

ФГБУН Федеральный исследовательский центр  
Институт цитологии и генетики СО РАН

ФГБУН Институт лазерной физики СО РАН

# Экспрессия генов *Escherichia coli* в ответ на нетермическое воздействие терагерцового излучения

Доклад по диссертации на соискание учёной степени  
кандидата биологических наук по специальности  
03.01.03 — молекулярная биология

Соискатель:

Сердюков Данил Сергеевич

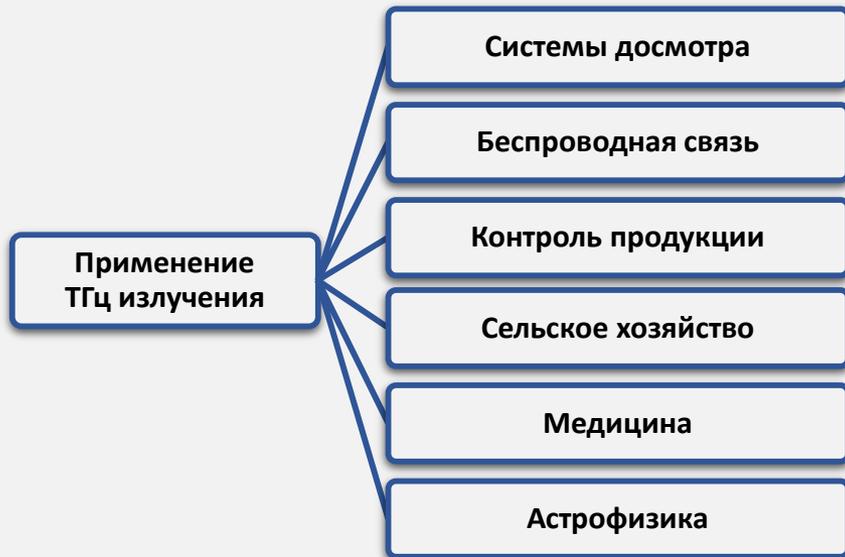
Научные руководители:

канд. биол. наук  
Пельтек Сергей Евгеньевич,  
д-р биол. наук  
Черкасова Ольга Павловна

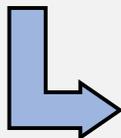
Новосибирск, 2021

# Актуальность темы

**Терагерцовое (ТГц) излучение** — это электромагнитное излучение с частотным диапазоном  $10^{11}$ – $10^{13}$  Гц ( $\lambda = 0,03 - 3$  мм), расположенное на шкале спектра между инфракрасным и микроволновым диапазонами.



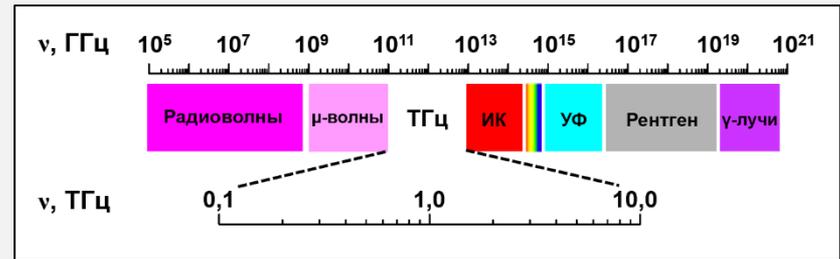
ТГц излучение способно оказывать нетермическое влияние на живые системы, в т. ч. на генетический аппарат.



- количество исследований ограничено
- данные в целом разнородны и неоднозначны
- эффект зависит от многих условий экспозиции и от физиологического состояния объекта

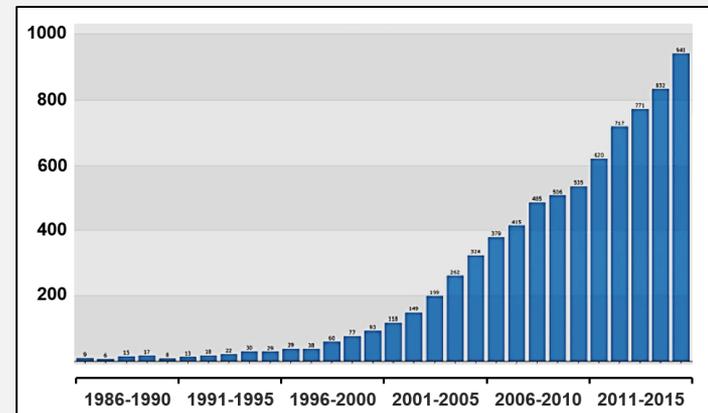
ТГц область на шкале электромагнитных волн

$$1 \text{ ТГц} = 10^{12} \text{ Гц}$$



[Wilmink, 2011]

Количество патентов в мире по ТГц тематике за период 1986–2015 гг.

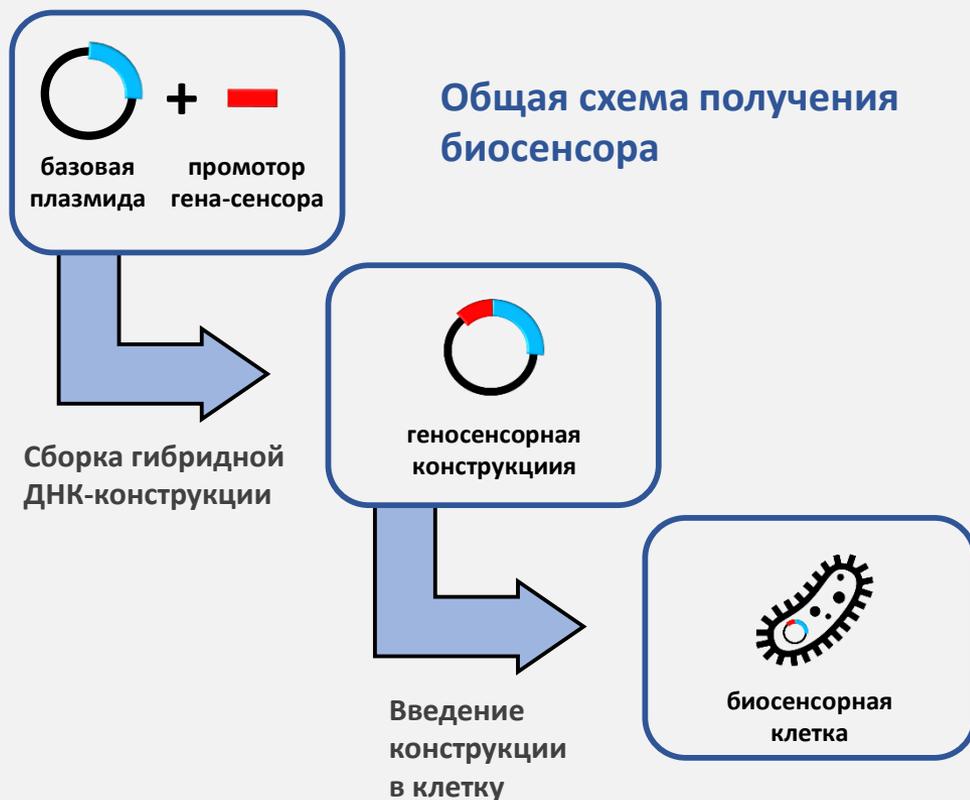


[Усанов, 2017]

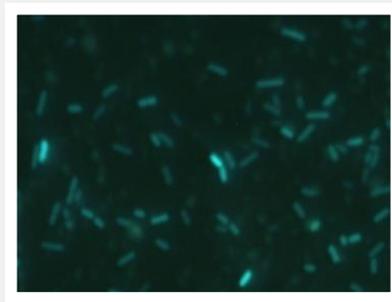
# Флуоресцентные *Escherichia coli* биосенсоры

Это бактерии, несущие геносенсорные плазмидные конструкции, объединяющие в себе два принципиальных генетических элемента:

- **сенсорный** — промотор чувствительного к определённому воздействию гена;
- **репортерный** — структурный ген флуоресцентного белка, контролируемый данным промотором.



Свечение *E. coli* биосенсоров под флуоресцентным микроскопом



[Пельтек, 2013]

Сенсорный промотор — маркер активности определённой генной сети.

Особенности биосенсорной технологии:

- качественный и количественный анализ с использованием различного флуориметрического оборудования;
- прижизненное исследование клеток;
- проведение длительных измерений;
- минимум реагентов.

## Цель:

Создание флуоресцентных *E. coli* биосенсоров и выявление с их помощью изменений функционирования различных генных сетей при нетермическом воздействии ТГц излучения.

## Задачи:

1. Разработать флуоресцентные биосенсоры, сенсорные промоторы которых принадлежат различным генным сетям, чувствительным к ТГц излучению.
2. Исследовать нетермическую ТГц индукцию (флуоресцентную светимость) биосенсоров при воздействии ТГц излучением с различными физическими параметрами.
3. Оценить влияние состава питательной среды и геометрии облучаемой ёмкости на ТГц индукцию биосенсоров.
4. Оценить изменения копийности геносенсорных плазмид и выживаемости биосенсорных клеток в условиях ТГц индукции.
5. Оценить специфичность ТГц индукции биосенсоров — исследовать флуоресцентную светимость клеток при воздействии тепловым шоком и химическим стрессом.

# Общая схема экспериментов

## Базовые плазмиды (Evrogen, Россия):

- pTurboGFP-B;
- pTurboYFP-B.

## Промоторы ТГц-чувствительных генов:

- *PmatA* — формирование биоплёнки;
- *PsafA* — комплексная антистрессовая защита;
- *PchbB* — усвоение хитобиозы и целлобиозы;
- *PtdcR* — метаболизм серина и треонина.



Сенсорные промоторы 4-х генов транскрипционных факторов подобраны по результатам скрининга дифференциальной геной экспрессии [Oshepkov, 2020]

1. Сшивка ПЦР-амплификатов по методу Гибсона.
2. Введение полученных конструкций в клетки *E. coli* штамма JM109 методом электропорации.
3. Верификация конструкций методом ДНК-секвенирования по Сэнгеру.

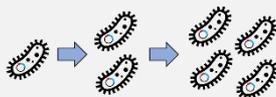
## Биосенсоры:

- *E. coli*/pMatA-TurboGFP;
- *E. coli*/psafA-TurboGFP;
- *E. coli*/pchbB-TurboYFP;
- *E. coli*/ptdcR-TurboYFP.



## Анализ параметров:

- индукция (флуоресценция)
- копияность плазмид
- динамика роста



- ТГц облучение



- тепловой шок
- химический стресс



## Анализ параметров:

- индукция



# Условия основных экспериментов по ТГц облучению

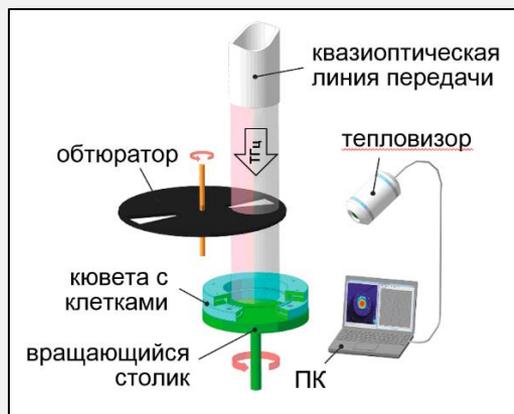


[<https://academcity.org>]

## Новосибирский лазер на свободных электронах (ЛСЭ)



ЦКП «Сибирский центр синхротронного и ТГц излучения»  
Института ядерной физики им. Г.И. Будкера СО РАН

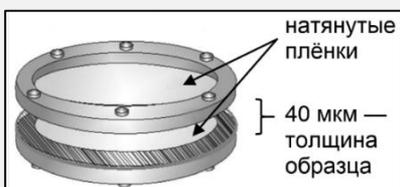


[Serdyukov, 2020]

### Параметры образца:

- жидкая клеточная культура ( $V = 50$  мкл)
- клетки в среде LB (*Lysogeny broth*)
- начало логарифмической фазы роста

### Схема кюветы для облучения



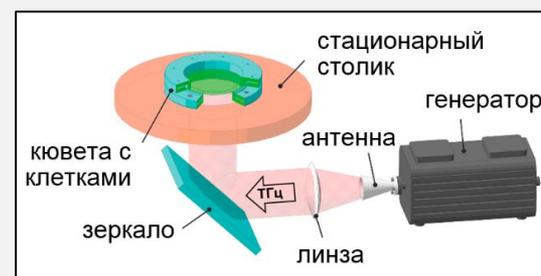
[Demidova, 2013]



[<http://terascan.ru>]

## Диодный генератор серии TeraSense

**N\*** ЦКП «Высокие технологии и наноструктурированные материалы», Новосибирского государственного университета



[Serdyukov, 2020]

Параметр экспозиции	Новосибирский ЛСЭ	Генератор TeraSense
Частота	2,31 ТГц	0,14 ТГц
Средняя интенсивность	~140 мВт/см <sup>2</sup>	2 мВт/см <sup>2</sup>
Режим	импульсный ( $F = 5,6$ МГц, $\tau = 100$ пс)	непрерывный
Температура образца	$36 \pm 1$ °C	26 °C
Время воздействия	15 или 30 мин	

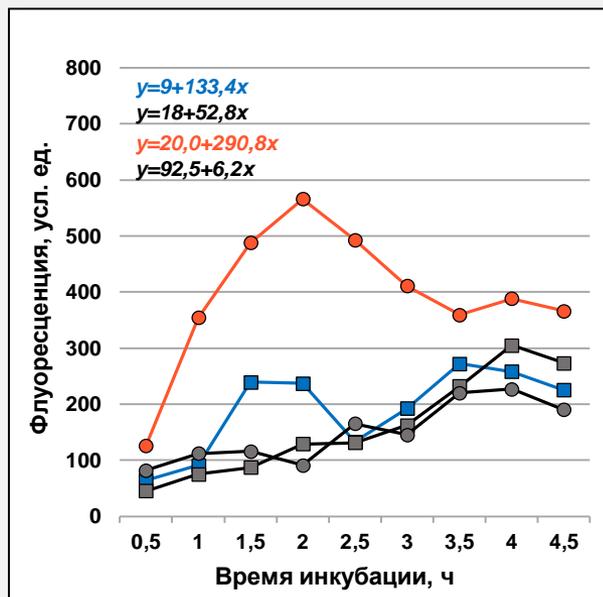
### Параметры анализа:

длительное (до 5 ч) измерение флуоресценции  
при  $\lambda_{\text{возб.}} = 485$  нм,  $\lambda_{\text{эмис.}} = 535$  нм

# Результаты: характерная динамика ТГц индукции биосенсоров

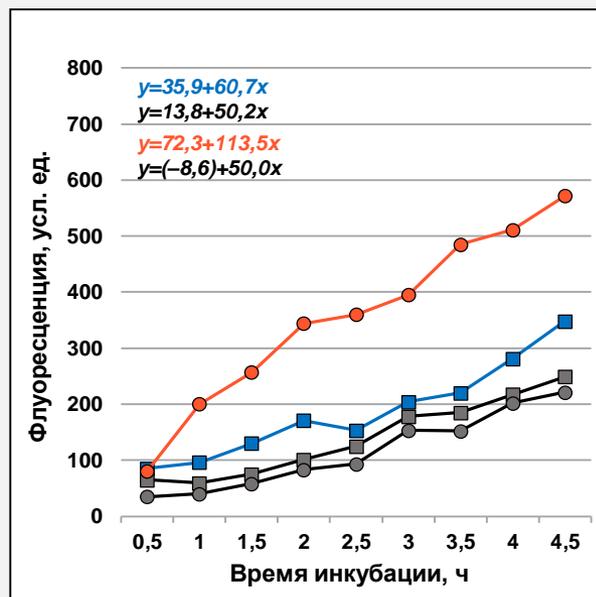
Кривые типичной динамики флуоресценции и соответствующие уравнения линейной регрессии на примере двух биосенсоров, при воздействии ТГц излучением от Новосибирского ЛСЭ (в среде LB в кювете)

Анализ кривых:  $y = a + bx$



**PSaFA** — «купол»

Уравнения регрессии —  
за 2-часовой период инкубации



**PTdCR** — постоянный рост

Уравнения регрессии —  
за 4,5-часовой период инкубации

- облучение 15 мин
- контроль 15 мин
- облучение 30 мин
- контроль 30 мин

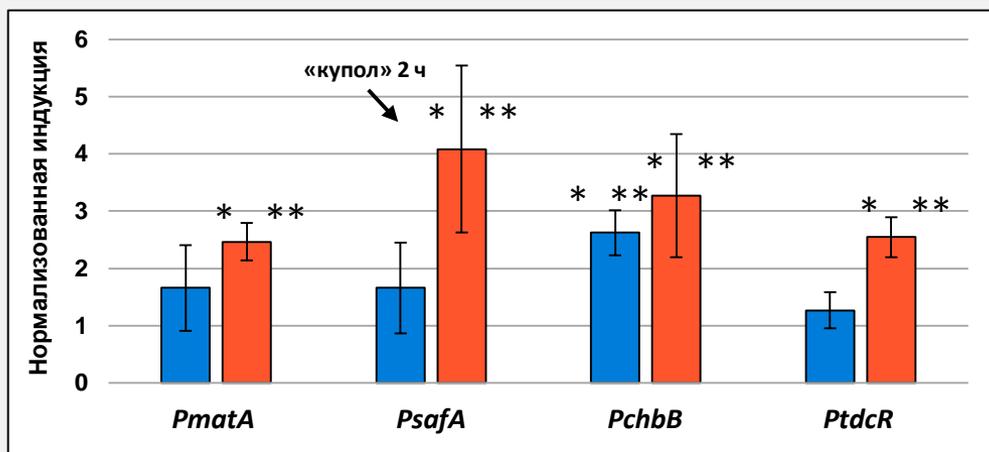
Оценка достоверности индукции: сравнение коэффициентов регрессии (b) в опыте и контроле по непараметрическому парному Т-критерию Вилкоксона.

Нормализованная индукция — отношение флуоресценции в опыте к таковой в контроле в конкретный момент времени.

# Результаты: нормализованная ТГц индукция биосенсоров при облучении на разных установках (в среде LB в кювете)

Нормализованная индукция — отношение флуоресценции в опыте к таковой в контроле в конкретный момент времени

## Новосибирский ЛСЭ

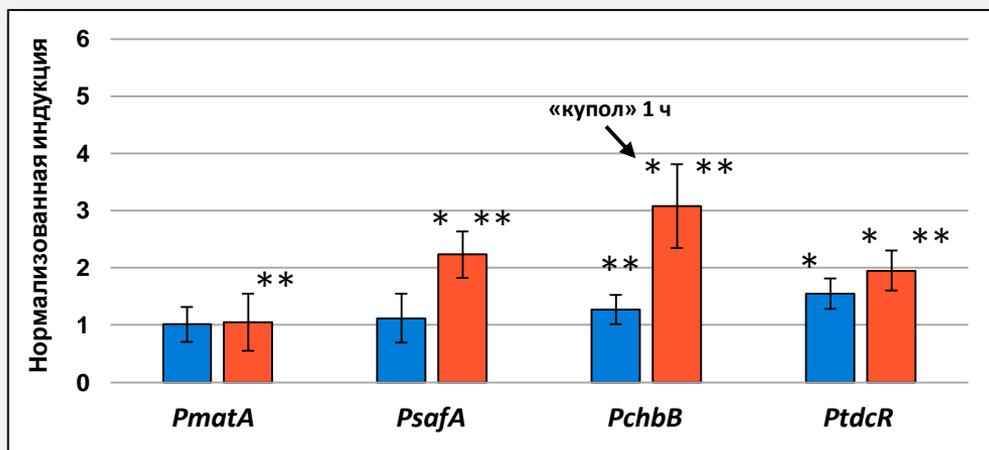


- облучение 15 мин
- облучение 30 мин

## Основные тезисы по результатам:

- в среднем наличие индукции на обоих ТГц установках, т. е. при различных параметрах излучения (разница в интенсивности в 70 раз)
- разный характер индукции в зависимости от параметров излучения
- дозозависимость индукции

## Генератор TeraSense



\* — значимое различие между коэффициентами регрессии ( $b$ ) в опыте и контроле по критерию Вилкоксона.

\*\* — значимое различие индукции при облучении на разных установках по U-критерию Манна — Уитни.

# Условия дополнительных экспериментов по ТГц облучению

## 1. Питательная среда

- Стандартные условия: среда **LB**.
- Альтернативные условия: среда **M9**.

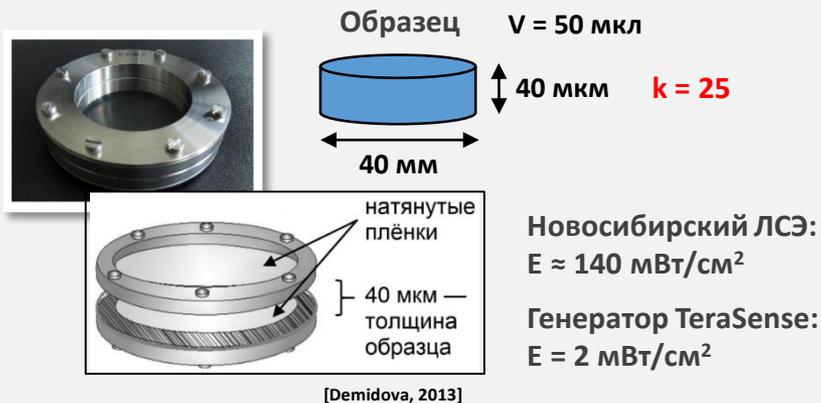
## 2. Облучаемая ёмкость с образцами

- Стандартные условия: **специальная кювета**.
- Альтернативные условия: **лунка 96-луночного планшета**.



## Сравнение ёмкостей:

### Специальная кювета



### Различный химический состав:

- **LB:** бактотриптон, дрожжевой экстракт, NaCl.
- **M9:** Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, NH<sub>4</sub>Cl, NaCl, MgSO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub>, глюкоза, казаминовые кислоты.

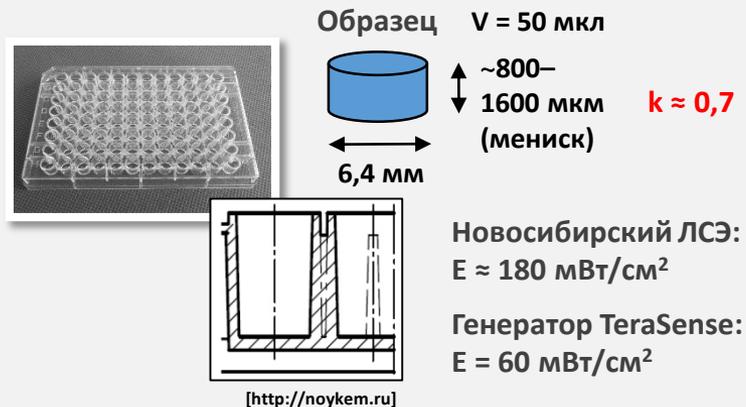


### Неодинаковые:

- облучаемая площадь;
- относительная глубина проникновения излучения в образец.

**k** — отношение облучаемой поверхности образца к его объёму

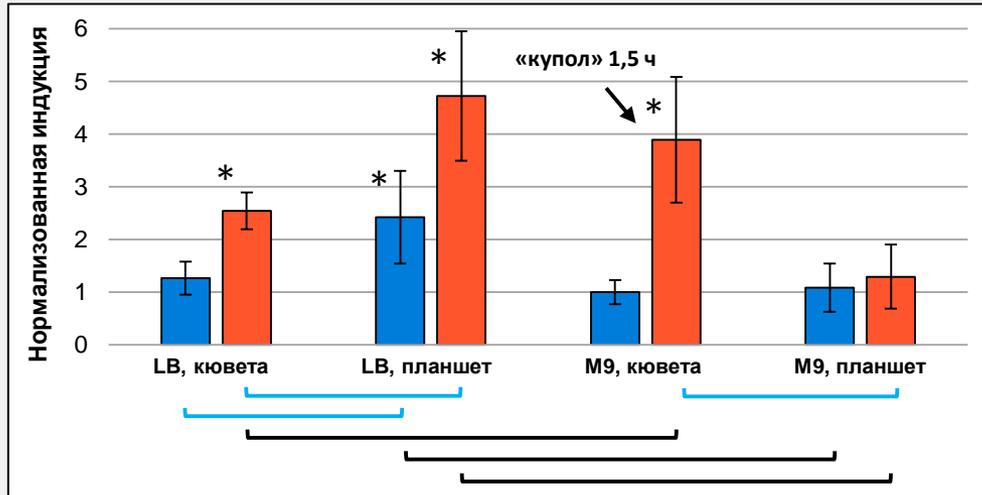
### 96-луночный планшет



## Результаты:

# нормализованная ТГц индукция биосенсора *E. coli/pTdcR-TurboYFP* при облучении в разных питательных средах и ёмкостях

### Новосибирский ЛСЭ



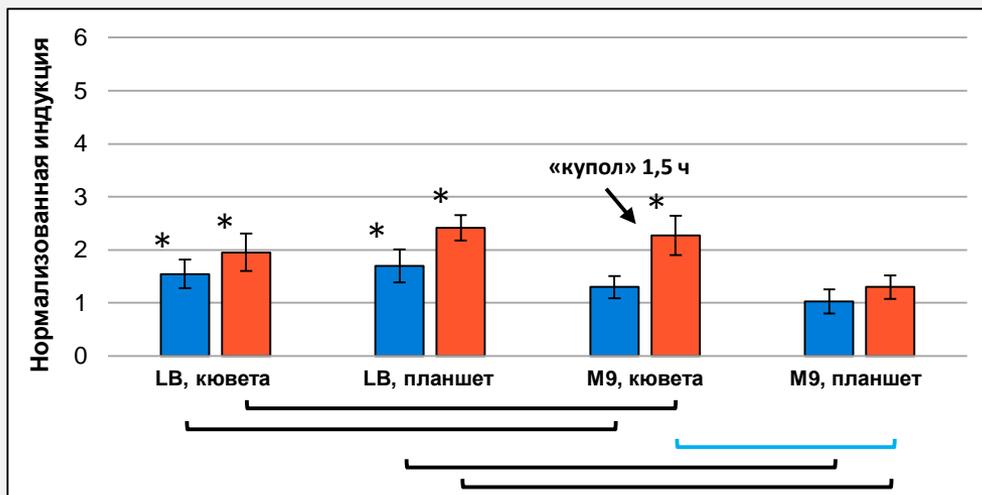
■ облучение 15 мин  
■ облучение 30 мин

— значимое различие индукции в разных средах  
— значимое различие индукции в разных ёмкостях

Среды LB и M9 различаются по источникам углерода и азота, а также по минеральному составу.

Планшет, в сравнении с кюветой, обеспечивает ограниченное проникновение ТГц излучения в образец, т. к. излучение активно поглощается водой.

### Генератор TeraSense



### Основные тезисы по результатам:

- индукция зависит от состава питательной среды и геометрии облучаемой ёмкости
- индукция нелинейна и вероятно протекает во всём объёме образца

\* — значимое различие коэффициентов регрессии ( $b$ ) в опыте и контроле по  $T$ -критерию Вилкоксона;

\*\* — значимое различие нормализованной индукции в сравниваемых группах по  $U$ -критерию Манна — Уитни.

# Результаты: дополнительные тесты

ТГц излучение НЕ оказывало влияние на:

- Копийность геносенсорных конструкций в клетке



$n = \text{const} \approx 6-8$



- Динамику роста бактериальной культуры

Индукция не связана с:

- изменением числа геносенсорных конструкций;
- выживаемостью клеток.

## Воздействие другими факторами



42 °C,  
30 мин



Нет тепловой индукции



- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,
- фенол,
- салициловая к-та
- митомицин С
- CuSO<sub>4</sub>
- FeCl<sub>3</sub>



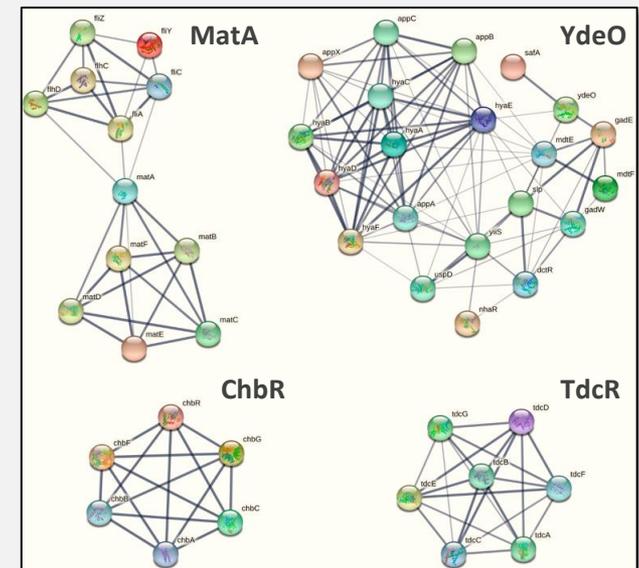
Индукция только генов *safA* и *tdcR* митомицином С

- ТГц индукция достаточно специфична на фоне теплового шока и химического стресса
- ТГц индукция по природе нетермическая
- Митомицин С является химическим индуктором биосенсоров *E. coli*/pSafA-TurboGFP и *E. coli*/pTdcR-TurboYFP

# Функции промоторов *PmatA*, *PsafA*, *PchbB*, *PtdcR* в геноме *E. coli*

Промотор	Транскрипционный фактор	Функции
<i>PmatA</i>	MatA	<u>Формирование бактериальных биоплёнок:</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>• стимуляция образования фимбрий;</li> <li>• подавление образования жгутиков</li> </ul>
<i>PsafA</i>	YdeO	<u>Адаптация к разным типам стресса:</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>• защита от кислой среды, высокой осмолярности, избытка Na<sup>+</sup>, окислительного воздействия, ДНК-повреждений;</li> <li>• выведение из клетки антибиотиков;</li> <li>• формирование биоплёнок.</li> </ul> <u>Аэробное и анаэробное дыхание</u>
<i>PchbB</i>	ChbR	<u>Транспорт и метаболизм дисахаридов хитобиозы и целлобиозы</u>
<i>PtdcR</i>	TdcR	<u>Транспорт и метаболизм аминокислот серина и треонина в анаэробных условиях</u>

Белковые сети, регулируемые транскрипционными факторами (согласно базе данных STRING)



## Ответ на ТГц излучение:

- PmatA* → неспецифическая клеточная адаптация — формирование биоплёнки
- PsafA* → защита от окислительного стресса и повреждений ДНК — синтез антистрессовых белков UspD и OsmC.
- PchbB* → сопряжённое с ТГц воздействием приспособление к углерод-дефицитному культивированию (в среде LB) — усвоение альтернативных источников углерода
- PtdcR* → связь с образованием биоплёнки — анаэробный метаболизм аминокислот, поддержание окислительно-восстановительного баланса

## Положения, выносимые на защиту:

1. Генные сети *E. coli*, задействованные в формировании биоплёнки, комплексной антистрессовой защите, усвоении хитобиозы и целлобиозы и метаболизме серина и треонина, вовлечены в ответ на нетермическое воздействие ТГц излучения: 2,31 ТГц высокоинтенсивного ( $E \approx 140$  мВт/см<sup>2</sup>) импульсного ( $F = 5,6$  МГц,  $\tau = 100$  пс) и 0,14 ТГц низкоинтенсивного ( $E \approx 2$  мВт/см<sup>2</sup>) непрерывного.
2. Состав питательной среды и геометрия облучаемой ёмкости, помимо физических характеристик ТГц ЭМИ и дозы облучения, являются важными параметрами, определяющими развитие ответной реакции исследуемых генных сетей на ТГц излучение.

## Выводы:

1. Разработано четыре флуоресцентных биосенсора: *E. coli*/pMatA-TurboGFP, *E. coli*/pSafA-TurboGFP, *E. coli*/pChbB-TurboYFP и *E. coli*/pTdcR-TurboYFP, маркирующих активность ТГц-чувствительных генных сетей *E. coli*, задействованных соответственно в клеточных функциях: формирование биоплёнки, комплексная антистрессовая защита, усвоение хитобиозы и целлобиозы, метаболизм серина и треонина.
2. Показано, что ответная нетермическая реакция рассматриваемых генных сетей на ТГц излучение зависит от его физических параметров, а также от времени экспозиции.
3. Показано, на примере генной сети, задействованной в метаболизме серина и треонина, влияние состава питательной среды и геометрии облучаемой ёмкости на развитие ответной нетермической реакции на ТГц излучение.
4. Продемонстрировано, что ТГц индукция биосенсоров не связана с изменением числа копий генов и выживаемостью клеток, поскольку при воздействии ТГц излучением копийность геносенсорных плазмид (на примере биосенсоров *E. coli*/pSafA-TurboGFP и *E. coli*/pTdcR-TurboYFP) и динамика клеточного роста (на примере биосенсора *E. coli*/pTdcR TurboYFP) не менялись.
5. Показана достаточно высокая специфичность активации исследуемых генных сетей по отношению к ТГц излучению, поскольку при тепловом шоке или химическом стрессе биосенсоры в большинстве случаев не индуцировались.

# Апробация результатов

## Основные публикации

1. Сердюков Д.С., Горячковская Т.Н., Розанов А.С., Мещерякова И.А., Пельтек С.Е.  
«Штамм бактерии *Escherichia coli*/pTdcR-TurboYFP, обладающий чувствительностью к терагерцовому излучению»  
**Патент РФ № 2691308**, 2019.
2. Serdyukov D.S., Goryachkovskaya T.N., Mescheryakova I.A., Bannikova S.V., Kuznetsov S.A., Cherkasova O.P., Popik V.M., Peltek S.E.  
«Study on the effects of terahertz radiation on gene networks of *Escherichia coli* by means of fluorescent biosensors»  
***Biomedical Optics Express (Q1)***, 2020.
3. Serdyukov D.S., Goryachkovskaya T.N., Mescheryakova I.A., Kuznetsov S.A., Popik V.M., Peltek S.E.  
«Fluorescent bacterial biosensor *E. coli*/pTdcR-TurboYFP sensitive to terahertz radiation»  
***Biomedical Optics Express (Q1)***, 2021.
4. Фёдоров В.И., Сердюков Д.С., Черкасова О.П., Попова С.С.  
«Влияние терагерцового излучения на генетический аппарат клетки»  
***Оптический журнал (Q2)***, 2017.
5. Черкасова О.П., Сердюков Д.С., Ратушняк А.С., Немова Е.Ф., Козлов Е.Н., Шидловский Ю.В., Зайцев К.И., Тучин В.В.  
«Механизмы влияния терагерцового излучения на клетки (обзор)»  
***Оптика и спектроскопия (Q3)***, 2020.

## Научные мероприятия

1. VII Троицкая конференция с международным участием «Медицинская физика», Троицк, 2020
2. VI Съезд биофизиков России, Сочи, 2019
3. VIII международный симпозиум «Modern problems of laser physics», Новосибирск, 2018
4. Молодёжная конкурс конференция Института лазерной физики СО РАН, Новосибирск, 2019 (I место)
5. Конкурс «УМНИК», Новосибирск, 2018