

РОЛЬ ПОЛИАМИНОВ В РЕГУЛЯЦИИ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ПЕРСИСТЕНЦИИ *

А.Г. Ткаченко, *Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН*

Е.А. Хаова, *Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН*

Н.М. Кашеварова, *Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН*

Л.Ю. Нестерова, *Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН*

А.В. Ахова, *Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН*

Р.Ю. Сидоров, *Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН*

И.В. Цыганов, *Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН*

На основе использования методов репортерных генных слияний, ПЦР в реальном времени, сопряженной с обратной транскрипцией, а также генных нокаутов показано участие генов стрессорного ответа *rpoS*, *rnf*, *relA* и *spoT* в формировании персисторного состояния в клетках периодической культуры *Escherichia coli* при переходе в стационарную фазу. В этот период уровни экспрессии изученных генов положительно модулируются полиаминами (путресцин, спермидин, кадаверин) пропорционально их концентрации. Таким образом, эффект полиаминов направлен на усиление функции глобальных клеточных регуляторов, участвующих в стрессорных ответах и формировании персисторных клеток. Результаты, полученные в данной работе, могут быть использованы для разработки новых антибактериальных препаратов, а также методов усиления действия традиционных клинических антибиотиков.

Ключевые слова: персистенция, антибиотики, толерантность, полиамины, генная экспрессия.

Введение

Полиамины представляют собой эволюционно древние молекулы, что обуславливает их распространение среди представителей всех царств живых организмов, от бактерий и вирусных частиц до человека [7, 28]. Наиболее распространенными формами полиаминов являются путресцин, спермидин и кадаверин, которые преобладают у прокариот (бактерии), а также спермин, присутствующий, дополнительно к вышеперечисленным,

в эукариотических клетках высших организмов. Важной особенностью этих природных соединений является наличие в их молекулах аминогрупп, протонированных в условиях внутриклеточного содержимого, что придает им свойства поликатионов и определяет тип их взаимодействия с основными биополимерами клетки, несущими отрицательный заряд (ДНК, РНК, рибосомы, фосфолипиды).

В последнее время показано, что полиамины, связываясь с рибосомальными структурами, играют важную роль

* Работа осуществлялась при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 16-44-590279) и выполнена в рамках государственного задания (Тема № 01201353249).

в обеспечении их нормального функционирования [8]. Наряду с положительным воздействием на конструктивный обмен в целом, полиамины оказывают также избирательный эффект в отношении экспрессии некоторых генов (большинство из которых является транскрипционными регуляторами) за счет влияния на вторичную структуру мРНК. Это послужило основанием для отнесения данной группы генов к категории полиаминового модулона [19].

Участие полиаминов в транскрипционной регуляции обуславливает их существенную роль в формировании адаптивных ответов микроорганизмов на стресс, изучение которых в течение многих лет является приоритетным направлением наших исследований. Основным выводом по результатам этих исследований является то, что адаптивные функции полиаминов при сублетальных стрессах направлены на ограничение повреждающих воздействий путем перепрограммирования генной экспрессии на активацию стрессорных ответов и ограничение поступления антибиотиков в клетку [1–6, 33–35]. Это сопровождается замедлением скорости пролиферации и метаболизма при воздействии стрессорных факторов, что приводит к формированию персистерного состояния, характеризующегося высоким уровнем толерантности микроорганизмов к антибиотикам [9, 16, 23].

Персисторы представляют собой субпопуляцию микроорганизмов, которые, в силу случайных или индуцированных стрессорными воздействиями изменений метаболизма, приобретают высокоуровневую фенотипическую толерантность к стрессам и антибиотикам [11, 14]. Как правило, эти изменения характеризуются замедлением скорости метаболических реакций вплоть до развития дормантных состояний по аналогии со спячкой животных организмов. В этих условиях подавляющее большинство клинических антибиотиков, для которых мишенью воздействия являются процессы,

ассоциированные с биосинтезом, становятся неактивными, однако после прекращения действия антибиотиков персисторы «пробуждаются», то есть восстанавливают нормальную скорость метаболизма, и ничем не отличаются от обычных клеток. Таким образом, в отличие от антибиотикорезистентных клеток с наследственно закрепленным свойством устойчивости, персисторы сохраняют свой генотип неизменным. В случае болезнетворных форм микроорганизмов персисторы не только являются одной из основных причин затяжных хронических инфекций, но, сохраняя жизнеспособность в условиях воздействия антибиотиков, являются резервуаром для отбора форм с наследственно закрепленной резистентностью [37].

Впервые участие полиаминов в персистообразовании показано нами на примере главного регулятора общего стрессорного ответа RpoS, а также генов стационарной фазы, находящихся под его регуляторным влиянием [4, 34].

Продолжение исследований по данному направлению, в том числе в рамках проекта РФФИ, привело к более глубокому пониманию генетической природы формирования механизмов персистообразования и роли полиаминов в этом процессе.

Цель исследований – изучение роли полиаминов (путресцин, спермидин, кадаверин) в формировании персистерных форм *E. coli*, обладающих высокой физиологической толерантностью к антибиотикам.

Достижению поставленной цели способствовало решение следующих фундаментальных задач: 1) описание зависимости персистообразования от концентрации полиаминов; 2) создание коллекции рекомбинантных штаммов *E. coli* с репортерными генными слияниями, а также делецией контролируемых полиаминами генов; 3) исследование регуляторных функций полиаминов в генно-экспрессионных механизмах персистообразования; 4) выяснение роли генов полиаминового модулона в этом процессе.

Материалы и методы

В качестве объектов исследования использованы штаммы *E. coli* (табл.). Родительский штамм BW25141 любезно предоставлен К.В. Севериновым, полиамин-дефицитный штамм HT306 получен из коллекции Йельского университета CGSC, The Coli Genetic Stock Center. Остальные штаммы сконструированы в ходе выполнения данной работы.

Для выяснения роли исследуемых генов в персистенции получены штаммы с единичными и множественными нокаутами в генах *rpoS*, *yqjD* и *rmf* по методу Datsenko и Wanner [12]. Частоту персистенции определяли с помощью метода Keren et al.[22]. Для определения экспрессии изучаемых генов сконструированы репортерные трансляционные слияния в соответствии с протоколом, предложенным Simons et al.[31].

Экспрессию генов определяли на транскрипционном уровне с помощью двух методов: Миллера [26] и полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени с предварительным проведением обратной транскрипции. РНК выделяли из бактериальной культуры родительского штамма BW25141 с помощью коммерческого набора «GeneJET Purification Kit»

(«Thermo Fisher Scientific», США) согласно протоколу. Концентрацию РНК в полученных пробах измеряли при OD₂₆₀, качество проб оценивали по OD₂₆₀/OD₂₈₀ и OD₂₆₀/OD₂₃₀ при помощи спектрофотометра NanoDrop 2000 («Thermo Fisher Scientific», США) и методом электрофореза в 1%-ном агарозном геле с окрашиванием бромистым этидием. Пробы обрабатывали ДНКазой, входящей в состав коммерческого набора «Turbo™ DNase» (2U/мкл) («Thermo Fisher Scientific», США). В качестве матрицы для обратной транскрипции использовали 100 нг суммарной РНК. Также в состав реакционной смеси входили: праймеры Random 9 («Евроген», Россия) 5мкМ, смесь dNTPs («Thermo Fisher Scientific», США) 1 мМ, ревертаза 200U «Thermo Scientific RevertAid Reverse Transcriptase» с буфером («Thermo Fisher Scientific», США). Реакцию проводили при 42°C 1 ч с предварительной инкубацией при комнатной температуре 10 мин и с последующей инактивацией при 70°C 10 мин. Синтезированную кДНК использовали в качестве матрицы для ПЦР в реальном времени.

Праймеры подобраны с помощью программы PrimerSelect версия 7.1.0 (DNASTAR Inc.). Реакцию проводили при

Штаммы, использованные в работе

Штамм	Генотип
BW25141	F-, Δ(<i>araD-araB</i>)567, Δ <i>lacZ</i> 4787(::rrnB-3), Δ(<i>phoB-phoR</i>)580, λ- <i>galU</i> 95, Δ <i>uidA</i> 3::pir ⁺ , <i>recA</i> 1, <i>endA</i> 9(del-ins)::FRT, <i>rph</i> -1, Δ(<i>rhaD-rhaB</i>)568, <i>hsdR</i> 514
EAT01	как BW25141, но Δ <i>rmf</i>
EAT02	как BW25141, но Δ <i>yqjD</i>
EAT03	как BW25141, но Δ <i>rpoS</i>
EAT04	как BW25141, но Δ <i>rpoS</i> Δ <i>rmf</i>
EAT06	как BW25141, но Δ <i>rpoS</i> Δ <i>rmf</i> Δ <i>yqjD</i>
SRY1	как BW25141, но Δ <i>relA</i>
SRY2	как BW25141, но Δ <i>relA</i> Δ <i>spoT</i>
EAT08	как BW25141, но λRS5 <i>rpoS</i> 742::lacZ(Hyb)
EKH1	как BW25141, но Δ <i>yqjD</i> Δ <i>rmf</i>
EKH3	как BW25141, но λRS45 <i>yqjD</i> 234::lacZ(Hyb)
EKH4	как BW25141, но λRS45 <i>rmf</i> 39::lacZ(Hyb)
EKH5	как EAT03, но λRS45 <i>yqjD</i> 234::lacZ(Hyb)
HT306	F-, <i>thr</i> -1, <i>araC</i> 14, Δ <i>speD</i> 98, Δ(<i>gpt-proA</i>)62, <i>lacY</i> 1, <i>glnX</i> 44(AS), <i>galK</i> 2(Oc), λ-(<i>speB-speA</i>)97, Δ(<i>speC-glcB</i>)63, <i>rpsL</i> 25(strR), <i>xylA</i> 5, <i>mtl</i> -1, <i>thiE</i> 1, <i>ampCp</i> -1, <i>cadA</i> 2
SHT02	как HT306, но Δ <i>lacZ</i>
EKH7	как SHT02, но λRS45 <i>yqjD</i> 234::lacZ(Hyb)
SHT03	как SHT02, но λRS5 <i>rpoS</i> 742::lacZ(Hyb)

помощи коммерческого набора «qPCRmix-HS SYBR» («Евроген», Россия) на амплификаторе «CFX96 RT Systems C1000 Thermal Cycler» («BioRad», США). Процедура ПЦР включала начальную денатурацию 95°C 5 мин, далее следовали 40 циклов из последовательно повторяющихся шагов: денатурация – 95°C 15 с, отжиг праймеров – 60°C 15 с, элонгация – 72°C 15 с. После завершения ПЦР строили кривую диссоциации для оценки наличия димеров праймеров и других артефактов. Эффективность реакций и пороговые циклы устанавливали при помощи программы LinRegPCR (2014.x) [29]. Полученные данные нормализованы с использованием геномной ДНК.

Для выяснения влияния продукта экспрессии гена *rpoS* на экспрессию гена *yqjD* слияние *yqjD::lacZ* перенесено в *rpoS*-нокаутный штамм EAT03 с использованием в качестве вектора фага λ RS45 [31]. Для определения влияния полиаминов на экспрессию генов *rpoS* и *yqjD* соответствующие репортерные слияния перенесены в полиамин-дефицитный штамм SHT02 с использованием в качестве вектора фага λ RS45 [31].

Перед экспериментом штаммы, сохраняемые на скошенном LB-агаре («Sigma», США) под слоем вазелина при +4°C, высевали на 5 мл питательной среды LB («Sigma», США) с добавлением соответствующих антибиотиков: ампициллина (50 мкг/мл) («MP Biomedicals», Франция), канамицина (50 мкг/мл) («Синтез», Россия), стрептомицина (25 мкг/мл) («GERBU Biotechnik GmbH», Германия). После 6 часов культивирования в термостате при 37°C клетки переносили на 50 мл богатой среды LB в колбу Эрленмейера (250 мл) с добавлением антибиотиков, а клетки полиамин-дефицитных штаммов EKH7 и SHT03 – на 50 мл минимальной среды M-9 с добавлением 0,4%-ной глюкозы, пролина (0,1 мг/мл), тиамина (0,01 мг/мл), пантотеновой кислоты (0,01 мг/мл) и соответствующих антибиотиков. Клетки культивировали 16 ч в термостатируемом шейкере

GFL1092 («GFL», Германия) при 37°C 120 об./мин. Далее для проведения эксперимента культуру переносили на 50 мл свежей среды с теми же добавками, доводя плотность культуры на среде LB до OD₆₀₀=0,1 и на среде M-9 до OD₆₀₀=0,45. Культивировали при тех же условиях. Биомассу клеток оценивали после предварительного разведения культуры физиологическим раствором по оптической плотности на спектрофотометре UV-VIS Spectrophotometer PD-303UV («Apel», Япония).

Статистическую обработку результатов исследования проводили с использованием пакета стандартных программ Statistica for Windows 6.0. Повторность всех экспериментов 3–5-кратная.

Результаты

Изучение интенсивности персистообразования в процессе периодического роста полиамин-профицитных штаммов *E.coli* MC4100 и BW25141, растущих на синтетической среде M-9, показало, что переход клеток из фазы экспоненциального роста в стационарную фазу сопровождается возрастанием на 4–5 порядков частоты персистерных клеток, толерантных к 2,8 мкг/мл нетилмицина. В то же время в контрольной культуре полиамин-дефицитного мутанта *E. coli* SHT03 число толерантных бактерий варьировалось в пределах одного порядка (рис. 1).

Добавка в среду культивирования разных концентраций полиаминов вызывала концентрационно-зависимое возрастание числа толерантных персистерных клеток при переходе в стационарную фазу роста. При этом эффективность полиаминов как стимуляторов персистообразования возрастала в ряду кадаверин → путресцин → спермидин (рис. 2).

На основании анализа информации о генах, которые могут быть функционально связанными с формированием дормантного состояния у микроорганизмов и одновременно находиться под регуляторным воздействием полиаминов,

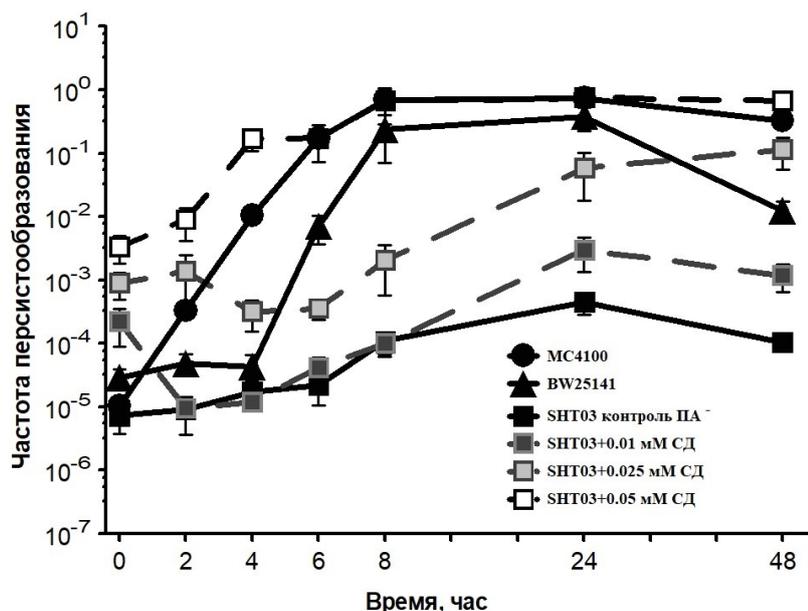


Рис. 1. Зависимость персистенции от фазы роста и содержания полиаминов в периодической культуре *E. coli*, растущей на минеральной среде М-9. Полиамин-профицитные штаммы *E. coli* MC4100 и BW25141 культивировали без добавки полиаминов, тогда как полиамин-дефицитный мутант SHT03 выращивали как в отсутствие полиаминов – контроль (ПА⁻) (сплошная линия), так и с добавлением разных концентраций спермидина (СД): 0,01; 0,025; 0,05 мМ (пунктирные линии)

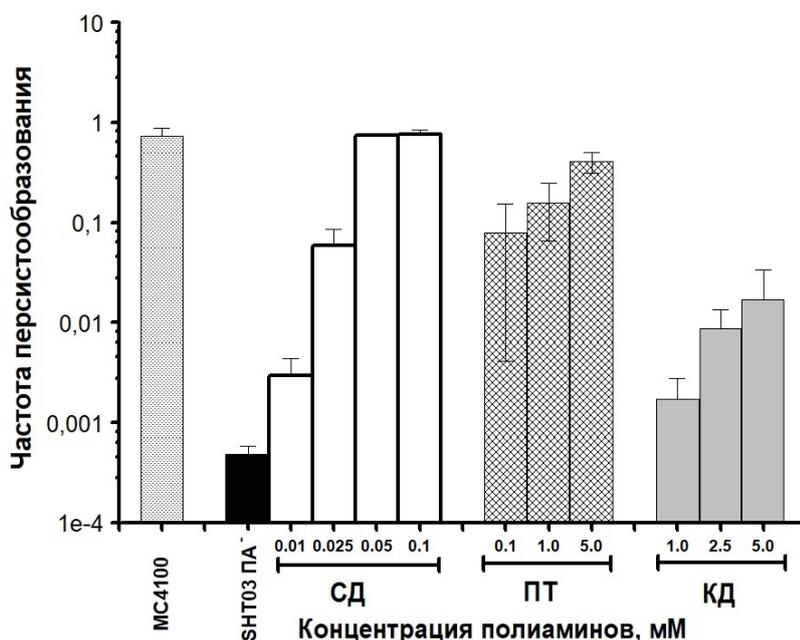


Рис. 2. Зависимость частоты персистенции в культуре полиамин-дефицитного штамма *E. coli* SHT03 от концентрации спермидина (СД), путресцина (ПТ) и кадаверина (КД), добавляемых к среде культивирования. Для сравнения приведены значения частоты персистенции в культуре полиамин-профицитного штамма MC4100. Клетки выращивали на синтетической среде М-9, частоту персисторных клеток, толерантных к 2,8 мкг/мл нетилмицина, определяли спустя 24 часа культивирования после внесения полиаминов в растущую культуру. Для этого клетки, взятые из различных вариантов культур, обрабатывали антибиотиком в течение 3 ч и после разведения высевали на чашки с LB агаром. Спустя 24 ч культивирования чашек в термостате учитывали количество персисторных клеток

нами проведены исследования по изучению роли генов *rpoS*, *rmf*, *yqjD*, *relA* и *spoT*, участвующих в регуляции общего стрессорного ответа.

Известно, что ген *rpoS* кодирует σ^S -субъединицу РНК-полимеразы. Гены, промоторы которых имеют сродство к данной σ -субъединице, объединены в структуру *rpoS*-регулона и участвуют в адаптации к стрессам преимущественно при переходе в стационарную фазу роста [1, 17]. Гены *relA* и *spoT* кодируют (p)ppGpp-синтетазу и (p)ppGpp-синтетазу/гидролазу, соответственно. При этом для SpoT сигналом для синтеза (p)ppGpp является отклонение скорости трансляции от максимальной, тогда как RelA реагирует на истощение в клетках хотя бы одной из аминокислот.

Незаряженные тРНК, связываясь с аминокислотным центром рибосом, служат для RelA в качестве сигнала, индуцирующего синтез (p)ppGpp. Первоначально (p)ppGpp был описан как сигнал стресса голодания и отнесен к категории алармонов, участвующих в адаптации к аминокислотному голоданию. Однако в настоящее время показано его участие в регуляции множества процессов в бактериальной клетке, связанных с ее ростом, адаптацией к стрессам, вторичным метаболизмом, персистенцией, клеточным делением, подвижностью, биоопленкообразованием и вирулентностью. Под регуляторным контролем (p)ppGpp находятся около 500 генов, и этот

список постоянно пополняется [2, 16]. Одним из них является ген стационарной фазы *rmf* [21]. Продукт его экспрессии, белок RMF, ингибирует трансляцию, превращая рибосомы в неактивную димерную форму [36]. Перечисленные гены могут рассматриваться как возможные кандидаты для участия в формировании персистерного состояния в клетках *E. coli*.

Для их изучения на базе родительских полиамин-профицитного *E. coli* BW25141 и полиамин-дефицитного *E. coli* SHT02 штаммов нами сконструированы транскрипционные и трансляционные репортерные *lacZ* слияния, а также нокаутные мутации с генами *rpoS*, *rmf*, *yqjD*, *relA* и *spoT*. Кроме того, нами получены также множественные – двойные и тройные – нокаутные штаммы $\Delta rpoS\Delta rmf$, $\Delta rpoS\Delta rmf\Delta yqjD$ и $\Delta relA\Delta spoT$. Набор генов, экспрессия которых положительно регулируется полиаминами, принято объединять термином «полиаминовый модулон» [20]. Среди исследованных нами генов к категории полиаминового модулона относятся *rpoS*, *rmf* и *spoT* [32], экспрессия которых непосредственно модулируется полиаминами, тогда как *yqjD* экспрессируется при участии σ^S -субъединицы РНК-полимеразы (продукт гена *rpoS*) и, следовательно, полиамины принимают в его регуляции опосредованное участие [38].

Нами изучено влияние полиаминов на экспрессию генов *rpoS* и *yqjD* на транскрипционном уровне (рис. 3).

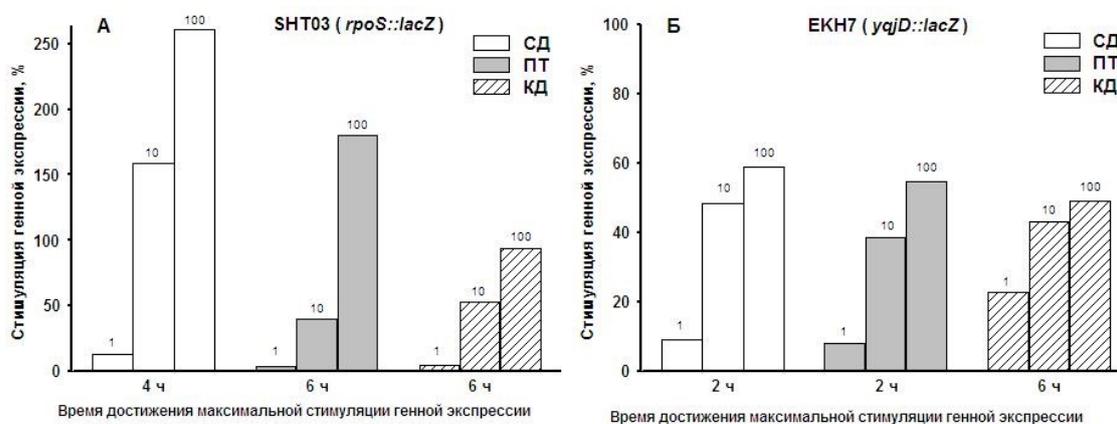


Рис. 3. Полиамины как положительные модуляторы экспрессии генов *rpoS* (*E. coli* SHT03) (А) и *yqjD* (*E. coli* EKH7) (Б) на транскрипционном уровне СД – спермидин, ПТ – путресцин, КД – кадаверин. Используемые концентрации полиаминов (μM) указаны цифрами над столбцами

Для этого использованы штаммы, в хромосоме которых сконструированы трансляционные генные слияния *rpoS::lacZ* и *yqjD::lacZ*. Результаты исследования показывают, что полиамины стимулируют экспрессию изучаемых генов. При этом стимуляция носит концентрационно-зависимый характер и по времени достижения максимального уровня специфична для различных генов и полиаминов. Наибольшее влияние на экспрессию гена *rpoS* оказывает спермидин, несколько меньшее – путресцин, наименее выраженный эффект вызывает кадаверин.

Для подтверждения зависимости экспрессии *yqjD* от продукта *rpoS* гена нами определены уровни его экспрессии в клетках с нормально функционирующим *rpoS* геном в штамме *E. coli* ЕКН3 (*rpoS*⁺) в сравнении с клетками, несущими делеционную мутацию *rpoS* в штамме *E. coli* ЕКН5, в условиях периодического культивирования (рис. 4). Показано, что в *rpoS*-клетках экспрессия *yqjD* практически не изменяется, тогда как в контрольном *rpoS*⁺ штамме имеет место ее значительное возрастание во время перехода клеток в стационарную фазу, когда наблюдается значительное возрастание внутриклеточного содержания RpoS белка [18, 30, 34]. Полученные нами

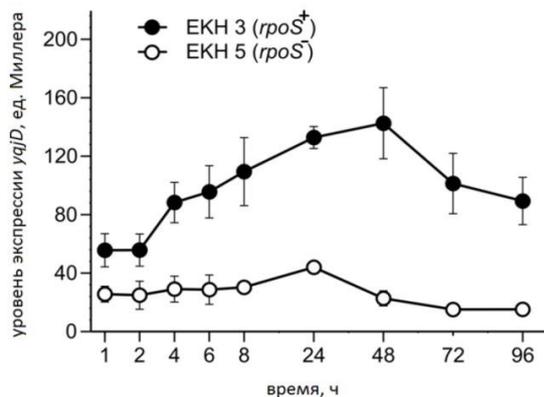


Рис. 4. *rpoS*-зависимая экспрессия гена *yqjD*

результаты согласуются с ранее опубликованными данными [38].

Переход бактерий в стационарную фазу в настоящее время широко используется для моделирования персистенции в периодических культурах *E. coli* [10]. Для изучения функциональной активности исследуемых генов в процессе периодического роста измеряли уровень трансляционной экспрессии генов *rpoS*, *rmf* и *yqjD* родительского штамма (рис. 5) в сравнении с частотой персисторных клеток в контрольном и нокаутированных штаммах (рис. 6).

Результаты экспериментов свидетельствуют о том, что экспрессия *rpoS* возрастает при переходе бактериальной культу-

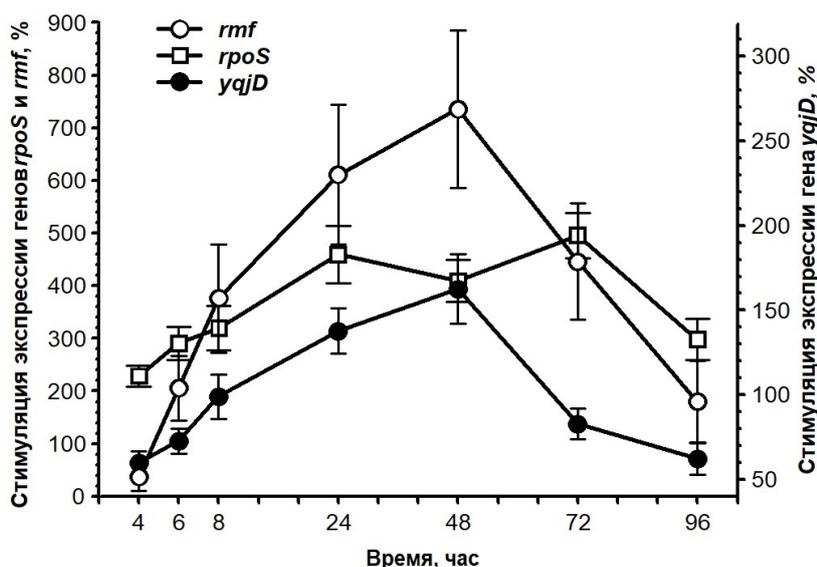


Рис. 5. Изменение экспрессии генов *rpoS*, *rmf* и *yqjD* в процессе перехода клеток от экспоненциальной к стационарной фазе периодической культуры *E. coli* BW25141

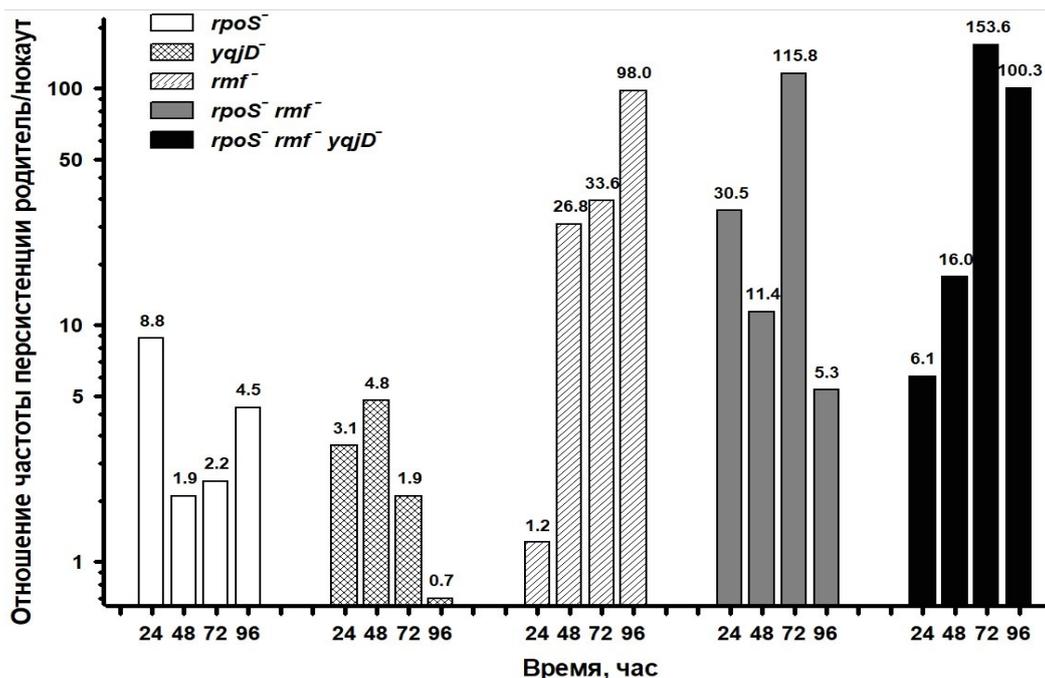


Рис. 6. Влияние единичных нокаутов в генах *rpoS* (*E. coli* EAT03), *yqjD* (*E. coli* EAT02) и *rmf* (*E. coli* EAT01), а также множественных нокаутов в генах *rpoS*, *rmf* (*E. coli* EAT04) и *rpoS*, *rmf*, *yqjD* (*E. coli* EAT06) на частоту персистенции
Эффект генных нокаутов количественно выражен частным от деления частоты персистенции в родительском штамме на ее значение в нокаутированном штамме и указан цифрами над столбцами, подсчитанными на соответствующий час культивирования

ры родительского штамма в стационарную фазу роста и достигает максимума на 24-м часу культивирования. В это время нокаутный штамм $\Delta rpoS$ демонстрирует наибольшее снижение частоты персистенции по сравнению с контрольным штаммом. Следовательно, ген *rpoS* участвует в регуляции персистенции преимущественно в ранней стационарной фазе. Однако его вклад в персистообразование после некоторого снижения вновь постепенно возрастает к поздней стационарной фазе (96 ч). В отличие от *rpoS*, наибольший вклад гена *yqjD* проявляется на 48 часу культивирования, а для *rmf* – резко возрастает в период от 48 до 96 часов наблюдения, когда нокаутирование данных генов дает наибольший отрицательный эффект на частоту персистеров в культуре. Это совпадает с максимальным уровнем генной экспрессии, что подтверждает их роль в формировании персистерного состояния в поздней стационарной фазе.

Данные, полученные с помощью штаммов с единичными нокаутными мутация-

ми, подтверждены на двойном нокауте (*rpoS rmf*), который демонстрирует два периода падения частоты персистообразования по сравнению с контрольным родительским штаммом, а также на тройном нокауте (*rpoS rmf yqjD*), характеризующемся наибольшим отрицательным эффектом на процесс персистообразования (см. рис. 6). Это подтверждает вовлеченность всех изученных нами генов в механизм формирования персистеров у *E. coli*.

Участие генов *rpoS*, *rmf*, *relA* и *spoT* в регуляции бактериальной персистенции связано с комплексным воздействием на клетки в этот период различных стрессоров, включая голодание, накопление метаболитов, закисление среды, недостаток кислорода и другие, что активирует механизмы общего стрессорного ответа. Результатом действия этих механизмов может быть формирование состояния замедления скорости метаболических процессов (дормантного состояния), способствующего развитию персистенции [24, 25]. В частности, это может происходить под

регуляторным контролем (p)ppGpp (продукт генов *relA* и *spoT*), который, согласно данным литературы, ингибирует транскрипцию генов *rnn* и тем самым снижает количество рибосом в клетке. Помимо этого, (p)ppGpp, опосредованно активируя Lon-протеазы, высвобождает токсины, входящие в состав токсин-анти-токсиновых систем [15].

Результаты исследования уровня генной экспрессии методом ПЦР в реальном времени с обратной транскрипцией показали, что максимальный уровень представленности транскриптов *relA* наблюдается в ранней стационарной фазе, тогда как *spoT* – в поздней стационарной фазе, что совпадает со снижением частоты персистеров в нокаутных штаммах (рис. 7). Это свидетельствует о преобладающей роли гена *spoT*, входящего в состав полиаминового модулона, в регуляции персистенции по сравнению с *relA*

Наряду с участием (p)ppGpp в регуляции токсин-антитоксиновых систем [15], он играет существенную роль в индукции транскрипции гена *rpoS* и повышении стабильности его продукта [13]. Под ре-

гуляторным контролем (p)ppGpp находится также исследованный нами ген *rmf* [27]. На основании описанных выше данных можно говорить о решающем значении (p)ppGpp для формирования персистерных клеток, что объясняет значительное снижение частоты персистенции нокаутных штаммов $\Delta relA$ и $\Delta relA\Delta spoT$ в поздней стационарной фазе (см. рис. 7).

Таким образом, на основании комплексной оценки данных определения уровня генной экспрессии методами репортерных генных слияний и ПЦР в реальном времени, сопряженной с обратной транскрипцией, в сопоставлении с результатами генного нокаутирования показано участие генов стрессорного ответа *rpoS*, *rmf*, *relA* и *spoT* в формировании персистерного состояния клеток *E. coli*. Уровень экспрессии этих генов положительно модулируется полиаминами, максимальное накопление которых происходит в стационарной фазе. Следовательно, действие полиаминов направлено на усиление функции глобальных клеточных регуляторов, обеспечивающих общий стрессорный ответ и развитие персистерного состояния

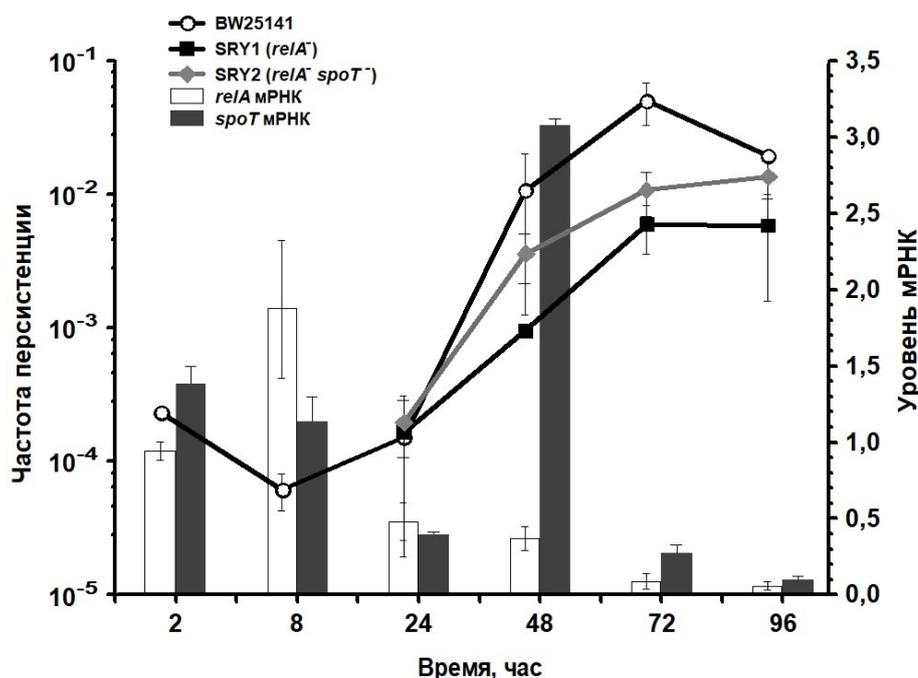


Рис. 7. Роль генов *relA* и *spoT* в регуляции персистенции *E. coli*

Столбцами обозначены уровни содержания мРНК в клетках *E. coli* для генов *relA* и *spoT*, кривые демонстрируют изменение частоты персистенции в культуре родительского штамма *E. coli* BW25141 в сравнении с делеционными мутантами по генам *relA* (*E. coli* SRY1) и *spoT* (*E. coli* SRY2)

высокой толерантности. Полученные результаты представляют интерес для понимания механизмов формирования бактериальной персистенции, которая в настоящее время рассматривается как первый этап в развитии наследственно закреплен-

ных свойств резистентности к антибиотикам и, следовательно, в перспективе могут быть использованы для разработки технологии усиления активности традиционных антибиотиков и разработки новых антибактериальных средств.

Библиографический список

1. *Ткаченко А.* Молекулярные механизмы стрессорных ответов у микроорганизмов – Екатеринбург: УрО РАН, 2012. – 268 с.
2. *Ткаченко А.Г.* Стрессорные ответы бактериальных клеток как механизм развития толерантности к антибиотикам (обзор) // Прикладная биохимия и микробиология. – 2018. – 54 (2). – С. 110–133.
3. *Ткаченко А.Г., Пожидаева О.Н., Шумков М.С.* Роль полиаминов в формировании множественной антибиотикоустойчивости *Escherichia coli* в условиях стрессорных воздействий // Биохимия. – 2006. – 71 (9). – С. 1287–1296.
4. *Ткаченко А.Г., Шумков М.С.* Роль путресцина в регуляции уровня σ S-субъединицы РНК-полимеразы в клетках *Escherichia coli* при переходе к стационарной фазе // Биохимия. – 2004. – 69(8). – С. 1079–1087.
5. *Ткаченко А.Г., Шумков М.С., Ахова А.В.* Путресцин как модулятор содержания σ S-субъединицы РНК-полимеразы в клетках *Escherichia coli* при кислотном стрессе // Биохимия. – 2006. – 71(2). – С. 237–246.
6. *Ткаченко А.Г., Шумков М.С., Ахова А.В.* Адаптивные функции полиаминов при сублетальных воздействиях антибиотиков // Микробиология. – 2009. – 78(1). С. 32–41.
7. *Agostinelli E., Marques M.P., Calheiros R., Gil F.P., Tempera G., Viceconte N., Battaglia V., Grancara S., Toninello A.* Polyamines: fundamental characters in chemistry and biology // *Amino Acids*. – 2010. – Vol. 38. – № 2. – P. 393–403.
8. *Amarantos I., Zarkadis I.K., Kalpaxis D.L.* The identification of spermine binding sites in 16S rRNA allows interpretation of the spermine effect on ribosomal 30S subunit functions // *Nucleic Acids Res.* – 2002. – Vol. 30. – № 13. – P. 2832–2843.
9. *Amato S.M., Fazen C.H., Henry T.C., Mok W.W., Orman M.A., Sandvik E.L., Volzing K.G., Brynildsen M.P.* The role of metabolism in bacterial persistence // *Front. Microbiol.* – 2014. – Vol. 5. – P. 1–9.
10. *Balaban N.Q., Merrin J., Chait R., Kowalik L., Leibler S.* Bacterial Persistence as a Phenotypic Switch // *Science*. – 2004. – Vol. 305. – № 5690. – P. 1622–1625.
11. *Balaban N.Q., Helaine S., Lewis K., et al.* Definitions and guidelines for research on antibiotic persistence // *Nature Reviews Microbiology*. – 2019. – Vol. 17. – P. 441–448.
12. *Datsenko K.A., Wanner B.L.* One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2000. – Vol. 97. – № 12. – P. 6640–6645.
13. *Gaca A.O., Colomer-Winter C., Lemos J.A.* Many means to a common end: the intricacies of (p)ppGpp metabolism and its control of bacterial homeostasis // *Journal of Bacteriology*. – 2015. – Vol. 197. – № 7. – P. 1146–1156.
14. *Gollan B., Grabe G., Michaux C., Helaine S.* Bacterial persisters and infection: past, present, and progressing // *Annu. Rev. Microbiol.* – 2019. – Vol. 73. – P. 359–385.
15. *Harms A., Brodersen D.E., Mitarai N., Gerdes K.* Toxins, targets, and triggers: an overview of toxin-antitoxin biology // *Mol. Cell*. – 2018. – Vol. 70. – № 5. – P. 768–784.
16. *Hauryluk V., Atkinson G.C., Murakami K.S., Tenson T., Gerdes K.* Recent functional insights into the role of (p)ppGpp in bacterial physiology // *Nat. Rev. Micro.* – 2015. – Vol. 13. – № 5. – P. 298–309.
17. *Hengge-Aronis R.* Recent insights into the general stress response regulatory network in *Escherichia coli* // *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* – 2002. – Vol. 4. – № 3. – P. 341–346.
18. *Hirsch M., Elliott T.* Stationary-phase regulation of RpoS translation in *Escherichia coli* // *J. Bacteriol.* – 2005. – Vol. 187. – № 21. – P. 7204–7213.
19. *Igarashi K., Kashiwagi K.* Polyamine Modulon in *Escherichia coli*: genes involved in the stimulation of cell growth by polyamines // *J. Biochem.* – 2006. – Vol. 139. – № 1. P. 11–16.
20. *Igarashi K., Kashiwagi K.* Characterization of genes for polyamine modulon // *Methods Mol. Biol.* – 2011. – Vol. 720. – P. 51–65.
21. *Izutsu K., Wada A., Wada C.* Expression of ribosome modulation factor (RMF) in *Escherichia coli* requires ppGpp // *Genes Cells*. – 2001. – Vol. 6. – № 8. – P. 665–676.
22. *Keren I., Kaldalu N., Spoering A., Wang Y., Lewis K.* Persister cells and tolerance to antimicrobials // *FEMS Microbiol. Lett.* – 2004. – Vol. 230. – № 1. – P. 13–18.
23. *Kim J.-S., Wood T.K.* Persistent Persister Misperceptions // *Frontiers in Microbiology*. – 2016. – Vol. 7. – 2134.
24. *Lewis K.* Persister cells // *Annu. Rev. Microbiol.* – 2010. – Vol. 64. – № 15. – P. 357–372.

25. *Maisonneuve E., Gerdes K.* Molecular Mechanisms Underlying Bacterial Persisters // *Cell.* – 2014. – Vol. 157. – № 3. – P. 539–548.
26. *Miller J.H.* Experiments in molecular genetics – Cold Spring Harbor Laboratory: New York, 1972. – Vol. 60.
27. *Radzikowski J.L., Vedelaar S., Siegel D., Ortega A.D., Schmidt A., Heinemann M.* Bacterial persistence is an active sigmaS stress response to metabolic flux limitation // *Mol. Syst. Biol.* – 2016. – Vol. 12. – № 9. – 882.
28. *Rhee H.J., Kim E.J., Lee J.K.* Physiological polyamines: simple primordial stress molecules // *Journal of Cellular and Molecular Medicine.* – 2007. – Vol. 11. – № 4. – P. 685–703.
29. *Ruijter J.M., Ramakers C., Hoogaars W.M., Karlen Y., Bakker O., van den Hoff M.J., Moorman A.F.* Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data // *Nucleic Acids Res.* – 2009. – Vol. 37. – № 6. – e45.
30. *Schellhorn H.E.* Elucidating the function of the RpoS regulon // *Future Microbiol.* – 2014. – Vol. 9. – № 4. – P. 497–507.
31. *Simons, R.W., Houman F., Kleckner N.* Improved single and multicopy lac-based cloning vectors for protein and operon fusions // *Gene.* – 1987. – Vol. 53. – № 1. – P. 85–96.
32. *Terui Y., Akiyama M., Sakamoto A., Tomitori H., Yamamoto K., Ishihama A., Igarashi K. Kashiwagi K.* Increase in cell viability by polyamines through stimulation of the synthesis of ppGpp regulatory protein and omega protein of RNA polymerase in *Escherichia coli* // *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* – 2012. – Vol. 44. – № 2. – P. 412–422.
33. *Tkachenko A.G., Nesterova L.Y., Pshenichnov M.* The role of the natural polyamine putrescine in defense against oxidative stress in *Escherichia coli* // *Arch. Microbiol.* – 2001. – Vol. 176. – № 1-2. – P. 155–157.
34. *Tkachenko A.G., Kashevarova N.M., Karavaeva E.A., Shumkov M.S.* Putrescine controls the formation of *Escherichia coli* persister cells tolerant to aminoglycoside netilmicin // *FEMS Microbiol. Lett.* – 2014. – Vol. 361. – P. 25–33.
35. *Tkachenko A.G., Kashevarova N.M., Tyuleneva E.A., Shumkov M.S.* Stationary-phase genes upregulated by polyamines are responsible for the formation of *Escherichia coli* persister cells tolerant to netilmicin // *FEMS Microbiol. Lett.* – 2017. – Vol. 364. – № 9. – fnx084.
36. *Wada A.* Growth phase coupled modulation of *Escherichia coli* ribosomes // *Genes Cells.* – 1998. – Vol. 3. – № 4. – P. 203–208.
37. *Windels E.M., Michiels J.E., Fauvart M., Wenseleers T., Van den Bergh B., Michiels J.* Bacterial persistence promotes the evolution of antibiotic resistance by increasing survival and mutation rates // *Isme. J.* – 2019. – Vol. 13. – № 5. – P. 1239–1251.
38. *Yoshida H., Maki Y., Furuike S., Sakai A., Ueta M., Wada A.* YqjD is an inner membrane protein associated with stationary-phase ribosomes in *Escherichia coli* // *J. Bacteriol.* – 2012. – Vol. 194. – № 16. – P. 4178–4183.

THE ROLE OF POLYAMINES IN THE REGULATION OF BACTERIAL PERSISTENCE

A.G. Tkachenko, E.A. Khaova, N.M. Kashevarova, L.Yu. Nesterova, A.V. Akhova,
R.Yu. Sidorov, I.V. Tsyganov

Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms UB RAS

Using the complex of methods including reporter gene fusions, quantitative reverse transcriptase PCR and gene knockout mutations the participation of stress response genes (*rpoS*, *rmf*, *relA* и *spoT*) in persister cell formation was revealed in *E. coli* batch cultures during transition to stationary phase. The expression levels of these genes are positively modulated by polyamines (putrescine, spermidine, cadaverine) in a concentration-dependent manner. So, effects of polyamines accumulated by stationary phase cells are targeted to the potentiation of the functions of cell global regulators implicated in stress response and persister cell formation. The data obtained in this work might be used for developing novel approaches targeted to the potentiation of traditional clinical antibiotics or elaboration of new antibacterials.

Keywords: persistence, antibiotics, tolerance, polyamines, gene expression.

Сведения об авторах

Ткаченко Александр Георгиевич, доктор медицинских наук, профессор, заведующий лабораторией адаптации микроорганизмов, Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН – филиал Пермского федерального исследовательского центра УрО РАН (ИЭГМ УрО РАН), 614081, г. Пермь, ул. Голева, 13; e-mail: agtkachenko@iegm.ru

Хаова Елена Александровна, аспирант, ИЭГМ УрО РАН; e-mail: akkuzina-elena510@mail.ru

Кашеварова Наталья Михайловна, младший научный сотрудник, ИЭГМ УрО РАН; e-mail: nkashev@mail.ru

Нестерова Лариса Юрьевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, ИЭГМ УрО РАН; e-mail: larisa.nesterova@bk.ru

Ахова Анна Викторовна, кандидат биологических наук, научный сотрудник, ИЭГМ УрО РАН; e-mail: akhovan@mail.ru

Сидоров Роман Юрьевич, аспирант, ИЭГМ УрО РАН; e-mail: sidorowr@gmail.com

Цыганов Иван Вадимович, аспирант, ИЭГМ УрО РАН; e-mail: zamegagurrendan@gmail.com

Материал поступил в редакцию 28.10.2019 г.