкин Г. Г., Скрипаль А. В., Усанов А. Д. Воздействие переменных магнитных полей низкой интенсивности на частоту сердцебиений дафнии // Биомедицинские технологии и радиоэлектроника. 2003. №3. с.59-62.
227. Федоров В. И., Вайсман Н. Я., Немова Е. Ф., Мамрашев А. А., Николаев Н. А. Отдаленные результаты влияния терагерцового излучения на стрессированных самок дрозофил// Бюллетень медицинских интернет-конференций. – 2012. – Т.2(6). – С. 431–433.

228. Чубей М.Я. Возможности КВЧ-терапии в комплексном лечении доброкачественных и злокачественных опухолей матки // Международный симпозиум «Миллиметровые волны нетпловой интенсивности в медицине». – Москва, 1991. Ч. 1. – С. 49– 53.

ПРИЛОЖЕНИЯ

*Приложение 1: нуклеотидные последовательности с сайтами связывания ТФ промоторных областей генов *copA* и *glnA*, использованные при создании геносенсорных конструкций *pCopA-GFP* и *pGlnA-GFP*.*

1. Нуклеотидная последовательность промотора гена *copA* (-297...-1)

(<http://ecocyc.org/ECOLI/sequence-delimited?chromosome=COLI-K12&object=G6260&up=297&down=0&right=510900&left=508099&type=true>)

```
ATCCAAC TGCC TGCTGTAATT TGTTTGCATC TAACATCTTT TGTTAACTCC TTTTATAGAG
TGCGGGAGGT AATTCCTCAC CCCGGTGCCG ATTTTCAGGC ATCCTGATTT AACTTAGCAC
CCGCAACTTA АСТАСАGGAA AACAAAAGAGA TAAATGTCTA ATCCTGATGC AAATCGAGCC
GATTTTTTAA TCTTTACGGA CTTTACCCG CCTGGTTTAT TAATTTCTTG ACSTCCSCT
TGCTGGAAGG TTTAACSTTT ATCACAGCCA GTCAAAAC TG TCTTAAAGGA GTGTTTT
```

GCTGGAAGGTTTAAACC – гипотетический сайт связывания ТФ FruR (-41...-56)
[Рачев Д. А., 2009]

Сайты связывания регуляторных ТФ в промоторной области гена *copA*

(<http://ecocyc.org/gene?orgid=ECOLI&id=G6260#tab=showAll>)



Положение сайтов связывания регуляторных ТФ относительно точки начала транскрипции (*copAp*):

ТФ CueR (-16...-34)

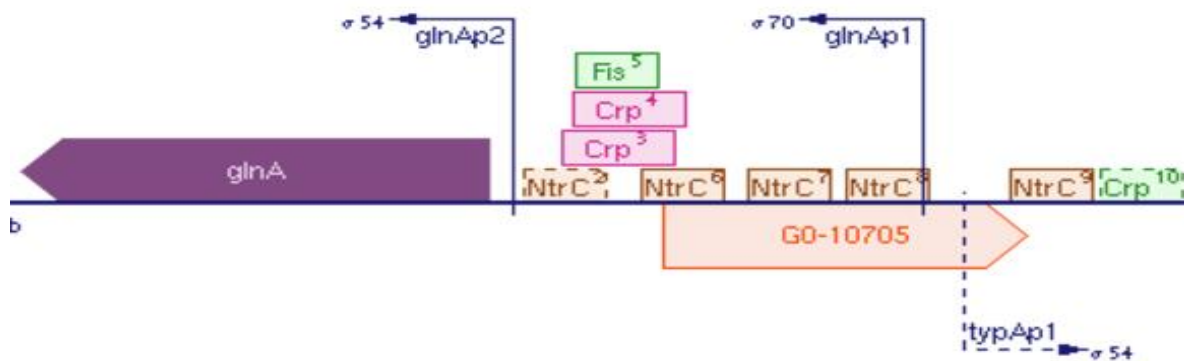
2. Нуклеотидная последовательность промотора гена *glnA* (-362...+105)

(<http://ecocyc.org/ECOLI/sequence-delimited?chromosome=COLI-K12&object=EG10383&up=362&down=0&right=4056419&left=4054648&type=true>)

```
CAGGCATTAG AAATAGCGCG TTATTGTACA CGGATTAATC GCACTACAAA ACAGGATCAC
AAACATCCTC CGCAAACAAG TATTGCAGAG TCCSTTTGTG ATCGCTTTCA CGGAGCATAA
AAAGGGTTAT CCAAAGGTCA TTGCACCAAC ATGGTGCTTA ATGTTTCCAT TGAAGCACTA
TATTGGTGCA ACATTCACAT CGTGGTGAGC CCSTTTTGCA CGATGGTGCG CATGATAACG
CSTTTTAGGG GCAATTTAAA AGTTGGCACA GATTTTCGCTT TATCTTTTTT ACGGCGACAC
GGCCAAAATA ATTGCAGATT TCGTTACCAC GACGACCATG ACCAATCCAG GAGAGTTAAA
GTatgTCCGC TGAACACGTA CTGACGATGC TGAACGAGCA CGAAGTGAAG TTTGTTGATT
TGCGCTTCAC CGATACTAAA GGTAAGAAGC AGCACGTAC TATCCCT
```

Сайты связывания регуляторных ТФ в промоторной области гена *glnA*

(<http://ecocyc.org/gene?orgid=ECOLI&id=EG10383#tab=showAll>)



Положение сайтов связывания регуляторных ТФ относительно точки начала транскрипции (*glnAp*):

ТФ Fis (-48...-62) для *glnAp1*;

ТФ Crp в качестве репрессора (-47...-68), (-45...-66) для *glnAp1*;

ТФ Crp в качестве активатора (-61...-82) для *glnAp2*;

ТФ NtrC в качестве репрессора (79...63), (56...40), (35...19), (16...-1), (-17...-33) для *glnAp2*;

ТФ NtrC в качестве активатора (-37...-53), (-60...-76), (-81...-97), (-100...-116), (-132...-148) для *glnAp1*.

Приложение 2: Статистическая обработка результатов с применением метода линейной регрессии и последующей оценки с использованием *t*-критерия Стьюдента.

Эксперимент, краткое описание	Образцы	$B \pm \text{Error}$	Значение <i>T</i> -критерия Стьюдента
1. Рисунок 26, А (1) <i>E. coli/pKatG-GFP</i> , 130 мкм	Отрицательный контроль	12,00643 ± 0,53829	p < 0,05; n = 15
	Опыт	41,23071 ± 1,5329	
2. Рисунок 26, Б (1) <i>E. coli/pKatG-GFP</i> , 150 мкм	Отрицательный контроль	6,59396 ± 0,4512	p < 0,05; n = 22
	Опыт	30,62936 ± 1,66047	
3. Рисунок 26, В (1)** <i>E. coli/pKatG-GFP</i> , 200 мкм	Отрицательный контроль	0,0151 ± 0,000642284	p < 0,05; n = 27
	Опыт	0,03474 ± 0,00174	
4. Рисунок 27, А <i>E. coli/pKatG-GFP</i> , 5 минут	Отрицательный контроль	7,41324 ± 0,72614	p > 0,05; n = 16
	Опыт	8,32868 ± 0,74852	
5. Рисунок 27, А <i>E. coli/pKatG-GFP</i> , 10 минут	Отрицательный контроль	7,41324 ± 0,72614	p > 0,05; n = 16
	Опыт	9,94353 ± 0,98323	
6. Рисунок 27, А <i>E. coli/pKatG-GFP</i> , 15 минут	Отрицательный контроль	7,41324 ± 0,72614	p < 0,05; n = 16
	Опыт	20,90515 ± 1,50529	
7. Рисунок 27, Б <i>E. coli/pKatG-GFP</i> , 5 минут	Отрицательный контроль	10,76422 ± 1,00573	p > 0,05; n = 17
	Опыт	11,45 ± 0,86851	
8. Рисунок 27, Б <i>E. coli/pKatG-GFP</i> , 10 минут	Отрицательный контроль	10,76422 ± 1,00573	p > 0,05; n = 17
	Опыт	10,32745 ± 0,56158	
9. Рисунок 27, Б <i>E. coli/pKatG-GFP</i> , 15 минут	Отрицательный контроль	10,76422 ± 1,00573	p < 0,05; n = 17
	Опыт	37,69853 ± 1,79667	
10. Рисунок 32 <i>E. coli/pKatG-GFP</i> , облученная среда М9	Отрицательный контроль	2,5 ± 0,35231	p < 0,05; n = 10
	Опыт	7,3 ± 0,26074	
11. Рисунок 32 <i>E. coli/pKatG-GFP</i> , облученные клетки	Отрицательный контроль	0,48545 ± 0,14354	p > 0,05; n = 10
	Опыт	0,20667 ± 0,1974	
12. Рисунок 34, А <i>E. coli/pCopA-GFP</i> , облученная среда ГГМ	Отрицательный контроль	3,79182 ± 0,30251	p < 0,05; n = 11
	Опыт	26,46818 ± 0,91556	

13. Рисунок 34, Б <i>E. coli/pKatG-GFP</i> , облученная среда ГГМ	Отрицательный контроль	$5,5368 \pm 0,59529$	$p < 0,05$; n = 11
	Опыт	$22,89909 \pm 1,37745$	
14. Рисунок 35 <i>E. coli/pCopA-GFP</i> , облученная среда М9	Отрицательный контроль	$3,2995 \pm 0,61285$	$p < 0,05$; n = 11
	Опыт	$8,12682 \pm 0,70919$	
15. Рисунок 36 <i>E. coli/pEmrR-GFP</i> , Облученная среда	Отрицательный контроль	$35,90357 \pm 3,07612$	$p > 0,05$; n = 8
	Опыт	$33,95595 \pm 3,83274$	
16. Рисунок 37 <i>E. coli/pKatG-GFP</i>	Отрицательный контроль	$2,65648 \pm 0,22413$	$p > 0,05$; n = 14
	Опыт 1*+49	$2,55835 \pm 0,2367$	$p > 0,05$; n = 14
	Опыт 10*+40	$2,59527 \pm 0,16459$	
	Опыт 20*+30	$4,06945 \pm 0,38519$	$p < 0,05$; n = 14
	Опыт 30*+20	$6,95527 \pm 0,44112$	$p < 0,05$; n = 14
	Опыт 40*+10	$7,98363 \pm 0,51429$	$p < 0,05$; n = 14
17. Рисунок 38, А <i>E. coli/pKatG-GFP</i>	Отрицательный контроль	$1,89583 \pm 0,35547$	$p < 0,05$; n = 9
	Опыт 180 минут	$6,83917 \pm 1,08388$	$p < 0,05$; n = 9
	Опыт 220 минут	$7,35583 \pm 0,73007$	
	Опыт 260 минут	$8,49083 \pm 1,06733$	$p < 0,05$; n = 9
	Опыт 300 минут	$7,8025 \pm 0,82949$	$p < 0,05$; n = 9
18. Рисунок 38, Б <i>E. coli/pKatG-GFP</i>	Отрицательный контроль	$4,58222 \pm 0,87344$	$p < 0,05$; n = 9
	Опыт 20 часов	$9,41111 \pm 1,33617$	
19. Рисунок 39, А <i>E. coli/pKatG-GFP</i>	Отрицательный контроль	$2,62168 \pm 0,55705$	$p > 0,05$; n = 12
	Опыт М9 на основе облученной H ₂ O	$2,61941 \pm 0,3479$	
	Опыт М9 на основе облученной М9 x10	$1,75944 \pm 0,40586$	$p > 0,05$; n = 12
	Опыт М9 облученная без органики	$1,92325 \pm 0,26914$	$p > 0,05$; n = 12
20. Рисунок 39, Б <i>E. coli/pKatG-GFP</i>	Отрицательный контроль	$4,59242 \pm 0,57653$	$p < 0,05$; n = 10
	Опыт М9 без глюкозы	$8,6712 \pm 0,58799$	
	Опыт М9 без казаминовых кислот	$11,47515 \pm 0,66424$	$p < 0,05$; n = 10
	Опыт М9 в полном составе	$25,88576 \pm 1,2371$	$p < 0,05$; n = 10
21. Рисунок 40 <i>E. coli/pKatG-GFP</i>	Отрицательный контроль	$1,91593 \pm 0,51353$	$p < 0,05$; n = 14
	Опыт М9 на основе облученной глюкозы с водой	$6,02033 \pm 0,82662$	
	опыт М9 на основе	$4,02451 \pm 0,41634$	$p < 0,05$; n = 14

	облученной глюкозы с буфером		
	опыт М9 на основе облученной глюкозы с хлоридом натрия	$2,97341 \pm 0,36756$	$p > 0,05; n = 14$
22. Рисунок 42 <i>E. coli/pKatG-GFP</i>	Отрицательный контроль	$6,52404 \pm 0,69917$	$p < 0,05; n = 16$
	Опыт 27 ⁰ С	$10,50132 \pm 1,01707$	
	Опыт 30 ⁰ С	$9,5836 \pm 0,91615$	$p < 0,05; n = 16$
	Опыт 35 ⁰ С	$10,86199 \pm 1,17792$	$p < 0,05; n = 16$
	Опыт 45 ⁰ С	$12,93265 \pm 1,45667$	$p < 0,05; n = 16$
23. Рисунок 30 <i>E. coli/pGlnA-GFP</i>	Отрицательный контроль	$5,35278 \pm 0,74177$	$p < 0,05; n = 9$
	Опыт	$18,78444 \pm 1,67322$	
24. Рисунок 33 <i>E. coli/pGlnA-GFP</i> , Облученные клетки	Отрицательный контроль	$3 \pm 0,78033$	$p > 0,05; n = 13$
	Опыт	$3,55275 \pm 0,648$	
25. Рисунок 33 <i>E. coli/pGlnA-GFP</i>	Отрицательный контроль	$3,24341 \pm 0,71466$	$p < 0,05; n = 13$
	Опыт облученная среда М9	$6,83022 \pm 0,95291$	
	Опыт облученная культура клеток	$7,03516 \pm 0,97078$	$p < 0,05; n = 13$