

Исследование влияния электромагнитного излучения терагерцового диапазона на протеом экстремофильной археи *Halorubrum saccharovorum*

Т.Н. Горячкова¹, С.Г. Константинова¹, И.А. Мещерякова¹, С.В. Банникова¹, Е.А. Демидов¹, А.В. Брянская¹, М.А. Щеглов², А.И. Семенов², Д.Ю. Ощепков¹, В.М. Попик², С.Е. Пельтек¹

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

В последние десятилетия в связи с появлением новых источников терагерцового излучения и разработкой приборов на его основе проводятся исследования воздействия излучения этого диапазона на живые объекты. Использование терагерцового излучения в системах безопасности контроля и досмотра, диагностическом медицинском оборудовании и научных исследованиях теоретически обусловлено малой энергией кванта этого излучения, не вызывающей негативных последствий при контакте с живыми системами, как это происходит при применении излучения более высокоэнергетических диапазонов. В этой связи изучение эффектов нетермического воздействия терагерцового излучения на живые объекты представляет актуальную задачу. Целью настоящей работы была идентификация комплекса белков, участвующих в ответе клеток археи *Halorubrum saccharovorum* H3, выделенной из природной экстремальной среды обитания, на электромагнитное излучение терагерцового диапазона. Для облучения терагерцовым излучением бактериальных и архейных культур нами разработана микрофлюидная система. Проведено 5-часовое облучение галофильной термостабильной археи *H. saccharovorum* терагерцовым излучением с длиной волны 130 мкм при плотности мощности излучения 0.8 Вт/см². Методами протеомного анализа, включающими двумерный электрофорез с последующей MALDI-TOF масс-спектрометрией, проведена идентификация белков, изменяющих уровень экспрессии в результате нетермического воздействия терагерцового излучения. Выявлено 16 белковых фракций, которые достоверно различаются по уровню концентрации белка (более чем в полтора раза). Полученные данные свидетельствуют о том, что клетки *Halorubrum* реагируют на нетермическое воздействие терагерцового излучения путем изменения экспрессии генов, контролирующих регуляцию системы трансляции.

Ключевые слова: лазер на свободных электронах; терагерцовое излучение; микрофлюидная система; галофильная термостабильная архея.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Горячкова Т.Н., Константинова С.Г., Мещерякова И.А., Банникова С.В., Демидов Е.А., Брянская А.В., Щеглов М.А., Семенов А.И., Ощепков Д.Ю., Попик В.М., Пельтек С.Е. Исследование влияния электромагнитного излучения терагерцового диапазона на протеом экстремофильной археи *Halorubrum saccharovorum*. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016;20(6):869-875. DOI 10.18699/VJ16.205

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Goryachkovskaya T.N., Konstantinova S.H., Meshcheriakova I.A., Bannikova S.V., Demidov E.A., Bryanskaya A.V., Scheglov M.A., Semenov A.I., Oshchepkov D.Yu., Popik V.M., Peltek S.E. The impact of terahertz radiation on an extremophilic archaean *Halorubrum saccharovorum* proteome. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2016;20(6):869-875. DOI 10.18699/VJ16.205

ORIGINAL ARTICLE

Received 03.11.2016

Accepted for publication 09.12.2016

© AUTHORS, 2016

✉ e-mail: tanago@bionet.nsc.ru

The impact of terahertz radiation on an extremophilic archaean *Halorubrum saccharovorum* proteome

T.N. Goryachkovskaya¹, S.H. Konstantinova¹, I.A. Meshcheriakova¹, S.V. Bannikova¹, E.A. Demidov¹, A.V. Bryanskaya¹, M.A. Scheglov², A.I. Semenov², D.Yu. Oshchepkov¹, V.M. Popik², S.E. Peltek¹

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

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

Nonthermal effects of terahertz radiation on living objects are currently intensely studied, as more sources of this radiation type and devices employing it are being constructed. Terahertz radiation is increasingly used in security and inspection systems, medical and scientific appliances due to its low quant energy, which does not cause severe effects on organisms as other radiation types with higher quant energies do. The aim of this study was the identification of protein complexes participating in the response of the archaea *Halorubrum saccharovorum* H3 isolated from an extreme natural environment to terahertz radiation. We developed a microfluidic system for irradiation of bacterial and archaeal cultures with terahertz radiation and performed a 5-hour-long exposure of *H. saccharovorum* to terahertz radiation at a wavelength of 130 μm and a power density of 0.8 Wt per cm² for 5 h. We identified under- or overexpressed proteins in response to terahertz radiation using 2D electrophoresis with subsequent MALDI-TOF mass spectrometry. A total of 16 differentially expressed protein fractions with at least 1.5-fold changes in expression level were detected. The obtained data suggest that *Halorubrum* cells respond to exposure to terahertz radiation by expression changes in gene products involved in translation regulation.

Key words: free electron laser; terahertz radiation; microfluidic system; halophilic thermotolerant archaea.

В последние десятилетия в связи с появлением новых источников терагерцового излучения и разработкой приборов на его основе появилась необходимость исследовать воздействие излучения этого диапазона на живые объекты (Wilmink, Grundt, 2011; Weightman, 2012).

Использование терагерцового (ТГц) излучения в системах безопасности контроля и досмотра, диагностическом медицинском оборудовании и научных исследованиях обусловлено малой энергией кванта этого излучения, не вызывающей негативных последствий при контакте с живыми системами, как это происходит в случае применения излучения других, более высокоэнергетичных диапазонов. При этом сложно ожидать наличия врожденных механизмов защиты от этого излучения, поскольку в атмосфере Земли оно практически полностью поглощается парами воды.

Применение лазеров на свободных электронах (ЛСЭ) открывает уникальные возможности для изучения воздействия ТГц излучения на живые объекты, поскольку позволяет проводить эксперименты в широком диапазоне длин волн и мощностей.

Существует множество гипотез о воздействии электромагнитного излучения на живые системы разного уровня организации (Fröhlich, 1982; Бецкий, 1994; Гапеев, Чемерис, 2000; Бецкий, Лебедева, 2001), но целостного представления, объясняющего многообразные эффекты воздействия излучения с единых позиций, до сих пор нет. Это относится и к терагерцовому диапазону. К настоящему времени большинством исследований не обнаружено влияния ТГц излучения на первичную структуру ДНК. Проведенное нами исследование на уровне генома микроорганизмов также не выявило генотоксических эффектов воздействия ТГц излучения. Полученные данные свидетельствуют об отсутствии мутагенного эффекта ТГц излучения (Sergeeva et al., 2016).

Нами также изучено нетермическое воздействие ТГц излучения на митотический индекс и экспрессию митохондриальных генов стволовых клеток человека (hESCs). Показано, что ТГц излучение не вызывает двунитевых разрывов в хромосомах стволовых клеток человека, однако повышает транскрипцию генов митохондрий (Bogomazova et al., 2015).

При изучении нетермического воздействия ТГц излучения на культуры клеток микроорганизмов нам удалось с помощью геносенсорных конструкций показать, что в клетках *Escherichia coli* индуцируется стрессочувствительный промотор гена каталазы. Известно, что он маркирует сеть ответа клеток *E. coli* на окислительный стресс (Demidova et al., 2013). Также были исследованы геносенсоры *E. coli*/pCOP-A-GFP и *E. coli*/pEmrR-GFP на основе промоторов генов *copA* и *EmrR*. Согласно нашим данным, одними из первых на нетермическое воздействие ТГц излучения реагируют системы контроля окислительного стресса и поддержания гомеостаза переходных металлов, а система контроля устойчивости клеток *E. coli* к присутствию антибиотиков не реагирует на излучение. Индукция ответа геносенсоров носит ярко выраженный пороговый характер по поглощенной дозе и слабо зависит от длины волны терагерцового излучения (Demidova et al., 2016).

В задачу настоящей работы входила идентификация комплекса белков, участвующих в ответе клеток архей *Haloarobacterium saccharovororum* H3, выделенной из природной экстремальной среды обитания, на электромагнитное излучение терагерцового диапазона. Культуры экстремофильных архей интересны тем, что имеют иные метаболические характеристики в сравнении с бактериями *E. coli* и обладают большей устойчивостью к внешним стрессам. Методами протеомного анализа, включающими двумерный электрофорез с последующей MALDI-TOF масс-спектрометрией, проведена идентификация белков, изменяющих уровень экспрессии в результате нетермического воздействия терагерцового излучения.

Материалы и методы

Источник излучения. Эксперименты по изучению воздействия терагерцового излучения на клетки архей *H. saccharovororum* H3 проведены с использованием уникальной установки «Новосибирский лазер на свободных электронах» Института ядерной физики (ИЯФ) СО РАН. В отличие от других источников ТГц излучения, применение ЛСЭ для исследования биологических эффектов излучения имеет ряд преимуществ. Прежде всего, это возможность плавно перестраивать длину волны излучения, что осуществляется изменением энергии электронов и параметров ондулятора. Другим преимуществом является возможность получать очень высокие средние мощности излучения благодаря тому, что в качестве рабочей среды используется электронный пучок (Kulipanov et al., 2008, 2015).

Культура архей. В эксперименте использована культура экстремофильных архей вида *Haloarobacterium saccharovororum* (штамм H3, коллекция лаборатории молекулярных биотехнологий Института цитологии и генетики (ИЦиГ) СО РАН), выделенная из природного образца оз. Бурлинское (Алтайский край), для которого установлено высокое содержание солей в природном растворе (Леонова и др., 2007).

Была отработана методика отбора и культивирования архей. Чистую культуру, полученную из коллекции, высевали на твердую среду S4 следующего состава (г/л): NaCl – 200, MgCl₂ – 5, KCl – 1, CaCl₂ – 1, триптон – 4, дрожжевой экстракт – 2, агар – 15; pH – 7,5. Предварительно чистую культуру разводили более чем в 1 000 раз, что обеспечивало рост колоний из единичных клеток. Эти колонии служили исходным материалом для получения культур и осуществления их периодического культивирования в жидкой среде S4 состава (г/л): NaCl – 200, MgCl₂ – 5, KCl – 1, CaCl₂ – 1, триптон – 4, дрожжевой экстракт – 2; pH – 7,5.

Концентрацию клеток в периодических культурах определяли спектрофотометрически (Epoch Microplate Spectrophotometer, BioTek) по оптической плотности. Исследование показало, что экспоненциальная фаза роста культуры при 37 °C длится не более 48 ч – с 24 по 72-й час культивирования.

Из полученных колоний были отобраны две, имеющие наибольшую скорость роста при периодическом культивировании на жидкой среде S4. Эти колонии послужили исходным посевным материалом для двух биологических

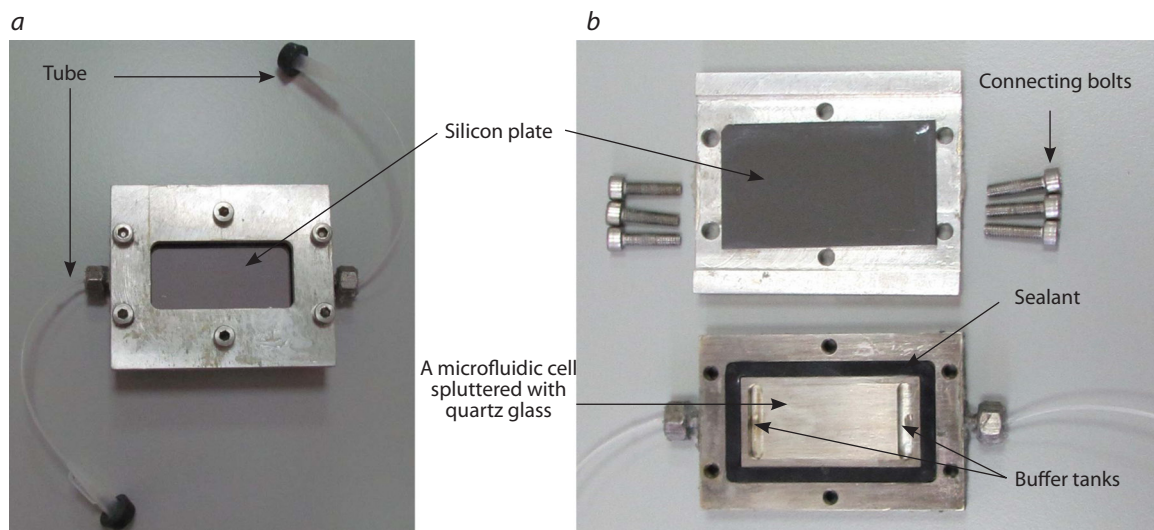


Fig. 1. (a) A microfluidic cuvette for irradiation of liquid cultures; (b) cuvette components.

повторов в дальнейших экспериментах. Исходя из характера кривой роста культур, была выбрана точка отбора образцов – на 60 ч культивирования – для облучения терагерцовым излучением.

Микрофлюидная кювета. Принимая во внимание, что глубина поглощения терагерцового излучения водными растворами составляет несколько десятков микрон, для облучения больших объемов культуры *H. saccharovorum* была сконструирована и изготовлена микрофлюидная проточная кювета с крышкой из высокоомного кремния (с малым поглощением терагерцового излучения), обеспечивающая ламинарный поток слоя жидкости толщиной 40 мкм перпендикулярно потоку излучения.

Материалом для тела кюветы послужил инвар (сплав на основе железа и никеля марки 36Н) с напылением тонкого слоя (~1 мкм) инертного материала – кварцевого стекла, для исключения влияния материала кюветы на состав культуральной среды.

Линейный коэффициент температурного расширения кварцевого стекла близок к таковому для инвара и составляет $1 \times 10^{-6} \text{ K}^{-1}$, что обеспечивает равномерный контакт этих материалов в широком диапазоне температур.

Крышка кюветы, через которую производилось облучение, представляла собой пластину высокоомного кремния толщиной 2 мм, закрепленную в рамке-держателе также из инвара (рис. 1). Проток жидкости через микрофлюидную систему осуществляли при помощи перистальтического насоса (ЛКВ, Швеция), который соединяли с микрофлюидной кюветой полипропиленовыми трубками. Ламинарное течение культуральной жидкости через кювету обеспечивалось скоростью потока и специально сделанными в теле кюветы (на входе и выходе) буферными емкостями.

Облучение клеток *H. saccharovorum*. Эксперименты проводили на биологической станции Сибирского центра синхротронного и терагерцового излучения ИЯФ СО РАН, куда по специальному каналу подается излучение Новосибирского ЛСЭ.

Параметры излучения Новосибирского ЛСЭ приведены ниже:

Длина волны	0.05–0.24 мм
Длительность импульса	50 пс
Частота следования импульсов	2.8–11.2 МГц
Средняя мощность	до 400 Вт
Пиковая мощность	до 1 МВт
Минимальная относительная ширина линии	$3 \cdot 10^{-3}$

Клетки облучали терагерцовым излучением с длиной волны 130 мкм в течение 5 ч при плотности мощности излучения 0.8 Вт/см^2 в микрофлюидной проточной кювете, перпендикулярной потоку излучения (рис. 2). Температу-

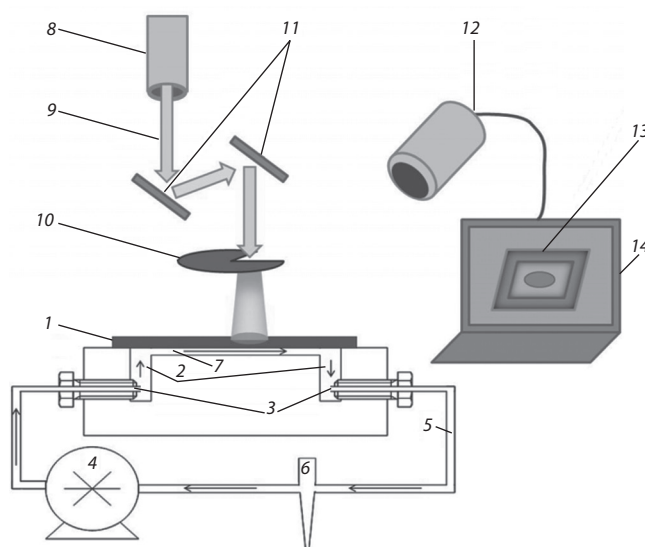


Fig. 2. Experimental facility: 1, cuvette lid (a quartz plate); 2, buffer tanks; 3, tube connection points; 4, peristaltic pump; 5, pump tubes; 6, aeration tube; 7, chamber for cell culture; 8, the Novosibirsk FEL; 9, THz radiation; 10, shutter; 11, mirrors; 12, thermal camera; 13, thermal image of the cuvette; 14, computer.

ру 42 ± 2 °C на поверхности кюветы поддерживали путем регулировки средней мощности излучения обтюратором, вращающимся при помощи электромотора. Обтюратор представлял собой два медных круга, имеющих общую ось вращения, в каждом из которых было сделано секторальное отверстие. Поворот кругов друг относительно друга регулировал площадь открытого отверстия и, таким образом, среднюю мощность излучения при облучении образцов. Контроль температуры осуществляли с помощью тепловизора ТКВр-СВИТ101 (Kuryshv et al., 1998). Контрольные клетки циркулировали в такой же кювете в течение 5 ч в термостате при 42 °C. Для проведения протеомного анализа облученные и контрольные клетки собирали центрифугированием и лизировали добавлением лизирующего буфера.

Выделение общего белка при высоком содержании солей в среде. Белки галофильных архей относятся к экстремально кислым (средняя рI 4.5) и имеют высокий отрицательный поверхностный заряд, что является адаптивным приспособлением к существованию в условиях осмотического стресса. Это делает их непростым объектом для протеомных исследований. Для проведения двумерного электрофореза подобных белков необходимо избавиться от солей и преодолеть сильный катодный дрейф, приводящий к искажению картины двумерного электрофореза, особенно для белков с высоким молекулярным весом.

Для выделения общего белка была использована методика C.W. Cho et al. (2003) с модификациями. Клетки осаждали центрифугированием при 5900 g в течение 15 мин. Полученный осадок ресуспендировали в десятикратном объеме лизирующего буфера, содержащего 10 mM ЭДТА, 20 mM трис-HCl pH 8.0, 1 mM PMSF, 0.5 mM ДТТ, 0.2 % CHAPS¹. После этого клетки дезинтегрировали на ультразвуковом дезинтеграторе Ultrasonic processor CPX 130 (Cole Parmer, США) в течение 10 мин (режим – 2 с импульс, 8 с выключен) на льду. К полученному гомогенату добавляли ДНКазу в концентрации 100 мкг/мл и инкубировали на льду в течение часа. Гомогенат осветляли центрифугированием при 4 °C в течение 20 мин на 15700 g. Для удаления солей и низкомолекулярных примесей супернатант пропускали через хроматографическую колонку MicroBioSpin6 (BioRad, США). Дополнительно белок очищали с помощью ReadyPrep 2-D Cleanup Kit (BioRad, США). Осадок растворяли в буфере для изоэлектрофокусирования (7 M мочевины, 2 M тиомочевина, 4 % CHAPS, 65 mM ДТТ, 0.4 % амфолит pH3-10, 1 mM PMSF). Концентрацию белка определяли с помощью Quick Start Bradford Dye Reagent (BioRad, США).

Проведение двумерного электрофореза. Для проведения двумерного электрофореза выделенный белок наносили на 17 см стрип, pH 3–6 (ReadyStrip™ IPG Strip, BioRad, США). Для аналитических гелей брали по 100 мкг белка, для препаративного геля – 300 мкг. Стрипы помещали в камеру для изоэлектрофокусирования Protean IEF Cell (BioRad, США). Регидратировали при 50 мА на стрип при 20 °C в течение 12 ч. Изоэлектрофокусирование

проводили при 50 мА на стрип при 20 °C в следующем режиме: линейное повышение напряжения до 250 В в течение 20 мин, затем до 5700 В в течение 2.5 ч, и далее выдерживали при 5700 В до достижения 40000 вольт-часов. Стрипы выдерживали 15 мин в уравнивающем буфере (6 M мочевины, 2%-й ДСН, 20%-й глицерин, 0.375 M трис-HCl pH 8.8, 130 mM ДТТ), затем 15 мин в уравнивающем буфере (6 M мочевины, 2%-й ДСН, 20%-й глицерин, 0.375 M трис-HCl pH 8.8, 200 mM иод-ацетамид), промывали в ДСН трис-глициновом буфере (pH 8.3) и накладывали на 12%-й ПААГ-ДСН. Разделение белка во втором направлении проводили в 12 % ПААГ-ДСН при 16 мА/гель в течение 30 мин, затем при 24 мА/гель в течение 5 ч в камере PROTEAN II xi multi-cell (BioRad, США). Аналитические гели окрашивали флуоресцентным красителем SYPRO Ruby Protein Gel Stain (BioRad, США), препаративный гель – флуоресцентным красителем Flamingo (BioRad, США). Гели фотографировали при помощи геледокументирующей системы Versadoc MP4000 (BioRad, США). Данные анализировали, используя PDQuest Advanced 2-D Analysis Software (BioRad, США).

Фракции белка с достоверно меняющейся концентрацией (критерий Стьюдента, $p < 0.01$) вырезали из препаративного геля при помощи прибора EXQuest Spot Cutter (BioRad, США) и промывали 0.2 M бикарбонатом аммония в 50 % ацетонитриле при 37 °C 10 мин. После высушивания с помощью ацетонитрила проводили гидролиз белка, регидратируя гели раствором модифицированного свиного трипсина (Trypsin Gold, Mass Spectrometry Grade, Promega, США) с концентрацией 0.02 mM/мл в 40 mM бикарбонате аммония в 10 % ацетонитриле. Регидратированные кусочки геля инкубировали при 37 °C в течение 16 ч.

Идентификация белков. Для экстракции пептидов в каждую пробирку с отдельными фракциями белка добавляли по 20 мкл 5 % ТФУ (Sigma) в воде. Инкубировали 45 мин на шейкере при 36 °C. Выделение и очистку триптических пептидов проводили при помощи Millipore ZIPTIP C18 (Millipore, США). Очищенные пептиды смешивали с насыщенным раствором матрицы – α -циано-4-гидроксикоричной кислоты (Bruker, Германия) в 70 % AcN (Merck) и 0.1 % ТФУ (Sigma). Аликвоту (1 мкл) полученной смеси наносили на металлическую мишень масс-спектрометра и высушивали на воздухе. Измерения выполняли на приборе Ultraflex III (Bruker, Германия) со следующими параметрами: ускоряющее напряжение 25 кВ, напряжение рефлектрона 26.3 кВ, диапазон масс 500–3500 Да, задержка экстракции 200 нс. Калибровку прибора производили с использованием стандартного триптического гидролизата бычьего сывороточного альбумина (Bruker, Германия) по следующим массам (Да): 937.48, 1163.63, 1283.71, 1305.71, 1399.69, 1439.81, 1479.79, 1567.74, 1639.93, 1724.84, 1880.92, 1907.92, 2045.02.

Белки были идентифицированы с использованием поискового алгоритма Mascot (<http://matrixscience.com/home.html>) и базы данных SwissProt. Параметры поиска: ошибка масс ± 0.05 Да; число сайтов недогидролиза трипсином – 1; возможные модификации – окисление метионинов и карбамидометилирование цистеинов. Для корректной идентификации белков и определения их функциональной

¹ Здесь и далее: ДСН – додецилсульфат натрия; ДТТ – дитиотреитол; CHAPS – 3-[(3-холомидопропил)-диметиламмоний]-1-пропансульфонат; ПААГ – полиакриламидный гель; ЭДТА – этилендиаминтетраацетат; PMSF – фенилметилсульфонилфторид.

роли в геноме были использованы результаты проведенного нами ранее полногеномного секвенирования и аннотации генома *H. saccharovorum* H3 (Rozanov et al., 2015).

Биоинформационный анализ данных. Для проведения анализа обогащения по терминам Gene Ontology (GO) нами осуществлен поиск наиболее близких гомологов *E. coli* K-12 для выявленных белков *H. saccharovorum* H3. Поиск проводили путем выравнивания полученных белковых последовательностей с белковыми последовательностями *E. coli* K-12 инструментом BLASTP 2.3.0+, реализованным в базе данных EcoCyc (<http://www.ecocyc.org/>).

Анализ терминов GO проводили инструментом PANTHER (Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships) Classification System (Mi et al., 2016) (<http://pantherdb.org/>).

Результаты и обсуждение

Проведено две серии экспериментов с тремя техническими повторами. Результаты одного из разделений белка культуры клеток *H. saccharovorum* H3 представлены на рис. 3. При сравнении электрофореграмм белков, выделенных из облученных и контрольных культур, было обнаружено 16 белковых фракций протеома архей с достоверными различиями концентрации более чем в полтора раза (см. рис. 3). В результате нетермического воздействия ТГц излучения концентрация белков в основном снижалась – 13 фракций. Из 13 фракций, изменяющих свою экспрессию под действием ТГц излучения, методами масс-спектрометрии были идентифицированы семь фракций (табл. 1). Увеличение концентрации установлено только в трех фракциях (№ 4, 5, 10), одна из которых была идентифицирована как гликозилтрансфераза (см. табл. 1, № 5). Клеточная стенка архей сложена белковыми глобулами, образующими так называемый S-слой. Большая часть белков S-слоя имеет гликозилированную форму. Гликозилтрансфераза осуществляет сборку N-связанных пентасахаридов, которые покрывают гликопротеины S-слоя (Schäffer, Messner, 2004). Увеличение концентрации гликозилтрансферазы в протеоме бактерии может быть вызвано возбуждением за

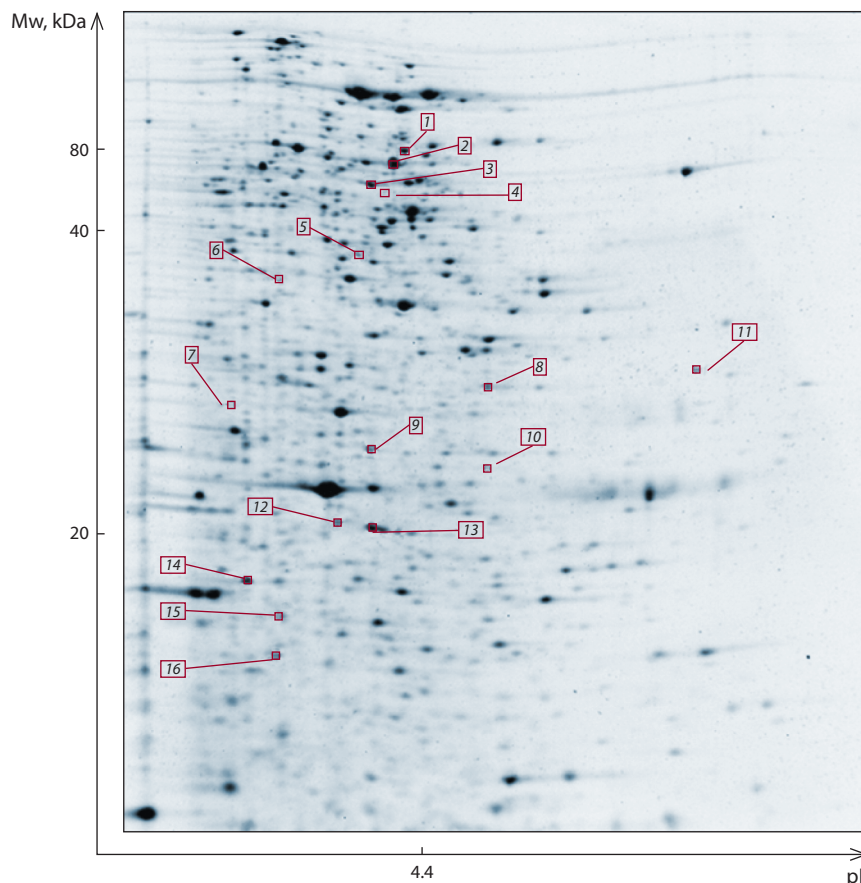


Fig. 3. 2D SDS-PAGE of the total protein fraction of *H. saccharovorum* H3 stained with Flamingo. Enumerated (1–16) arrows point to fractions with at least 1.5-fold increase or decrease in response to the irradiation.

счет ТГц излучения водородных связей в клеточной мембране *H. saccharovorum* H3, которое приводит к нарушению структуры S-слоя (Abu-Qarn et al., 2008; Kandiba et al., 2013).

При помощи базы данных UniProt Knowledgebase (UniProtKB, <http://www.uniprot.org/>) для идентифицированных белков были установлены молекулярная функция и биологический процесс, в котором они участвуют (см. табл. 1). Определение проводили по термину «название белка» и термину «Haloarobacterium» в поле «организм».

Эксперименты проводились в условиях строгого контроля температуры опытных и контрольных образцов, поэтому наблюдаемые изменения в протеомном профиле вызваны нетермическим воздействием ТГц излучения. Как известно, тепловой шок индуцирует продукцию нескольких белков теплового шока. О нетермическом характере воздействия ТГц излучения свидетельствует и отсутствие белков теплового шока среди идентифицированных в эксперименте белковых фракций.

Результаты поиска наиболее близких гомологов *E. coli* K-12 для выявленных белков *H. saccharovorum* H3 представлены в табл. 2. Здесь же приведены Score и E-value выравнивания белковых последовательностей. Поиск выполнялся путем выравнивания последовательностей пептидов, полученных в результате масс-спектрометрической идентификации, с белковыми последовательностями *E. coli* K-12, представленными в базе данных EcoCyc (<http://www.ecocyc.org/>).

По выявленным гомологам *E. coli* K-12 был проведен анализ обогащения, согласно терминам базы данных Gene Ontology (PANTHER Protein Class). При этом значимое обогащение наблюдалось по факторам элонгации трансляции

Table 1. Identified *H. saccharovororum* H3 protein bands

No.	Name	Mw/pI	Score	Sequence coverage, %	Pathway	Function	Δ
1	Translation_elongation_factor_2	41473/4.67	137	41	Protein biosynthesis	Translation elongation factor	-
2	Translation_elongation_factor_1α subunit	47629/4.36	181	53			-
3	Translation_elongation_factor_1α subunit	47629/4.36	140	46			-
5	Glycosyltransferase	37455/4.33	113	41	Biosynthesis	Transferase	+
6	Eukaryotic_translation_initiation_factor_2α subunit	26724/4.15	54	26	Protein biosynthesis	Translation initiation factor	-
12	Thiosulfate_sulfurtransferase 2 C_rhodanese	34809/4.34	75	38	Metabolic processes	Transferase	-
13	Adenine phosphoribosyl transferase	20841/4.33	78	49	Nucleotide metabolism	Adenine phosphoribosyl transferase	-

Abbreviations: -, downregulation in response to THz; +, upregulation. Fractions 2 and 3 are identified as a single protein.

Table 2. Search for *E. coli* K-12 genes expressing proteins homologous to *H. saccharovororum* H3 whose concentrations are altered by THz irradiation

<i>H. saccharovororum</i> H3 protein homolog	<i>H. saccharovororum</i> protein sequence	Homologous <i>E. coli</i> K-12 gene	Score	E-value
Translation_elongation_factor_2	1 MGRKKIVQE CERLMDSPEN IRNIAIAAHV DHGKTTLSDN LLAGAGMISQ 51 DTAGEQLAMD TKEDEQERGI TIDAANVSMT HEYEDTNHLI NLIDTPGHVD 101 FGGDVTRAMR AVDGALVVVD AVEGAMPQTE TVLRQALREG VKPALFINKV 151 DRLISELCEG PQEMQERLMS VIADVNELIR GMAENMDDIP EDWTVSVEDG 201 TVGFGSALYK WGVSMPSMQR TGMDFADIME LEQNDERQEL HERTPLSDVV 251 LDMVCEHFPN PVDAQPRRPV RIWRGDAESE LADTMRMVNE DGEVVMVMTD 301 ISMDPHAGEI ATGRVFSGLT EKGQELYVSG TAGKTASRAS GSSWGPSARK 351 WTASRRGTSR PSPACVTPSP APPSPPPWR	bipA	117	2e-29
Translation_elongation_factor_1α subunit	1 MESTETYSQS ALARDYPMSD KPHQNLAIIG HVDHKGKSTLV GRLLFETGSV 51 PEHVIEQHRE EAEKGGKGGF EFAYVMDNLA EERERGVTD IAHQEFDTDN 101 YYFTIVDCPG HRDFVKNMIT GASQADNAV LVAADDGVAP QTREHVFLLR 151 TLGINELIIG VNKMDLVDYS EDSYKQVIDE VEDLLNQVRF ATEDTSFVPI 201 SAFEGDNVAE ASENTPWYDG DTLLESLNDL PESEPPTDAP LRLPIQDVYT 251 ISGIGTVVPG RVETGILNTG DNVSFQPSDV GGEVKTVMH HEEVPKAEPG 301 DNVGFNVRGI GKDDIRRGDV CGPADDPPSV AETFQAQVVV MQHPSVITAG 351 YTPVFHAHTA QVACTIESID QKIDPSSGEV AEENPDFIKS GDAAVTVTRP 401 QKPLSIEPSG EIPELGSFAI RDMGQTIAAG KVLEVNER	tufB	186	1e-54
Glycosyltransferase (EC_2.4.1.-)	1 MLGWGYPPNI TGGLDVHVG E LFSGLRDDFG VDATLVLPAE FAPDEPGIE 51 PVETGAGDVA ARVDRLSDRF AELAPDHDI HTHDWFYGYG GRKAARASDA 101 TWVSSFHSLA SDRNIDPPTR EVETERRLAN AADTNIAVSE LVREDIRELY 151 DADSRVYNG FSTPTFSGKD VREDLGIDGE MLFFVGRHTD QKGISHLLYA 201 MRKLHRPGVT LVVGGSGHQT DQLKRFAELL GIEDRVEFVG YVPEALGDY 251 YAAADAFVSP SYAEPFGITI TEALESQTQV VATRSGVAEV LPDDCLVEVE 301 VDESIVDGI TTALDREPP EYERREWSDV TEDTLAVYED VA	wcaL	46.2	2e-06
Eukaryotic_translation_initiation_factor_2α subunit	1 MFVDLDEYED KRGLCHISEV ASGWIKNVRD HVREGQTVVA KVLVDVDESSN 51 QIDLSIKDVN EHQRKDKIQD WKNSQKADNW MLIALGEDVD DDRYTEVANA 101 LLVEYDSLVD AFESAASIGE EALDVDIDD DALDAVVEAA RDNVSPYVD 151 VTGYVDLESM GPDGVDDVKA ALEAAEGNGE VPDGVDLEVG YVGSPEYRIK 201 VRAPDYKTAE DQLEAAAARA REAIEAAGGV GEFHRRERED DE	pnp	43.1	1e-05
Adenine phosphoribosyl transferase (EC_2.4.2.7)	1 MDQLRQSLLD APIIEKGEYQ YFVHPISDGV PMLKPELLRE IVIRIRKAE 51 LENVDKIVTP AAMGIHISTA LSLMTDIPLV VIRKROYGLD GEVPLFQETG 101 YSESEMYIND VEEGDRVLVL DDVLSTGGTM KAILDALTNE VGAEVVDVVA 151 VIKKAGENEL DQTDYNVKTL INVTVEDGEV VIVDAKGDD	apt	41.2	1e-05
Rhodanese (EC_2.8.1.1)	1 MPEDSLVTAD WVEENLEKFE SDDPAYRLVE INNPTVTDES DYPYEEGHI 51 PGALNFEWDE VFTDKTERDI VSKEKFAERN GEGGIEADTT VVYGGGRVP 101 NWFALFGYWI KYKYGHDDVR VIDGGKGYWV ENDYPLSTEE PDFTPREYEA 151 RGPFEVSRAY KDDIDNAIED GLPMVDVRSR EEFSGEVIAP EGLMETAQRG 201 GHIPGASSVP IGTTLNEDGT FKSREELREL YADAGVDGNE STITYCRVGE 251 RSSIEWFLH ELLGYDDVRN YDGSWTEWGN LVGARSRRAS KEVGRDRDRTD 301 VFLNSRC	sseA	103	2e-26

(более чем в 86.98 раза, p -value 2.26E-02) и по ГТФ-связывающим белкам (более чем в 64.09 раза, p -value 4.15E-02).

Клетки микроорганизмов осуществляют постоянный мониторинг физико-химических условий среды, в которой они находятся, с тем чтобы координировать экспрессию генов в соответствии с внешними условиями. Эта регуляция происходит на разных уровнях – на уровне инициации транскрипции, на уровне синтеза и деградации мРНК, на уровне синтеза белка. Выживание клетки в экстремальных условиях требует адекватной регуляции экспрессии генов, включая контроль трансляции. Анализ протеома показывает, что четыре из шести генов *Halorubrum*, которые снижают экспрессию под воздействием ТГц излучения, связаны с контролем процесса трансляции.

Ранее нами было изучено влияние нетермического воздействия ТГц излучения на стресс-реактивные системы клеток *E. coli*. Было показано, что на ТГц излучение реагируют в первую очередь и сильнее всего гены, индуцируемые в ответ на окислительный стресс, слабее – гены, связанные с поддержанием гомеостаза меди, и совсем не реагируют гены, контролирующие устойчивость к антибиотикам. Таким образом, ТГц излучение селективно воздействует на разные стрессовые системы *E. coli* и существенно влияет на жизненно важный гомеостаз окислительных процессов.

Сравнение результатов анализа протеомного ответа на нетермическое воздействие терагерцового излучения показало, что для клеток *E. coli* наблюдается ответ систем, связанных прежде всего с окислительным стрессом, в то время как реакция клеток *H. saccharovororum* обусловлена регуляцией синтеза белка и мембранными процессами.

Бактерия *E. coli* – облигатный анаэроб, обитающий в кишечнике млекопитающих, а архея *H. saccharovororum* – свободно живущий экстремофил. Возможно, столь разные реакции этих микроорганизмов на нетермическое воздействие ТГц излучения объясняются различием занимаемых ими экологических ниш и способов адаптации к ним.

Acknowledgments

This work was supported by the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Integrated Program II.2P, project 0324-2015-0025. Irradiation experiments were performed on a unique device, the Novosibirsk free-electron laser, at the Siberian Synchrotron and Terahertz Radiation Center (Budker Institute of Nuclear Physics, Novosibirsk).

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Abu-Qarn M., Eichler J., Sharon N. Not just for Eukarya anymore: protein glycosylation in Bacteria and Archaea. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2008;18:544-550.
- Betskiy O.V. On the mechanisms of the interaction between low-intensity millimeter waves and biologic objects. *Izvestiya vysshikh uchebnykh zavedeniy. Radiofizika = News of Institutes of Higher Education. Radiophysics.* 1994;37:30-41. (in Russian)
- Betskiy O.V., Lebedeva N.N. Present-day notions of the action of low-intensity millimeter waves on biologic objects. *Millimetrovye volny v biologii i meditsine = Millimeter waves in biology and medicine.* 2001;24:5-19. (in Russian)

- 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.
- Cho C.-W., Lee S.-H., Choi J., Park S.-J., Ha D.-J., Kim H.-J., Kim C.-W. Improvement of the two-dimensional gel electrophoresis analysis for the proteome study of *Halobacterium salinarum*. *Proteomics.* 2003;3:2325-2329.
- 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;34:15-21.
- 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 Transact. Terahertz Sci. Technol.* 2016;6(3):435-441.
- Fröhlich H. What are non-thermal electric biological effects? *Bioelectromagnetics.* 1982;3(1):45-46.
- Gapeev A.B., Chemeris N.K. The model-based approach to the analysis of the action of modulated electromagnetic radiation on animal cells. *Biofizika = Biophysics.* 2000;45:299-312. (in Russian)
- Mi H., Poudel S., Muruganujan A., Casagrande J.T., Thomas P.D. PANTHER version 10: expanded protein families and functions, and analysis tools. *Nucl. Acids Res.* 2016;44:D336-D342. DOI 10.1093/nar/gkv1194.
- Kandiba L., Aitio O., Helin J., Guan Z., Permi P., Bamford D.H., Eichler J., Roine E. Diversity in prokaryotic glycosylation: an archaeal-derived N-linked glycan contains legionaminic acid. *Mol. Microbiol.* 2013;84:578-593.
- Kulipanov G.N., Bagryanskaya E.G., Chesnokov E.N., Choporova Yu.Yu., Gerasimov V.V., Getmanov Ya.V., Kiselev S.L., Knyazev B.A., Kubarev V.V., Peltek S.E., Popik V.M., Salikova T.V., Scheglov M.A., Seredniakov S.S., Shevchenko O.A., Skrinisky A.N., Veber S.L., Vinokurov N.A. Novosibirsk Free Electron Laser – facility description and recent experiments. *IEEE Transact. Terahertz Sci. Technol.* 2015;5:798-809.
- Kulipanov G.N., Gavrilov N.G., Knyazev B.A., Kolobanov E.I., Kotenkov V.V., Kubarev V.V., Matveenko A.N., Medvedev L.E., Miginsky S.V., Mironenko L.A., Ovchar V.K., Popik V.M., Salikova T.V., Scheglov M.A., Serednyakov S.S., Shevchenko O.A., Skrinisky A.N., Tcheskidov V.G., Vinokurov N.A. Research highlights from the Novosibirsk 400 W average power THz FEL. *Terahertz Sci. Technol.* 2008;1(2):107-125.
- Kuryshv G.L., Kovchantsev A.P., Vainer B.G. Medical thermal imager based on matrix photodetector 128 × 128 operating in the spectral range 2.8–3.05 μm. *Avtometriya.* 1998;4:5-12. (in Russian)
- Leonova G.A., Bogush A.A., Bobrov V.A., Bychinskiy V.A., Trofimova L.B., Malikov Yu.I. Ecogeographical assessment of salt lakes of Altai Krai. *Geografiya i prirodnye resursy = Geography and Natural Resources.* 2007;1:51-59. (in Russian)
- Rozanov A.S., Bryanskaya A.V., Malup T.K., Kotenko A.V., Peltek S.E. Draft genome sequence of a *Halorubrum* H3 strain isolated from the Burlinskoye salt lake (Altai Krai, Russia). *Genome Announc.* 2015;3(3):e00566-15.
- Schäffer C., Messner P. Surface-layer glycoproteins: an example for the diversity of bacterial glycosylation with promising impacts on nanobiotechnology. *Glycobiology.* 2004;14:31R-42R.
- Sergeeva S., Demidova E., Sinityna O., Goryachkovskaya T., Bryanskaya A., Semenov A., Meshcheryakova I., Dianov G., Popik V., Peltek S. 2.3 THz radiation: Absence of genotoxicity/mutagenicity in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 2016;803-804:34-38.
- Weightman P. Prospects for the study of biological systems with high power sources of terahertz radiation. *Phys. Biol.* 2012;9:053001.
- Wilmink G.J., Grundt J.E. Invited review article: Current state of research on biological effects of terahertz radiation. *J. Infrared Milli. Terahz. Waves.* 2011;32:1074-1122.