

Стрессовые системы *Escherichia coli* и их роль в реакциях на воздействие терагерцового излучения

С.Е. Пельтек¹✉, Е.В. Демидова¹, В.М. Попик², Т.Н. Горячкова¹

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия

² Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт ядерной физики им. Г.И. Будкера Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

Изложены результаты последних лет по изучению реакции стрессовых систем *Escherichia coli* в ответ на нетермическое воздействие терагерцового (ТГц) излучения. Наиболее простым и удобным объектом для изучения воздействия ТГц излучения на живые объекты является бактерия *E. coli*. Это связано с ее высокой изученностью как на молекулярно-генетическом, так и на метаболическом уровне, а также с возможностью создания на основе промоторов ее стресс-активируемых генов и репортерного белка GFP геносенсорных конструкций. Введение этих конструкций в клетки *E. coli* позволяет исследовать реакцию конкретной стрессовой системы бактерии на ТГц излучение по интенсивности синтеза белка GFP, легко определяемого флуориметрически. В работе представлены данные литературных источников и собственные результаты по нетермическому воздействию ТГц излучения на конкретные стрессовые системы *E. coli*. Обсуждаются экспериментальные данные, полученные с использованием геносенсоров *E. coli/pKatG-GFP*, *E. coli/pCopA-GFP* и *E. coli/pEmrR-GFP*, которые являются маркерами генных сетей *E. coli*, активирующихся в условиях окислительного стресса, при нарушении гомеостаза ионов меди и в присутствии антисептиков соответственно. Обзор проведенных исследований показал, что нетермическое воздействие ТГц излучения индуцирует в клетках *E. coli* генные сети окислительного стресса и поддержания гомеостаза меди, но не влияет на активность стрессовых систем защиты от антибиотиков, протонифоров и супероксид-анионов. Наличие динамических особенностей в развитии стрессорного ответа у геносенсоров *E. coli/pKatG-GFP* и *E. coli/pCopA-GFP* на ТГц излучение в сравнении с естественными индукторами позволяет предположить специфичность ответа систем окислительного стресса и поддержания гомеостаза меди в реакции адаптации клеток *E. coli* к ТГц излучению.

Ключевые слова: терагерцовое излучение; стрессовые системы *E. coli*; геносенсорные конструкции.

Escherichia coli stress response systems and their reaction to terahertz radiation

S.E. Peltek¹✉, E.V. Demidova¹, V.M. Popik², T.N. Goryachkovskaya¹

¹ Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

² Budker Institute of Nuclear Physics SB RAS, Novosibirsk, Russia

In this review, we summarize the latest data concerning the reactions of *Escherichia coli* to nonthermal terahertz radiation and the underlying molecular mechanisms. *E. coli* is the most simple and convenient model object for studying the effects of terahertz radiation: both its genetics and metabolism are well studied, and it is easily amenable to genetic engineering allowing one to create biosensors using promoters of genes activated by certain stress factors and the reporter GFP protein. Transformed *E. coli* cells containing biosensors can be used to visualize their reactions to terahertz radiation based on the intensity of GFP fluorescence. In this review, we present data on the response of certain *E. coli* stress response systems to terahertz radiation obtained by us, as well as by other authors. We discuss experimental results for *E. coli/pKatG-GFP*, *E. coli/pCopA-GFP*, and *E. coli/pEmrR-GFP* biosensors that are used to detect *E. coli* genetic networks responding to oxidative stress, copper ion homeostasis failures, and antiseptics, respectively. The obtained data indicate that exposure to nonthermal terahertz radiation induces *E. coli* gene networks of oxidative stress and copper ion homeostasis, but does not activate those responding to antibiotics, protonophores, or superoxide anions. The fact that *E. coli/pKatG-GFP* and *E. coli/pCopA-GFP* biosensors have different activation and reaction periods when exposed to terahertz radiation and natural inducers suggests that reactions of oxidative stress and copper ion homeostasis systems to terahertz radiation are specific.

Key words: terahertz radiation; *E. coli* stress response systems; biosensors.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Пельтек С.Е., Демидова Е.В., Попик В.М., Горячкова Т.Н. Стрессовые системы *Escherichia coli* и их роль в реакциях на воздействие терагерцового излучения. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016;20(6):876-886. DOI 10.18699/VJ16.206

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Peltek S.E., Demidova E.V., Popik V.M., Goryachkovskaya T.N. *Escherichia coli* stress response systems and their reaction to terahertz radiation. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2016;20(6):876-886. DOI 10.18699/VJ16.206

УДК 612.843.116.1:537.531

Поступила в редакцию 16.11.2016 г.

Принята к публикации 21.12.2016 г.

© АВТОРЫ, 2016

В связи с тем, что терагерцовый (ТГц) диапазон частот электромагнитного спектра активно используется в научных и прикладных областях деятельности, в дальнейшем предполагается все более интенсивный контакт человека с этим диапазоном частот, особенно в инспекционных системах безопасности и диагностическом медицинском оборудовании. Главная идея эксплуатации ТГц диапазона частот заключается в его теоретически обоснованной безопасности для живых систем – низкой энергии кванта, не способной к ионизации молекул и, следовательно, не вызывающей отрицательных последствий при контакте живых систем с другими излучениями более высокоэнергетичных диапазонов электромагнитного спектра.

Появление таких источников терагерцового излучения, как Новосибирский лазер на свободных электронах (ЛСЭ), открывает уникальные возможности для изучения воздействия излучения ТГц диапазона на живые объекты. В частности, можно проводить эксперименты при строго контролируемых параметрах излучения (длина волны, средняя и пиковая мощности).

При исследовании механизмов воздействия ТГц излучения на живые объекты необходимо учитывать, что излучение этого диапазона будет поглощаться водородными связями воды, присутствие которой в разных формах присуще всем живым объектам. В ходе эволюции живые организмы не сталкивались с данным видом излучения (из-за сильного его поглощения парами воды в атмосфере) и, следовательно, могут не иметь специфичных защитных систем. Поэтому при выполнении экспериментов по изучению возможности воздействия ТГц излучения на живые объекты критически важно обеспечить строгий температурный контроль.

Наиболее простым и удобным объектом для исследования воздействия ТГц излучения на живые объекты является бактерия *Escherichia 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 флуориметрически. Применение таких геносенсорных конструкций позволит не только выявить возможное влияние ТГц излучения на функционирование отдельных генетических систем у *E. coli*, но и подойти к изучению некоторых механизмов этого воздействия.

В основе геносенсора лежит способность клетки отвечать на конкретное воздействие активацией своих специфичных систем. Каскады генов активируются в клетке в присутствии агентов, повреждающих структуру и функции клетки (Zheng et al., 2001). Чувствительным звеном геносенсорной конструкции являются промоторы таких генов, связанные с репортерным геном, появление продукта которого свидетельствует об активации системы. В качестве репортерных генов используют гены, кодирующие флуоресцентные или люминесцентные белки, которые легко детектируются (Hakkila et al., 2002). В результате внешнего воздействия клетка активирует экспрессию этой генетической конструкции, что приводит к синтезу флуоресцентных белков.

Известно, что иногда один и тот же стрессирующий фактор способен индуцировать как специфичную генную сеть, характерную именно для этого фактора, так и сопряженные генные сети, характерные для других видов стресса, что помогает клетке справиться с последствиями воздействия, снизить или даже ликвидировать повреждающий эффект токсических агентов на ее структуру и функции.

Целью настоящей работы является попытка описать основные свойства и элементы стрессовых систем *E. coli*, задействованных в ответе на нетермическое воздействие ТГц излучения.

Определение стрессовых систем *E. coli*, задействованных в ответе на терагерцовое излучение

В основу геносенсорных конструкций для изучения влияния ТГц излучения на живые системы нами положены известные регуляторные элементы хорошо изученных стрессовых систем *E. coli*, связанные с основными видами внешних воздействий на жизнедеятельность бактерий (окислительный стресс, поддержание гомеостаза ионов меди, присутствие антисептиков).

Эксперименты проводили с использованием уникальной установки – Новосибирского лазера на свободных электронах терагерцового диапазона Сибирского центра синхротронного и терагерцового излучения, спроектированного и запущенного в действие Институтом ядерной физики СО РАН. Облучение биологических объектов осуществляли на специально оборудованной биологической станции, позволяющей регулировать точную дозу облучения и строго контролировать температуру образца (Demidova et al., 2013; Bogomazova et al., 2015).

В работе использованы созданные в Институте цитологии и генетики СО РАН геносенсоры на основе промоторов генов, чувствительных к окислительному стрессу – *E. coli*/pKatG-GFP (Khlebodarova et al., 2007), присутствию в среде ионов меди и серебра – *E. coli*/pCopA-GFP, и геносенсор на основе промотора гена *emrR E. coli* (*E. coli* multidrug resistance regulator), чувствительного к присутствию таких противомикробных агентов, как салициловая или налидиксовая кислоты, – *E. coli*/pEmrR-GFP (Demidova et al., 2016). В качестве репортерного белка использовался белок GFP_{aaV}, характеризующийся интенсивной флуоресценцией и временем полужизни 60 мин (Andersen et al., 1998).

При сравнении динамики развития ответа наблюдается различный характер реакции геносенсоров на естественные индукторы: наработка флуоресцентного белка геносенсором *E. coli*/pKatG-GFP на перекись водорода достигает 1.25 отн. ед. относительно отрицательного контроля примерно через час после начала эксперимента и затем держится на этом уровне с некоторыми колебаниями, тогда как ответ геносенсора *E. coli*/pCopA-GFP на ионы меди развивается быстро и постоянно и достигает уровня 2 отн. ед. за три часа; в ответ на присутствие салициловой кислоты флуоресценция геносенсора *E. coli*/pEmrR-GFP медленно возрастает первые 2.5 часа и затем стабилизируется на уровне примерно 1.5 отн. ед. Характер реакции геносенсоров на ТГц излучение также

Таблица 1. Результаты индукции геносенсоров

Геносенсор	Перекись водорода 2.5 мМ	Тепловой шок, 42 °С	ТГц	Сульфат меди 25 мкМ	Салициловая кислота 0.1 мМ
<i>E. coli</i> /pKatG-GFP	Естественный индуктор	Нет индукции	Индукция выше уровня естественного индуктора	Индукция выше уровня естественного индуктора	Нет индукции
<i>E. coli</i> /pCopA-GFP	Нет индукции	»	Индукция ниже уровня естественного индуктора	Естественный индуктор	»
<i>E. coli</i> /pEmrR-GFP	»	»	Нет индукции	Нет индукции	Естественный индуктор

различен: наибольшее значение флуоресценции отмечается у *E. coli*/pKatG-GFP, при этом первые два часа ответ развивается медленно, затем ускоряется и достигает 1.5 отн. ед. за три часа от начала эксперимента, тогда как ответ *E. coli*/pCopA-GFP на излучение развивается с постоянной скоростью, но медленнее, чем *E. coli*/pKatG-GFP, и достигает 1.5 отн. ед. более чем за три часа; *E. coli*/pEmrR-GFP вовсе не развивает флуоресцентного ответа на воздействие излучения. Уровень индукции геносенсора *E. coli*/pKatG-GFP ТГц излучением оказался выше уровня индукции естественным индуктором, а уровень индукции геносенсора *E. coli*/pCopA-GFP ТГц излучением – ниже уровня индукции естественным индуктором. Концентрация клеток во всех образцах (облученных, отрицательного и положительного контроля), отобранных для измерения флуоресценции, была одинакова. Разная динамика ответа геносенсоров на естественные индукторы и ТГц излучение свидетельствует о различных механизмах индукции стрессового ответа. Понятно, что ответ *E. coli* на стрессы окружающей среды всегда является комплексным. На первом этапе стресса включаются механизмы нейтрализации воздействия, далее включается система защиты от повреждений, в конце – возможно, система репарации.

Для выявления перекрестных механизмов индукции имеющихся геносенсоров была проведена обработка клеток геносенсоров неспецифическими индукторами, включая тепловой шок. Результаты тестирования приведены в табл. 1.

Реакция геносенсоров на ТГц излучение и отсутствие реакции на тепловой шок однозначно свидетельствуют о том, что нами выявлена именно нетермическая составляющая воздействия. Чтобы выявить участие систем защиты от окислительного стресса в реакции на ТГц излучение, был использован геносенсор *E. coli*/pKatG-GFP, чувствительный к перекиси водорода. Однако этот геносенсор оказался чувствительным и к другим индукторам. Активация ТГц излучением геносенсоров, не чувствительных к перекиси водорода, а также геносенсора *E. coli*/pKatG-GFP свидетельствует о других механизмах индукции. В частности, регуляция экспрессии гена *CopA* не связана с окислительным стрессом. Добавление в среду с геносенсором *E. coli*/pCopA-GFP перекиси водорода в концентрациях, вызывающих развитие окислительного стресса, не приводит к активации этого геносенсора.

В настоящее время определено более десятка генных сетей, которые активируются в ответ на различные виды стресса. Известно, что в ответ на один стрессовый фактор могут активироваться несколько генных сетей (Hengge-Aronis, 1999). 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 можно зарегистрировать и интерпретировать, опираясь на уже известные механизмы стрессовых ответов *E. coli*. Рассмотрим более подробно стрессовые системы *E. coli*, реагирующие на перечисленные в табл. 1 естественные индукторы (перекись водорода, тепловой шок, сульфат меди и салициловая кислота).

Механизмы регуляции стрессовых реакций *E. coli*

Метаболизм перекиси водорода (H₂O₂)

Окислительному стрессу подвержены все организмы с аэробным дыханием, поскольку активные формы кислорода (АФК) образуются вследствие нормального метаболизма. Большинство АФК, такие как пероксид водорода, супероксидный и гидроксильный радикалы, являются побочными продуктами в электронно-транспортной цепи в процессе окислительного фосфорилирования (González-Flecha, Demple, 1995; Lushchak, 2011).

В метаболических путях у *E. coli* встречается два пути расщепления перекиси водорода – с образованием кислорода и воды; окисление L-аскорбата до L-дегидроаскорбата (рис. 1).

Помимо участия в метаболических путях, перекись водорода участвует в реакциях окисления и реакциях Фентона, происходящих в клетках *E. coli* (табл. 2).

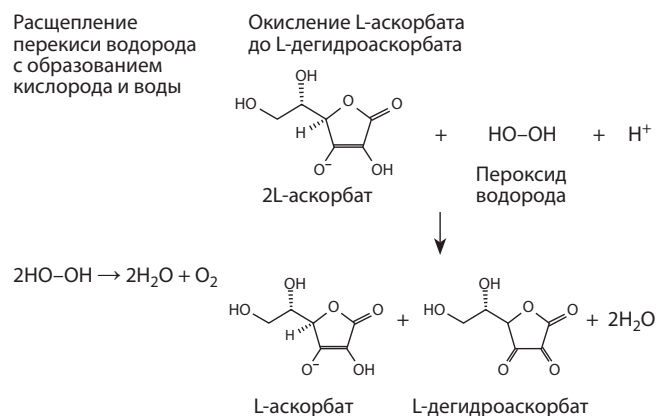


Рис. 1. Метаболические пути расщепления перекиси водорода у *E. coli* (адаптировано из <http://ecosuc.org>).

Таблица 2. Реакции перекиси водорода в клетках *E. coli* (<http://ecosusc.org>)

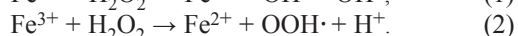
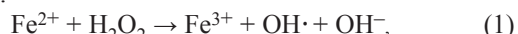
Восстановление	$2\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow 2[\text{FeO}(\text{OH})] + 4\text{H}^+$
Окисление L-аскорбата	$2\text{L-аскорбат} + \text{H}_2\text{O}_2 + 2\text{H}^+ \rightarrow 2 \text{ монодегидроаскорбат-радикал} + 2\text{H}_2\text{O}$
Реакция Фентона	$\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}\cdot + \text{OH}^-$ $\text{Fe}^{3+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{2+} + \text{OOH}\cdot + \text{H}^+$
Окисление	$\text{L-метионин} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{L-метионин супероксид} + 2\text{H}_2\text{O}$ $\text{Восстановленный акцептор электронов} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{окисленный акцептор электронов} + 2\text{H}_2\text{O}$ $2 \text{ глутатион} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{глутатион дисульфид} + 2\text{H}_2\text{O}$ $\text{Восстановленный тиоредоксин} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{окисленный тиоредоксин} + 2\text{H}_2\text{O}$

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 et al., 1999) или перекисное окисление липидов, приводящее к повышению текучести мембран и, в конечном итоге, к нарушению целостности и гибели клеток (Cabiscol 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, Halliwell, 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 SoxRS и OxyR, в результате чего происходит индукция экспрессии множества генов, кодирующих белки с антиоксидантной и репарирующей активностью.

Механизм с участием OxyR регулона. OxyR регулон играет центральную роль в защите клеток *E. coli* против эндогенного окислительного стресса от пероксида водорода, образующегося в результате активного аэробного роста (González-Flecha, Demple, 1995, 2000).

Повреждающее действие пероксида водорода связано прежде всего с реакцией Фентона – прямым окислением несвязанных внутриклеточных ионов восстановленного железа, что приводит к образованию гидроксильного радикала и супероксид-радикала (Imlay, Linn, 1988; Henle et al., 1999):



Гидроксильный радикал, образующийся в этой реакции, короткоживущий, но чрезвычайно активный и способный к дальнейшим реакциям с биомолекулами вблизи сайта своего образования (Park et al., 2005; Lushchak, 2011). Восстановителями окисленного железа являются НАД(Ф)Н, тиолы, свободные восстановленные флавины (Rowley, Halliwell, 1982; Woodmansee, Imlay, 2002). Также эффективным восстановителем железа считается цистеин (Park, Imlay, 2003).

Супероксидный радикал оказывает повреждающее действие, связанное со способностью высвобождать железо из центров железо-серных дегидратаз. В ходе этого процесса происходит инактивация железо-серных

кластеров ферментов и накопление несвязанного железа в цитоплазме (Flint et al., 1993; Liochev, Fridovich, 1994; Jang, Imlay, 2007).

Под контролем OxyR находятся 9 из примерно 30 белков, которые являются основными звеньями в метаболических путях разложения пероксида водорода в бактериальных клетках. Прежде всего это каталаза HPI (hydroperoxidase I) – продукт гена *katG*, активный при аэробном росте, и каталаза HPII (hydroperoxidase II) – продукт гена *katE*, индуцирующийся в стационарной фазе роста под контролем σ (RpoS) субъединицы РНК-полимеразы (Loewen et al., 1998). Также к OxyR регулону относятся Mn-супероксиддисмутаза, глутаредоксин I (*grxA*), глутатионредуктаза (*gorA*), алкилгидропероксидредуктаза (*ahpFC*), ДНК-связывающий белок (*dps*), копропорфириноген III редуктаза, арилсульфатаза, регулятор синтеза капсулярного полисахарида и несколько белков теплового шока (Zheng et al., 2001). Также OxyR в окисленной форме активирует транскрипцию OxyS – маленькой нетранслируемой РНК, которая косвенно регулирует примерно 20 генов, нарушая стабильность РНК или эффективность трансляции (Altuvia et al., 1997). В частности, OxyS является репрессором *hyp* оперона *shlA* и гена сигма-фактора стационарной фазы RpoS (Altuvia et al., 1998; Zhang et al., 1998).

Транскрипционный фактор (ТФ) OxyR – хорошо изученный белок с массой 34.4 кДа, принадлежит к LysR семейству бактериальных ТФ. Очищенный белок OxyR существует в растворе как тетрамер (Kullik et al., 1995) и относится к активаторам класса I, которые взаимодействуют с альфа-субъединицей РНК-полимеразы на промоторе, активируя транскрипцию (Tao et al., 1993).

Синтез OxyR происходит и в отсутствие воздействия перекиси, более того, при воздействии перекиси его экспрессия не увеличивается. Этот факт свидетельствует о том, что OxyR активируется посттрансляционно (Storz et al., 1990). Восстановленная форма белка OxyR обеспечивает авторегуляцию, связываясь с промотором гена *oxyR*.

Существуют две различные реакции, определяющие 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. В условиях нормального роста осуществляется равновесие окисленной и восстановленной форм с преобладанием первого пути. При увеличении внеклеточной концен-

трации перекиси $>5 \mu\text{M}$ доминирует вторая реакция, и окисленная форма становится основной (Aslund et al., 1999). Эта окислительная реакция происходит очень быстро, примерно за 30 с; после удаления перекиси из среды окисленную форму OxyR можно обнаружить в клетке еще в течение 5 мин:



В условиях нормального роста при низкой концентрации пероксида водорода преобладает прямая реакция с участием глутатиона – уравнение (3). При увеличении внеклеточной концентрации перекиси $>5 \mu\text{M}$ доминирует вторая реакция – уравнение (4).

С окислительным стрессом связан и метаболизм железа: OxyR является положительным регулятором железосвязывающего репрессора переноса железа Fur (Zheng et al., 1999). Таким образом, через OxyR может осуществляться непрямая активация генов, регулятором которых является Fur.

Механизм с участием SoxRS регулона. SoxRS – это система из двух транскрипционных факторов SoxR и SoxS, вместе они составляют регулон SoxRS, активация которого происходит исключительно в условиях окислительного стресса и может быть вызвана агентами, генерирующими супероксид-анионы, такими, например, как паракват и менадион (González-Flecha, Demple, 2000).

Гены *soxS* и *soxR* кодируют два транскрипционных активатора, которые в конечном счете модулируют экспрессию более 16 других генов, таких как *sodA* (Mn-содержащая супероксиддисмутаза), *zwf* (глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа), *fldA* и *fldB* (два флаводоксина), *fpr* (НАД(Ф)Н-ферредоксин редуктаза), *fur* (железо-связывающий репрессор переноса железа), *nfo* (ДНК репаративная эндонуклеаза IV), *acrAB* (экспортирующий насос) и *micF* (нетранслируемая РНК, которая уменьшает экспрессию порины OmpF). Белки, экспрессия которых индуцируется системой SoxRS, действуют совместно и устраняют возможный ущерб от оксидативного стресса, используя механизмы удаления оксидантов (супероксиддисмутаза), ДНК репарацию (эндонуклеаза IV), восстановление окисленных металлов в протетических группах (флаводоксин- и ферредоксинредуктаза) и системы НАД(Ф)Н (глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа), снижение проницаемости (*micF*) и экскрецию токсинов (порины). Активация генов SoxRS регулона увеличивает устойчивость клетки не только к супероксид-генерирующим агентам, но и к органическим растворителям, а также оксиду азота (NO), который может генерироваться антибиотиками (Pomposiello, Demple, 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 транскрипционного фактора и активирует экспрессию гена *soxS* (Hidalgo et al., 1995), продукт которого, в свою очередь, индуцирует экспрессию всех вышеперечисленных генов.

SoxR – полипептид размером 17 кДа (Tsaneva, Weiss, 1990), принадлежащий к MerR семейству белков. К нему

же относятся некоторые регуляторы устойчивости к антибактериальным веществам, например TipA и BmrR (Wu et al., 1995) и металл-чувствительные регуляторы, в том числе CueR – регулятор гомеостаза меди в *E. coli*, выделяющиеся внутри семейства наличием консервативных цистеинов в фиксированных позициях (Nies, 1999; Brown et al., 2003). Характерными особенностями белков, принадлежащих к семейству MerR, являются ДНК-связывающий домен спираль–поворот–спираль и способ активации транскрипции: промотор регулируемого гена обладает определенным спейсером (19–20 п. н.) и палиндромом, в обычных условиях это слабый промотор (Brown et al., 2003). Транскрипционный фактор увеличивает его силу путем изгибания ДНК и изменения расстояния между боксами.

SoxR формирует в растворе димер, каждый мономер которого содержит [2Fe-2S] кластер (Hidalgo et al., 1995; Wu et al., 1995). В этом состоянии белок неактивен. Окисленная форма [2Fe-2S] кластера – (Fe³⁺–Fe³⁺) – изменяет структуру белка SoxR, и он приобретает способность к активации транскрипции. В условиях окислительного стресса SoxR связывается со своим сайтом, блокирует собственную транскрипцию и изменяет структуру промотора SoxS таким образом, что полимеразы становятся способной к активации его транскрипции (Hidalgo, Demple, 1994).

В отличие от SoxR, SoxS имеет сайты связывания в промоторах других генов, которые он и активирует в условиях стресса (González-Flecha, Demple, 2000). Однако уровень аффинности связывания SoxS с этими промоторами на два порядка ниже, чем у транскрипционного фактора SoxR, и для активации его требуется намного больше, чем SoxR. В условиях длительного стресса накопление мРНК SoxS прекращается и даже падает в связи с тем, что ее стабильность резко уменьшается. Не исключено, что и низкая аффинность SoxS (т. е. необходимость высокой концентрации ТФ SoxS для активации генов-мишеней) является необходимым компонентом прекращения стрессорной реакции в условиях длительного стресса.

Активация SoxR с помощью NO не зависит от присутствия кислорода (Nunoshiba et al., 1995). *In vivo* нитрозилированный SoxR имеет активность, сравнимую с той, которую имеет окисленный SoxR (Pomposiello, Demple, 2001).

В антиоксидантную защиту клеток вовлечен еще один регулятор – альтернативный транскрипционный фактор sigma S (RpoS, σ S, KatF), регулирующий адаптационный ответ в стационарной фазе. Он кодируется геном *rpoS* и регулирует активность большого числа генов, в том числе антиоксидантных *katG*, *dps* и *gor* (Hengge-Aronis, 2002).

Основные защитные системы в *E. coli*, активируемые окислительным стрессом, можно представить следующим образом (табл. 3).

Гомеостаз ионов меди

Медь – важнейший микроэлемент, необходимый 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 – так называемая «медная квота», необходимая для нормальной физиологии (Finney, O'Halloran,

Таблица 3. Основные защитные механизмы клетки *E. coli* от окислительного стресса

soxRS (O ₂ ⁻ -индуцируемые)	oxyR (H ₂ O ₂ -индуцируемые)	o ^s (H ₂ O ₂ , O ₂ ⁻ -индуцируемые)
<i>sodA</i> – супероксиддисмутаза	<i>katG</i> – каталаза (гидропероксидаза I)	<i>katE</i> – гидропероксидаза II
<i>nfo</i> – эндонуклеаза IV	<i>ahpCF</i> – алкилгидропероксид редуктаза	<i>xthA</i> – эндонуклеаза III
<i>acnA</i> – аконитаза	<i>grxA</i> – глутаредоксин I	<i>sodC</i> – супероксиддисмутаза
<i>tolC</i> – внешний мембранный белок	<i>gorA</i> – глутатионредуктаза	<i>sodB</i> – супероксиддисмутаза
<i>micF</i> – регуляторная РНК, репрессия экспрессии внешнего мембранного белка	<i>oxyS</i> – регуляторная РНК (защита от мутагенеза)	
<i>fldA</i> – флаводоксин А	<i>dps</i> – неспецифический ДНК-связывающийся белок	
<i>fpr</i> – ферредоксин/флаводоксин NADP ⁺ редуктаза	<i>hemF</i> – копропорфиноген III оксидаза	
<i>ribA</i> – GTP циклогидролаза II	<i>rcsC</i> – регулятор капсулярных полисахарид-синтезирующих генов	
<i>zwf</i> – глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа	<i>f497</i> – белок, гомологичный арилсульфатаз-ферментам	
<i>inaA</i>	<i>fur</i>	
<i>pqi5</i>		
<i>fumC</i>		
<i>fur</i>		
<i>acrAB</i>		

2003). Регуляция гомеостаза ионов меди в *E. coli* осуществляется с помощью транскрипционного фактора CueR и двухкомпонентной системы CusRS.

Транскрипционный фактор CueR, так же как и SoxR, принадлежит к MerR семейству. Для CueR тоже характерно наличие ДНК-связывающего домена спираль–поворот–спираль и способ активации транскрипции, когда в обычных условиях промотор регулируемого гена слабый, а транскрипционный фактор увеличивает его силу путем изгибания ДНК и изменения расстояния между боксами.

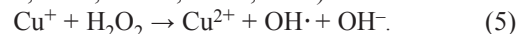
Под регуляторным контролем CueR находятся ген мультимедной оксидазы *sueO*, осуществляющей детоксикацию ионов меди, и ген АТФазного насоса Р-типа *copA*, который является центральным компонентом поддержания гомеостаза меди и осуществляет экспорт ионов в периплазматическое пространство (Outten et al., 2000; Petersen, Moller, 2000). В аэробных условиях уровень индукции системы поддержания гомеостаза меди выше через регуляторный ТФ CueR, чем через систему CusRS (Outten et al., 2001). При пролонгированном воздействии 0.5 мМ CuSO₄ уровень CueR повышается примерно в 5 раз и составляет 320–400 молекул на клетку (Yamamoto, Ishihama, 2005).

Двухкомпонентная система CusRS регулирует транскрипцию оперона *cusCFBA*.

Гены, кодирующие ТФ CusR и CusS, организованы в оперон, направленный противоположно регулируемым ими генам, при этом CusR – ответный регулятор, CusS – сенсорная киназа. Продукты генов оперона *cusCFBA* образуют систему из трех компонентов (CusCBA), 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 цитоплазму и периплазму; CusB – член семейства белков, слитых с мембраной (membrane fusion protein – MFP); CusF – периплазматический шаперон, взаимодействующий с CusC и CusB (Franke et al., 2003). Нуль-мутанты

по *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 CusRS 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 (Outten et al., 2001; Thieme et al., 2008).

Несмотря на то что избыток ионов меди токсичен для бактерий, фундаментальные механизмы клеточных повреждений вследствие такого воздействия до сих пор остаются не до конца понятыми. Предполагается, что из-за особенностей свойств окислительно-восстановительного статуса ионы меди похожи на ионы железа. Они аналогично и даже легче железа могут участвовать в реакциях, в том числе в реакции Фентона (см. табл. 2), приводящих к образованию супероксид-аниона, перекиси водорода, а также гидроксил-радикала, крайне токсичного для клетки (Thomas et al., 2009; Hesel, Franz, 2015):



Однако в работе (Macomber et al., 2007) показано, что большая часть H₂O₂-окисленной меди 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 другом исследовании (Macomber, Imlay, 2009), посвященном выяснению механизмов токсичности меди, использовались мутантные линии *E. coli* по генам *copA*, *sueO*, *cus*. В работе показана блокировка ферментов, содержащих Fe-S-кластеры, таких как ферменты биосинтеза аминокислот – дегидратаз (изопропилмалат и дегидратаза и дигидрокси-кислая дегидратаза), а также блокировка фумаразы А, насыщение субстратом (малатом) которой

защищало активный центр фермента от инактивации. Аналогичные данные получены в работе (Fung et al., 2013).

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 (1 мкМ и 200 мкМ соответственно) имеет синергический эффект, приводящий к задержке роста бактерий (Bird et al., 2013). При взаимодействии систем гомеостаза меди и железа важную роль играет мультимедная оксидаза CueO. Помимо ионов меди естественным субстратом для этого фермента является энтеробактин – соединение, синтезируемое бактерией для захвата железа из окружающей среды. Показано, что смесь энтеробактина и меди *in vitro* токсична для клетки, но добавление очищенной оксидазы CueO способствовало выживанию клеток. Делеция гена *fur* – центрального регулятора метаболизма железа в *E. coli* – приводила к гиперчувствительности 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 et al., 2004).

EmrRAB оперон (мультилекарственная устойчивость)

В *E. coli* существует несколько систем, формирующих устойчивость клеток к различным антибактериальным веществам (Grkovic et al., 2002).

EmrRAB – оперон, участвующий в формировании мультилекарственной устойчивости *E. coli* посредством удаления из клетки таких структурно непохожих веществ, как протонифоры и антибиотики типа тиолактомицина и налидиксовой кислоты. *EmrR* – первый ген оперона, кодирующий 20.6 кДа белок. Мутации в гене *emrR* приводят к повышенной экспрессии *EmrAB*, что в свою очередь увеличивает устойчивость бактерий к антимикробным агентам. EmrR является негативным регулятором оперона и принадлежит к *magR* семейству транскрипционных репрессоров (Lomovskaya et al., 1995; Seoane, Levy, 1995; Miller, Sulavik, 1996).

EmrB – белок, выполняющий функцию насоса при транспорте соединений через цитоплазматическую мембрану. EmrA – белок, связывающий соединения и, вероятно, осуществляющий их передачу от EmrB к TolC (Borges-Walmsley et al., 2003). TolC – порин наружной мембраны, вовлеченный в эффлюкс некоторых гидрофобных и алифатических молекул; является общим компонентом для нескольких систем экспорта лекарств из клетки, в том числе EmrRAB, но не находится под регуляторным контролем EmrR (Morona et al., 1983).

Эффлюкс соединений системой EmrAB–TolC осуществляется с использованием градиента протонов (Putman et al., 2000).

Негативная регуляция оперона *emrRAB* осуществляется путем прямого связывания ТФ EmrR с последовательностью ДНК промотора оперона *emrRAB*. Индукторы системы *emrAB*, такие как карбонилцианид, 2,4-динитрофенол, тетрахлорсалициланилид и налидиксовая кислота, связываются с EmrR и ингибируют взаимодействие промотор–репрессор (Xiong et al., 2000).

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. При этом стимуляция синтеза SoxR и EmrR зависела от наличия неспецифически расположенной последовательности Шайна–Дальгарно в мРНК SoxR и EmrR. Синтез GshA был следствием существования неспецифического иницирующего кодона UUG вместо AUG. 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, *emrR* входит в полиаминный модулон – группу генов, регулируемых полиаминами (Yoshida et al., 2004; Sakamoto et al., 2015).

Тепловой шок

Тепловой шок является гомеостатическим ответом клетки на индуцированное стрессовыми условиями изменение конформации белков. Тепловой шок у *E. coli* развивается при температуре 42 °С. Механизмы защиты достаточно хорошо описаны (Arsène et al., 2000). Этот феномен свойствен всем организмам, и его молекулярный механизм практически идентичен у бактерий (Arsène et al., 2000), архей (de Macario, Macario, 1994) и эукариот (Хлебодарова, 2002). При повышении температуры клетка начинает синтезировать белки теплового шока, к которым прежде всего относятся молекулярные шапероны (DnaK, GroEL) и АТФ-зависимые протеазы (Lon, ClpAP). Эти белки выполняют две основные функции – обеспечивают фолдинг (сворачивание в нативную конформацию) и деградацию поврежденных белков. Гены стрессовых промоторов, использованных в настоящей работе, не относятся к системе защиты клетки от теплового шока. Проверенные геносенсоры не отвечали на тепловой шок.

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. Для исключения индукции изучаемых элементов стрессовых систем бактериальных клеток вследствие теплового шока, в ходе экспериментов для геносенсоров *E. coli/pKatG-GFP*, *E. coli/pCopA-GFP* и *E. coli/pEmrR-GFP* проводилось дополнительное тестирование на активацию после температурного воздействия 42 °С в течение 15 мин.

Активация стрессовых систем *E. coli* в условиях терагерцового облучения

С целью определения стрессовых систем *E. coli*, задействованных в ответе на нетермическое воздействие ТГц излучения, нами была проведена серия экспериментов с геносенсорами, маркирующими генные сети *E. coli*, активирующиеся в условиях окислительного стресса, присутствия антисептиков, поддержания гомеостаза ионов меди.

Одним из центральных регуляторов системы окислительного стресса является транскрипционный фактор OxyR, под положительным регуляторным контролем которого находится ген пероксидазы *katG* (Belkin et al.,

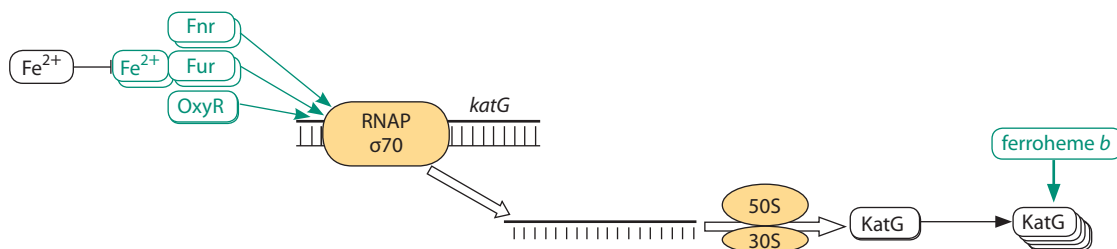


Рис. 2. Схема регуляции гена *katG* (<http://ecocyc.org>).

1996; Khlebodarova et al., 2007). Появление в клетке *E. coli* перекиси водорода или супероксид-радикала приводит к активации экспрессии гена *katG* (рис. 2). KatG осуществляет реакцию восстановления супероксид-радикала, кофактором реакции выступает гем, имеющий в своем составе железо (Fe^{2+} или Fe^{3+}).

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

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. Медь входит в состав супероксиддисмутазы SodC, или CuZnSOD, которая играет важную роль в преобразовании супероксидных радикалов до перекиси водорода и кислорода (Imlay K., Imlay J., 1996; Pena et al., 1999), однако ее избыток, так же как и недостаток, может вызывать серьезные патологии. По свойствам окислительно-восстановительного статуса ионы меди похожи на ионы железа, однако роль меди в клетке более специфична, как и сама реакция клетки на ионы меди, для которых существует специальная система эффлюкса. Известно, что ионы меди в бактериальных клетках могут влиять на гомеостаз железа, дестабилизируя белковые Fe-S кластеры (Chillappagari et al., 2010; Fung et al., 2013), в свою очередь белки, содержащие железосерные кластеры, 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 стрессовая система поддержания гомеостаза ионов меди, а именно ген *copA*, кодирующий АТФазную помпу (Rensing et al., 1999), была выбрана для разработки и создания гено-сенсорной конструкции для дальнейшего тестирования эффектов нетермического воздействия ТГц излучения. CopA – центральный компонент поддержания гомеостаза меди, осуществляющий экспорт ионов меди в периплазматическое пространство. Активируют экспрессию ионы меди и серебра и транскрипционный фактор CueR. Для активации промотора транскрипционный фактор CueR должен связать ион Cu^+ , Ag^+ или Au^+ (рис. 3).

Было показано, что клетки гено-сенсоров под регуляторным контролем промоторов гена *copA* реагируют на терагерцовое излучение индукцией синтеза GFP белка. При этом уровень индукции репортерного белка GFP у гено-сенсора *E. coli/pCopA-GFP* заметно ниже, чем у гено-сенсора *E. coli/pKatG-GFP*. Кинетика индукционного ответа, полученная после нетермического воздействия ТГц излучения, отличается от кинетики ответной реакции на ионы меди. Для облученных образцов характерен менее интенсивный флуоресцентный ответ, чем в случае положительного контроля, однако если сравнивать с характером кинетических кривых гено-сенсора *E. coli/pKatG-GFP*, развитие ответной реакции у гено-сенсора *E. coli/pCopA-GFP* не отсрочено 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*, входящего в оперон *emrRAB*. Ген *emrR* в составе оперона *emrRAB* кодирует белок MarR, участвующий в мультилекарственной устойчивости *E. coli* (рис. 4).

Оперон *emrRAB* придает клетке устойчивость к таким структурно несхожим соединениям, как протонофоры (СССР и ТСС), 2-хлорофенилгидразин и некоторые ан-

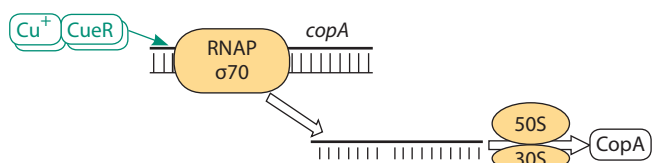


Рис. 3. Регуляция гена *copA* (<http://ecocyc.org>).

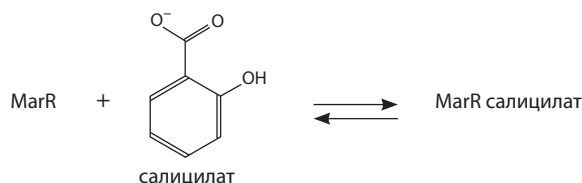


Рис. 4. Механизм инактивации салициловой кислоты (<http://ecocyc.org>).

тибиотики (налидиксовая кислота, тиолактомицин). Ген *emrR* является негативным регулятором генов этого оперона (Lomovskaya et al., 1995). Для геносенсора *E. coli*/pEmrR-GFP после воздействия нетермическим ТГц излучением индукция флуоресцентного белка GFP не наблюдалась, для положительного контроля при индукции салициловой кислотой всегда было характерно стабильное выраженное увеличение флуоресценции.

Отсутствие индукции геносенсора *E. coli*/pEmrR-GFP указывает на то, что в реакции на ТГц излучение не участвуют стрессовые системы защиты от антибиотиков и протонофоров. Тот факт, что геносенсор *E. coli*/pEmrR-GFP (Sakamoto et al., 2015) участвует в стрессовой системе окислительного стресса, вызываемого супероксид-анионами, и в то же время не реагирует на ТГц излучение, свидетельствует в пользу того, что стрессовая система защиты от супероксид-анионов также не задействована в исследуемом процессе.

Промотор гена *copA* содержит сайт связывания транскрипционного фактора CueR, который, связываясь с ионами меди, осуществляет положительную регуляцию гена *copA* даже при умеренных концентрациях меди в аэробных условиях (Grass, Rensing, 2001; Rademacher, Masepohl, 2012). Также известно, что в промоторной области *copA* содержится гипотетический сайт связывания глобального транскрипционного фактора FruR (Fructose repressor), но непонятно, в роли активатора или репрессора он выступает. Примечательно, что транскрипционный фактор FruR тоже является активатором гена *crp* (Zhang et al., 2014), который вовлечен в генную сеть окислительного стресса и опосредованно (через OxyR) способен активировать транскрипцию гена *katG* (Demidova et al., 2016).

Известно, что FruR обеспечивает переключение между анаболизмом и катаболизмом сахаров и в случае недостатка сахаров активирует 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 et al., 1995; Saier, 1996), в результате чего белок был переименован в Cra (catabolite repressor-activator) (Saier, Ramseier, 1996). В регуляторной области гена *emrR* сайты связывания FruR обнаружены не были.

Основная принятая на сегодняшний день гипотеза воздействия ТГц излучения на живые системы была предложена Г. Фройлихом в 1982 г. (Fröhlich, 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 Н.Д. Девяткова и М.Б. Голанта в формирование представлений о воздействии излучения этого диапазона на живые системы (Девятков, Голант, 1982; Девятков и др., 1983а,б; Девятков, Бецкий, 1985). Была сформулирована гипотеза не только о прямом воздействии излучения на живые системы, но и о модификации степени гидратации органических молекул в воде (Девятков и др., 1982). Полученные нами результаты однозначно свидетельствуют о том, что нетермическое влияние ТГц излучения избирательно включает некоторые генные сети в клетках *E. coli*.

Таким образом, терагерцовое излучение, избирательно возбуждающее отдельные регуляторные элементы клетки, может оказаться мощным научным инструментом, пригодным для исследования внутриклеточных механизмов регуляции метаболизма путем направленного воздействия на отдельные элементы генных сетей.

Благодарности

Работа поддержана грантом «Изучение биологической опасности нетермического воздействия терагерцового излучения на бактерии и клетки человека» (соглашение № 14.616.21.0053 о предоставлении субсидии от 11.11.2015, уникальный идентификатор RFMEFI61615X0053). Эксперименты по облучению проведены на уникальной установке – Новосибирском лазере на свободных электронах в Сибирском центре синхротронного и терагерцового излучения (Институт ядерной физики им. Г.И. Будкера СО РАН).

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

- Девятков Н.Д., Бецкий О.В. Особенности взаимодействия миллиметрового излучения низкой интенсивности с биологическими объектами. Применение миллиметрового излучения низкой интенсивности в биологии и медицине. М., 1985:6-20.
- 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. Докл. АН СССР. 1982;264(6):1409-1411.
- Девятков Н.Д., Бецкий О.В., Ильина С.А., Путвинский А.В. Влияние миллиметрового излучения низкой интенсивности на ионную проницаемость мембран эритроцитов. Эффекты нетеплового воздействия миллиметрового излучения на биологические объекты (под ред. Н.Д. Девяткова). М.: ИРЭ АН СССР. 1983а:78-96.
- Девятков Н.Д., Голант М.Б. Об информационной сущности нетепловых и некоторых энергетических воздействий электромагнитных колебаний на живой организм. Письма в ЖТФ. 1982; 8(1):39-41.
- Девятков Н.Д., Голант М.Б., Тагер А.С. Роль синхронизации в воздействии слабых электромагнитных сигналов миллиметрового диапазона волн на живые организмы. Биофизика. 1983б;28(5): 895-896.
- Хлебодарова Т.М. Как клетки защищаются от стресса? Генетика. 2002;38(4):437-452.
- 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;90(1):43-53.
- Altuvia S., Zhang A., Argamon L., Tiwari A., Storz G. The *Escherichia coli* OxyS regulatory RNA represses *fhfA* translation by blocking ribosome binding. EMBO J. 1998;17(20):6069-6075.
- 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;64(6):2240-2246.
- Arsène F., Tomoyasu T., Bukau B. The heat shock response of *Escherichia coli*. Int. J. Food Microbiol. 2000;55(1-3):3-9.
- 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;96(11):6161-6165.
- 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;62(7):2252-2256.

- Bird L.J., Coleman M.L., Newman D.K. Iron and copper act synergistically to delay anaerobic growth of bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 2013;79(12):3619-3627.
- 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;5:7749. DOI 10.1038/srep07749.
- Borges-Walmsley M.I., Beauchamp J., Kelly S.M., Jumel K., Candler D., Harding S.E., Price N.C., Walmsley A.R. Identification of oligomerization and drug-binding domains of the membrane fusion protein EmrA. *J. Biol. Chem.* 2003;278(15):12903-12912.
- Brown N.L., Stoyanov J.V., Kidd S.P., Hobman J.L. The MerR family of transcriptional regulators. *FEMS Microbiol. Rev.* 2003;27(2-3):145-163.
- Cabiscol E., Tamarit J., Ros J. Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *Intern. Microbiol.* 2000;3(1):3-8.
- 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;192(10):2512-2524.
- de Macario C.E., Macario A.J. Heat-shock response in Archaea. *Trends Biotechnol.* 1994;12(12):512-518.
- 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;34(1):15-21.
- 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. *IEEE Transactions Terahertz Sci. Technol.* 2016;6(3):435-441. DOI 10.1109/TTHZ.2016.2532344.
- Finney L.A., O'Halloran T.V. Transition metal speciation in the cell: insights from the chemistry of metal ion receptors. *Science.* 2003;300(5621):931-936.
- Flint D.H., Tuminello J.F., Emptage M.H. The inactivation of Fe-S cluster containing hydro-lyases by superoxide. *J. Biol. Chem.* 1993;268(30):22369-22376.
- Franke S., Grass G., Rensing C., Nies D.H. Molecular analysis of the copper-transporting efflux system CusCFBA of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 2003;185(13):3804-3812.
- Fröhlich H. What are non-thermal electric biological effects? *Bioelectromagnetics.* 1982;3(1):45-46.
- 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;195(20):4556-4568.
- González-Flecha B., Demple B. Metabolic sources of hydrogen peroxide in aerobically growing *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 1995;270:13681-13687.
- González-Flecha B., Demple B. Genetic responses to free radicals. Homeostasis and gene control. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2000;899:69-87.
- Grass G., Rensing C. Genes involved in copper homeostasis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 2001;183(6):2145-2147.
- 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;186(17):5826-5833.
- Grkovic S., Brown M.H., Skurray R.A. Regulation of bacterial drug export systems. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2002;66(4):671-701.
- Gutteridge J.M., Halliwell B. Comments on review of free radicals in biology and medicine (2nd ed.). *Free Radic. Biol. Med.* 1992;12(1):93-95.
- 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;301(2):235-242.
- Helsel M.E., Franz K.J. Pharmacological activity of metal binding agents that alter copper bioavailability. *Dalton Trans.* 2015;44(19):8760-8770.
- Hengge-Aronis R. Interplay of global regulators and cell physiology in the general stress response of *Escherichia coli*. *Current Opinion Microbiol.* 1999;2(2):148-152.
- Hengge-Aronis R. Signal transduction and regulatory mechanisms involved in control of the σ^S (RpoS) subunit of RNA polymerase. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2002;66(3):373-395.
- 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;274(2):962-971.
- 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;270(36):20908-20914.
- Hidalgo E., Demple B. An iron-sulfur center essential for transcriptional activation by the redox-sensing SoxR protein. *EMBO J.* 1994;13(1):138-146.
- Imlay J.A., Linn S. DNA damage and oxygen radical toxicity. *Science.* 1988;240:1302-1309.
- Imlay K.R., Imlay J.A. Cloning and analysis of *sodC*, encoding the copper-zinc superoxide dismutase of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 1996;178(9):2564-2571.
- Jang S., Imlay J.A. Micromolar intracellular hydrogen peroxide disrupts metabolism by damaging iron-sulfur enzymes. *J. Biol. Chem.* 2007;282(2):929-937.
- 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;5(2B):931-938.
- 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;177(5):1285-1291.
- Liochev S.I., Fridovich I. The role of O₂⁻ in the production of HO: *in vitro* and *in vivo*. *Free Radic. Biol. Med.* 1994;16(1):29-33.
- Loewen P.C., Hu B., Strutinsky J., Sparling R. Regulation in the *rpoS* regulon of *Escherichia coli*. *Can. J. Microbiol.* 1998;44(8):707-717.
- Lomovskaya O., Lewis K., Matin A. EmrR is a negative regulator of the *Escherichia coli* multidrug resistance pump EmrAB. *J. Bacteriol.* 1995;177(9):2328-2334.
- Lushchak V.I. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquat. Toxicol.* 2011;101(1):13-30.
- Macomber L., Imlay J.A. The iron-sulfur clusters of dehydratases are primary intracellular targets of copper toxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2009;106(20):8344-8349.
- Macomber L., Rensing C., Imlay J.A. Intracellular copper does not catalyze the formation of oxidative DNA damage in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 2007;189(5):1616-1626.
- Miller P. F., Sulavik M.C. Overlaps and parallels in the regulation of intrinsic multiple-antibiotic resistance in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 1996;21(3):441-448.
- Morona R., Manning P.A., Reeves P. Identification and characterization of the TolC protein, an outer membrane protein from *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 1983;153(2):693-699.
- Nies D.H. Microbial heavy-metal resistance. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1999;51(6):730-750.
- Nunoshiba T., DeRoja-Walker T., Tannenbaum S.R., Demple B. Roles of nitric oxide in inducible resistance of *Escherichia coli* to activated murine macrophages. *Infect. Immun.* 1995;63(3):794-798.
- 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;276(33):30670-30677.
- 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;275(40):31024-31029.

- Park S., Imlay J.A. High levels of intracellular cysteine promote oxidative DNA damage by driving the Fenton reaction. *J. Bacteriol.* 2003;185(6):1942-1950.
- 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;102(26):9317-9322.
- Pena M.M., Lee J., Thiele D.J. A delicate balance: homeostatic control of copper uptake and distribution. *J. Nutr.* 1999;129(7):1251-1260.
- 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;261(2):289-298.
- Pomposiello P.J., Demple B. Redox-operated genetic switches: the SoxR and OxyR transcription factors. *TRENDS Biotechnol.* 2001;19(3):109-114.
- Putman M., van Veen H.W., Konings W.N. Molecular properties of bacterial multidrug transporters. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2000;64(4):672-693.
- Rademacher C., Masepohl B. Copper-responsive gene regulation in bacteria. *Microbiology.* 2012;158(10):2451-2464. DOI 10.1099/mic.0.058487-0.
- 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;16(6):1157-1169.
- Rensing C., Ghosh M., Rosen B. Families of soft-metal-ion-transporting ATPases. *J. Bacteriol.* 1999;181(9):5891-5897.
- Rowley D.A., Halliwell B. Superoxide-dependent formation of hydroxyl radicals from NADH and NADPH in the presence of iron salts. *FEBS Lett.* 1982;142(1):39-41.
- Saier M.H. Cyclic AMP-independent catabolite repression in bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 1996;138(2-3):97-103.
- Saier M.H., Ramseier T.M. The catabolite repressor/activator (Cra) protein of enteric bacteria. *J. Bacteriol.* 1996;178(12):3411-3417.
- Sakamoto A., Terui Y., Yoshida T., Yamamoto T., Suzuki H., Yamamoto K., Ishihama A., Igarashi K., Kashiwagi K. Three members of polyamine modulon under oxidative stress conditions: two transcription factors (SoxR and EmrR) and a glutathione synthetic enzyme (GshA). *PLoS One.* 2015;10(4). DOI 10.1371/journal.pone.0124883.
- Seoane A.S., Levy S.B. Characterization of MarR, the repressor of the multiple antibiotic resistance (mar) operon in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 1995;177(12):3414-3419.
- Storz G., Tartaglia L.A., Ames B.N. Transcriptional regulator of oxidative stress-inducible genes: direct activation by oxidation. *Science.* 1990;248(4952):189-194.
- 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;7(6):859-864.
- 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;74(24):7463-7470.
- 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;14(3):102-108.
- Tsaneva I.R., Weiss B. SoxR, a locus governing a superoxide response regulon in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 1990;172(8):4197-4205.
- 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;277(37):34055-34066.
- 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;270(17):10323-10327.
- Xiong A., Gottman A., Park C., Baetens M., Pandza S., Matin A. The EmrR protein represses the *Escherichia coli* *emrRAB* multidrug resistance operon by directly binding to its promoter region. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2000;44(10):2905-2907.
- Yamamoto K., Ishihama A. Transcriptional response of *Escherichia coli* to external copper. *Mol. Microbiol.* 2005;56(1):215-227.
- Yoshida M., Kashiwagi K., Shigemasa A., Taniguchi S., Yamamoto K., Makinoshima H., Ishihama A., Igarashi K. A unifying model for the role of polyamines in bacterial cell growth, the polyamine modulon. *J. Biol. Chem.* 2004;279(44):46008-46013.
- 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;17(20):6061-6068.
- 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;24(3):135-141.
- Zheng M., Doan B., Schneider T.D., Storz G. OxyR and SoxRS regulation of fur. *J. Bacteriol.* 1999;181(15):4639-4643.
- 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;183:4562-4570.